

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 971**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/665** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2000** **E 00989613 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013** **EP 1242095**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**30.12.1999 US 474866**  
**28.04.2000 US 561111**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.10.2013**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
MICHIGAN (100.0%)  
3003 S. STATE STREET WOLVERINE TOWER,  
ROOM 2071  
ANN ARBOR, MICHIGAN 48109-1280, US**

72 Inventor/es:

**BAKER, JAMES R., JR.;  
HAMOUDA, TAREK;  
SHIH, AMY y  
ANDRZEJ, MYC**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 425 971 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

Composiciones antimicrobianas y procedimientos de uso

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para reducir la infecciosidad, morbilidad y tasa de mortalidad asociada con una diversidad de patógenos. La presente invención también se refiere a procedimientos y composiciones para descontaminar áreas, muestras, soluciones y productos alimentarios colonizados o infectados de otro modo por patógenos y microorganismos.

**Antecedentes de la invención**

10 Los patógenos tales como bacterias, hongos, virus y esporas bacterianas son responsables de una plétora de enfermedades humanas y animales, así como contaminación de alimentos y muestras biológicas y ambientales. La primera etapa en las infecciones microbianas de animales generalmente es unión o colonización de piel o membranas mucosas, seguido de posterior invasión y diseminación del microbio infeccioso. Los portales de entrada de bacterias patógenas son predominantemente la piel y membranas mucosas.

15 En particular, las bacterias del género *Bacillus* forman esporas estables que resisten condiciones duras y temperaturas extremas. La contaminación de tierras de cultivo con *B. anthracis* conduce a una enfermedad letal en animales domésticos, agrícolas y salvajes (Véase, por ejemplo, Dragon y Rennie, Can. Vet. J. 36:295 [1995]). La infección humana con este organismo habitualmente resulta del contacto con animales infectados o productos animales infectados (Véase, por ejemplo, Welkos y col., Infect. Immun. 51:795 [1986]). Los síndromes clínicos humanos incluyen una forma pulmonar que tiene una rápida aparición y es frecuentemente letal. Las formas  
20 gastrointestinales y cutáneas de carbunco, aunque menos rápidas, pueden dar como resultado muertes a no ser que se traten de forma agresiva (Véase, por ejemplo, Franz y col., JAMA 278:399 [1997]; y Pile y col., Arch. Intern. Med. 158:429 [1998]). La infección por *Bacillus anthracis* en seres humanos ya no es habitual debido a controles de animales eficaces que incluyen vacunas, antibióticos y disposición apropiada de ganado infectado. Sin embargo, la infección por carbunco animal aún representa un problema significativo debido a la dificultad de la descontaminación de tierras y granjas. Además, hay preocupación acerca de la infección humana causada por la guerra y/o actividades  
25 terroristas.

Aunque está disponible una vacuna para el carbunco (Véase, por ejemplo, Ivins y col., Vaccine 13:1779 [1995]) y puede usarse para la prevención de carbunco clásico, la mezcla genética de diferentes cepas del organismo puede hacer a la vacuna ineficaz (Véase, por ejemplo, Mobley, Military Med. 160:547 [1995]). Las consecuencias  
30 potenciales del uso de esporas de carbunco como un arma biológica se demostró por la liberación accidental de *Bacillus anthracis* de un laboratorio de microbiología militar en la antigua Unión Soviética. Se atribuyeron setenta y siete casos de carbunco humano, incluyendo 66 muertes, al accidente. Se produjeron algunas infecciones de carbunco hasta una distancia de 4 kilómetros del laboratorio (Véase, por ejemplo, Meselson y col., Science 266:1202 [1994]). El análisis genético de las víctimas infectadas reveló la presencia de múltiples cepas o de un *B. anthracis* alterado genéticamente (Véase, por ejemplo, Jackson y col., Proc. Nat. Acad. Of Sci. U.S.A. 95:1224 [1998]).  
35

Adicionalmente, también se ha indicado que otros miembros del género *Bacillus* son agentes etiológicos para muchas enfermedades humanas. *Bacillus cereus* es un patógeno común. Está implicado en enfermedades portadas por los alimentos debido a la capacidad de las esporas para sobrevivir a los procedimientos culinarios. También está asociado con septicemia local e infección de heridas y sistémica (Véase, por ejemplo, Drobniewski, Clin. Micro. Rev. 6:324 [1993]). Muchas bacterias desarrollan fácilmente resistencia a antibióticos. Un organismo infectado con una  
40 cepa de bacterias resistente a antibióticos se enfrenta a consecuencias graves y potencialmente con peligro para la vida.

Los ejemplos de bacterias que desarrollan resistencia incluyen *Staphylococcus* que con frecuencia provoca infecciones letales, neumococos que provocan neumonía y meningitis; *Salmonella* y *E. coli* que provocan diarrea; y enterococos que provocan infecciones del torrente sanguíneo, herida quirúrgica y tracto urinario (Véase, por  
45 ejemplo, Berkelman y col., J. Infect. Dis. 170 (2): 272 [1994]).

Aunque es un avance inestimable, la terapia con antibióticos y antimicrobiana adolece de varios problemas, particularmente cuando aparecen cepas de diversas bacterias que son resistentes a antibióticos. Además, los  
50 desinfectantes/biocidas (por ejemplo, hipoclorito sódico, formaldehído y fenoles) que son altamente eficaces contra esporas de *Bacillus*, no están bien adaptados para descontaminación del ambiente, equipamiento o víctimas. Esto se debe a toxicidad que conduce a necrosis tisular y lesión pulmonar grave después de inhalación de vapores volátiles. La naturaleza corrosiva de estos compuestos también los hace inadecuados para la descontaminación de equipamiento sensible (Véase, por ejemplo, Alasri y col., Can. J. Micro. 39:52 [1993]; Beauchamp y col., Crit. Rev. Tox. 22:143 [1992]; Hess y col., Amer. J. dent. 04:51 [1991]; Lineaweaver y col., Arco. Surg. 120:267 [1985];  
55 Morgan, Tox. Path. 25:291 [1997]; y Russell, Clin. Micro. 3:99 [1990]).

El virus de la gripe A es un patógeno común de la respiración que se usa ampliamente como un sistema modelo para ensayar agentes antivirales *in vitro* (Véase, por ejemplo, Karaivanova y Spiro, Biochem. J. 329:511 [1998];

Mammen y col., J. Med. Chem. 38:4179 [1995]; y Huang y col., FEBS Letters 291:199 [1991]), e *in vivo* (Véase, por ejemplo, Waghom y Goa, Drugs 55:721 [1998]; Mendel y col., Antimicrob. Agents Chemother. 42:640 [1998]; y Smith y col., J. med. Chem. 41:787 [1998]). Las glicoproteínas de envoltura, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), que determinan la especificidad antigénica de subtipos virales, son capaces de mutar fácilmente, permitiendo que el virus evada los anticuerpos neutralizadores. Los compuestos antivirales e inhibidores de neuraminidasa actuales son mínimamente eficaces y la resistencia viral es habitual.

Claramente, se necesitan composiciones y procedimientos antipatógenos que reduzcan la infecciosidad, morbilidad y mortalidad asociadas con la exposición a patógenos. Dichas composiciones y procedimientos preferentemente no deben tener las propiedades indeseables de promover la resistencia microbiana, o de ser tóxicas para el receptor.

## **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para reducir la infecciosidad, morbilidad y tasa de mortalidad asociadas con una diversidad de patógenos. La presente invención también se refiere a procedimientos y composiciones para descontaminar áreas, muestras, soluciones y productos alimentarios colonizados o infectados de otro modo por patógenos y microorganismos. Ciertas realizaciones de las presentes composiciones son no tóxicas y pueden ingerirse de forma segura por seres humanos y otros animales. Adicionalmente, ciertas realizaciones de la presente invención son químicamente estables y no manchan.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos adecuados para tratar animales, incluyendo seres humanos, expuestos a patógenos o la amenaza de patógenos. En algunas realizaciones, el animal se pone en contacto con cantidades eficaces de las composiciones antes de su exposición a organismos patógenos. En otras realizaciones, el animal se pone en contacto con cantidades eficaces de las composiciones después de exposición a organismos patógenos. Por lo tanto, la presente invención contempla tanto la prevención como el tratamiento de infecciones microbiológicas.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos adecuados para descontaminar soluciones y superficies, incluyendo muestras orgánicas e inorgánicas que se exponen a patógenos o se sospecha que contienen patógenos. En otras realizaciones más de la presente invención, las composiciones se usan como aditivos para prevenir el crecimiento de microorganismos perjudiciales o indeseados en muestras biológicas y ambientales.

En realizaciones preferidas, se consigue reducción de la infecciosidad, morbilidad y mortalidad por organismos patógenos poniendo en contacto el organismo patógeno con una nanoemulsión de aceite en agua que comprende una fase oleosa, una fase acuosa y al menos otro componente. En algunas realizaciones preferidas, la emulsión comprende además un disolvente. En algunas realizaciones preferidas, el disolvente comprende un disolvente de fosfato orgánico. En otras realizaciones más, el disolvente basado en fosfato orgánico comprende dialquil fosfatos o trialquil fosfatos (por ejemplo, tributil fosfato). En otras realizaciones preferidas más, la emulsión comprende además un alcohol. En realizaciones preferidas que emplean disolventes, el disolvente se proporciona en la fase oleosa de la composición.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden además uno o más tensioactivos o detergentes. En algunas realizaciones, se contempla que el tensioactivo sea un detergente no aniónico. En realizaciones preferidas, el detergente no aniónico es un tensioactivo de polisorbato. En otras realizaciones, el detergente no aniónico es un polioxietilen éter. Los tensioactivos que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, tensioactivos tales como las familias de compuestos TWEEN, TRITON y TYLOXAPOL.

En ciertas realizaciones distintas, las composiciones de la presente invención comprenden además uno o más compuestos que contienen halógeno catiónico, incluyendo, pero sin limitación, cloruro de cetilpiridinio. En otras realizaciones más, las composiciones de la presente invención comprenden además uno o más compuestos que promueven o potencian la germinación ("potenciadores de la germinación") de ciertos microorganismos, y en particular la forma de espora de ciertas bacterias. Los potenciadores de germinación contemplados para formulación con las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, L-alanina, inosina,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y similares. En más realizaciones adicionales, las composiciones de la presente invención comprenden además uno o más compuestos que aumentan la interacción ("potenciadores de la interacción") de la composición con microorganismos (por ejemplo, agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético, o ácido etilenbis (oxietilenonitrilo) tetraacético en un tampón). Adicionalmente, en otras realizaciones más de la presente invención, las formulaciones comprenden además agentes colorantes o saporíferos (por ejemplo, colorantes y aceite de menta).

En algunas realizaciones, la composición comprende además un agente emulsionante para ayudar a la formación de emulsiones. Los agentes emulsionantes incluyen compuestos que se agregan en la interfaz de aceite/agua para formar un tipo de membrana continua que evita el contacto directo entre dos gotas adyacentes. Ciertas realizaciones de la presente invención presentan composiciones de emulsión de aceite en agua que pueden diluirse fácilmente con agua a una concentración deseada sin alterar sus propiedades antipatógenas.

Además de gotas de aceite discretas dispersadas en una fase acuosa, las emulsiones de aceite en agua también pueden contener otras estructuras lipídicas, tales como vesículas lipídicas pequeñas (por ejemplo, esferas lipídicas

que consisten con frecuencia en varias bicapas lipídicas sustancialmente concéntricas separadas entre sí por capas de fase acuosa), micelas (por ejemplo, moléculas anfifílicas en grupos pequeños de 50-200 moléculas dispuestas de modo que los grupos de cabezas polares se expongan hacia fuera a la fase acuosa y las colas apolares se secuestren hacia dentro lejos de la fase acuosa), o fases lamelares (dispersiones lipídicas en las que cada partícula consiste en bicapas anfifílicas paralelas separadas por películas finas de agua).

Estas estructuras lipídicas se forman como resultado de fuerzas hidrófobas que alejan los restos apolares (por ejemplo, cadenas de hidrocarburo largas) del agua. Las anteriores preparaciones lipídicas pueden describirse generalmente como preparaciones lipídicas tensioactivas (SLP). Las SLP son mínimamente tóxicas para las membranas mucosas y se cree que se metabolizan dentro del intestino delgado (Véase, por ejemplo, Hamouda y col., J. Infect. Disease 180:1939 [1998]). Las SLP no son corrosivas para plásticos y metales a diferencia de desinfectantes tales como la lejía. Como tales, se contempla que las formulaciones de la presente invención basadas en SLP son particularmente útiles contra bacterias, hongos, virus y otras entidades patógenas.

Ciertas realizaciones de la presente invención contemplan procedimientos para reducir la infecciosidad de microorganismos (por ejemplo, agentes patógenos) que comprenden poner en contacto el patógeno con una composición que comprende una emulsión de aceite en agua. En algunas realizaciones preferidas, la emulsión está en forma de una fase oleosa distribuida en una fase acuosa con un tensioactivo, la fase oleosa incluye un disolvente basado en fosfato orgánico y un aceite vehículo. En algunas realizaciones, se exponen al patógeno dos o más emulsiones distintas. En realizaciones preferidas, las emulsiones son fusigénicas y/o lisogénicas. En realizaciones preferidas, la fase oleosa usada en el procedimiento comprende un disolvente no basado en fosfato (por ejemplo, un alcohol).

En realizaciones específicas, el contacto se realiza durante un tiempo suficiente para destruir el agente patógeno o para inhibir el crecimiento del agente. En otras realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para descontaminar una superficie ambiental que alberga patógenos perjudiciales o no deseados. En una realización tal, el agente patógeno se asocia con una superficie ambiental y el procedimiento comprende poner en contacto la superficie ambiental con una cantidad de la composición suficiente para descontaminar la superficie. Aunque puede desearse que sea así, no es necesario que la descontaminación dé como resultado la eliminación total del patógeno. En algunas realizaciones, las composiciones y procedimientos comprenden además colorantes, pinturas y otros compuestos marcadores y de identificación para asegurar que una superficie tratada se ha tratado de forma suficiente con las composiciones de la presente invención.

En ciertas realizaciones, se trata un animal de forma interna con una composición de la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, el contacto es mediante inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. En otras realizaciones, el contacto es mediante administración oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Cuando las presentes composiciones se administran como compuestos farmacéuticos, se contempla que las composiciones comprenden además adyuvantes, excipientes, estabilizadores, diluyentes farmacéuticamente aceptables y similares. En más realizaciones adicionales, la presente invención contempla composiciones que comprenden además moléculas bioactivas farmacéuticamente aceptables adicionales (por ejemplo, anticuerpos, antibióticos, medios para la transfección de ácido nucleico, vitaminas, minerales, cofactores, etc.).

En algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona una composición que comprende una emulsión de aceite en agua, comprendiendo dicha emulsión de aceite en agua una fase oleosa discontinua distribuida en una fase acuosa, un primer componente que comprende un alcohol o glicerol y un segundo componente que comprende un tensioactivo o un compuesto que contiene halógeno. La fase acuosa puede comprender cualquier tipo de fase acuosa incluyendo, pero sin limitación, agua (por ejemplo,  $\text{H}_2\text{O}$ , agua destilada, agua del grifo) y soluciones (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). La fase oleosa puede comprender cualquier tipo de aceite, incluyendo, pero sin limitación, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de soja, aceite de aguacate, aceite de linaza, aceite de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de escualeno, aceite de oliva, aceite de canola, aceite de maíz, aceite de colza, aceite de cártamo y aceite de girasol), aceites animales (por ejemplo, aceite de pescado), aceite saporíferos, vitaminas insolubles en agua, aceite mineral y aceite de motor. En algunas realizaciones preferidas, la fase oleosa comprende 30-90% en volumen de la emulsión de aceite en agua (es decir, constituye el 30-90% del volumen total de la emulsión final), más preferentemente 50-80%. Aunque la presente invención no se limita por la naturaleza del componente alcohólico, en algunas realizaciones preferidas, el alcohol es etanol o metanol. Además, aunque la presente invención no se limita por la naturaleza del tensioactivo, en algunas realizaciones preferidas, el tensioactivo es un tensioactivo de polisorbato (por ejemplo, TWEEN 20, TWEEN 40, TWEEN 60 y TWEEN 80), un feoxipolietoxietanol (por ejemplo, TRITON X-100, X-301, X-165, X-102 y X-200, y TILOXAPOL) o dodecil sulfato sódico. De forma similar, aunque la presente invención no se limita por la naturaleza del compuesto que contiene halógeno, en algunas realizaciones preferidas, el compuesto que contiene halógeno comprende haluros de cetilpiridinio, haluros de cetiltrimetilamonio, haluros de cetildimetiletilamonio, haluros de cetildimetilbenzilamonio, haluros de cetiltributylfosfonio, haluros de dodeciltrimetilamonio, haluros de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilbenzildimetilamonio, bromuro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de cetiltributylfosfonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio o bromuro de tetradeciltrimetilamonio.



Las emulsiones pueden comprender además, un tercer, cuarto, quinto, etc. componentes. En algunas realizaciones preferidas, un componente adicional es un tensioactivo (por ejemplo, un segundo tensioactivo), un potenciador de la germinación, un disolvente basado en fosfato (por ejemplo, tributilfosfato), un neutramingen, L-alanina, cloruro de amonio, caldo de soja de tripticasa, extracto de levadura, ácido L-ascórbico, lecitina, metil éster de ácido p-hidroxibenzoico, tiosulato sódico, citrato sódico, inosina, hidróxido sódico, dextrosa y polietilenglicol (por ejemplo, PEG 200, PEG 2000, etc.).

La presente invención también proporciona procedimientos para preparar cada una de las emulsiones desveladas en el presente documento. Por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una emulsión de aceite en agua que comprende emulsionar una mezcla, comprendiendo dicha mezcla un aceite, una solución acuosa, un primer componente que comprende un alcohol o glicerol, y un segundo componente que comprende un tensioactivo o un compuesto que contiene halógeno.

La presente invención proporciona además procedimientos para proteger (por ejemplo, proteger de contaminación de un microorganismo) o descontaminar un área (por ejemplo, descontaminar un área retirando o reduciendo el número de microorganismos en el área) que comprenden exponer el área a una composición que comprende una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, cualquiera de las emulsiones de aceite en agua descritas en el presente documento). El procedimiento puede aplicarse a cualquier tipo de área. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el área comprende una superficie sólida (por ejemplo, un dispositivo médico), una solución, la superficie de un organismo (por ejemplo, una parte externa o interna de un ser humano) o un producto alimentario.

La presente invención también proporciona procedimientos para modificar cualquiera de las emulsiones descritas en el presente documento, que comprenden: proporcionar la emulsión y añadir o retirar un componente de la emulsión para producir una emulsión modificada. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de ensayar la emulsión modificada en un ensayo biológico (por ejemplo, un ensayo antimicrobiano para determinar la eficacia de la emulsión en la reducción de la cantidad de microorganismos asociados con un área tratada). La presente invención también contempla procedimientos para usar dicha emulsión modificada en el comercio. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de anunciar la venta de la emulsión modificada y/o vender la emulsión modificada.

La presente invención también proporciona sistemas que comprenden un sistema de suministro (por ejemplo, un recipiente, dispensador, envase, etc.) que contiene cualquiera de las emulsiones de aceite en agua descritas en el presente documento. La presente invención comprende además un sistema que comprende un material en contacto con cualquiera de las emulsiones de aceite en agua descritas en el presente documento. La presente invención no se limita por la naturaleza del material en contacto con la emulsión. Por ejemplo, los materiales incluyen, pero sin limitación, dispositivos médicos, soluciones, productos alimentarios, productos de limpieza, aceites de motor, cremas y materiales biológicos (por ejemplo, tejidos humanos).

### **Descripción de las figuras**

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La Figura 1 ilustra la eficacia bactericida de una emulsión de la presente invención en esporas de *B. cereus*.

La Figura 2A-2C ilustra frotis bacterianos que muestran la eficacia bactericida de una emulsión de la presente invención en esporas de *B. cereus*.

La Figura 3 ilustra la actividad esporicida de diferentes diluciones de una emulsión de la presente invención en diferentes esporas de *B. anthracis*.

La Figura 4 ilustra una comparación de la actividad esporicida de una emulsión de la presente invención y lejía a lo largo del tiempo.

La Figura 5 ilustra una comparación de la actividad esporicida de una emulsión de la presente invención y lejía a lo largo del tiempo.

La Figura 6 ilustra la actividad esporicida de diferentes diluciones de una emulsión de la presente invención en medios en diferentes esporas de *B. anthracis*.

La Figura 7 ilustra el ciclo temporal para la actividad esporicida de una emulsión de la presente invención contra *B. anthracis* de Del Rio, TX.

La Figura 8 representa una microfotografía electrónica de *E. coli* (10.000 X).

La Figura 9 representa una microfotografía electrónica de *E. coli* tratada con BCTP (10.000 X).

La Figura 10 representa una microfotografía electrónica de *E. coli* tratada con W<sub>80</sub>8P (10.000 X).

La Figura 11 representa una microfotografía electrónica de *Vibrio cholerae* (25.000 X).

La Figura 12 representa una microfotografía electrónica de *Vibrio cholerae* tratada con W<sub>80</sub>8P (25.000 X).

La Figura 13 representa una microfotografía electrónica de *Vibrio cholerae* tratada con BCTP (25.000 X).

La Figura 14 representa una microfotografía electrónica de *Vibrio cholerae* tratada con X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC (25.000 X).

La Figura 15 ilustra el efecto de BCTP, W<sub>80</sub>8P y X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC en la actividad de gripe A.

La Figura 16 ilustra la actividad esporicida de BCTP contra 4 especies de *Bacillus* diferentes en comparación

con la de X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC contra 2 especies de *Bacillus*. BCTP mostró una actividad esporicida significativa después de 4 horas de tratamiento contra esporas de *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans* y *Bacillus megaterium*, pero no contra esporas de *Bacillus subtilis*. X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC, en 4 horas, mostró destrucción más eficaz contra *B. cereus* y también tuvo una actividad esporicida contra *B. subtilis* que era resistente a BCTP.

La Figura 17 ilustra el ciclo temporal de la actividad esporicida de nanoemulsión contra *Bacillus cereus*. La incubación con BCTP diluida 1:100 dio como resultado el 95% de destrucción en 4 horas. La incubación con X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC diluido 1:1000 dio como resultado el 95% de destrucción en solamente 30 minutos.

La Figura 18 representa microfotografías electrónicas de esporas de *Bacillus cereus* pre y post-tratamiento con BCTP. Obsérvese la densidad uniforme en el córtex y el revestimiento de espора bien definido antes del tratamiento con BCTP. Las esporas después de 4 horas de tratamiento con BCTP muestran alteración tanto en el revestimiento de espора como en la corteza con pérdida de componentes principales.

La Figura 19 ilustra los efectos de inhibición de germinación y estimulación de la actividad esporicida de BCTP diluido 1:100. La actividad esporicida de BCTP se retardó en presencia de D-alanina 10 mM (inhibición de germinación) y se aceleró en presencia de L-alanina 50 μM e inosina 50 μM (estimulación de germinación).

La Figura 20A-Figura 20F representan fotografías generales e histológicas de animales a los que se ha inyectado por vía subcutánea diferentes combinaciones de BCTP y esporas de *B. cereus*. La Figura 20A y Figura 20B ilustran animales a los que se inyectó BCTP solamente a una dilución de 1:10. No hubo daño tisular general y la histología no mostró inflamación. La Figura 20C y Figura 20D ilustran animales a los que se inyectaron 4x10<sup>7</sup> esporas de *Bacillus cereus* solamente por vía subcutánea. El resultado fue un área necrótica grande con un área media de 1,68 cm<sup>2</sup>. La histología de esta área mostró necrosis tisular esencialmente completa de la epidermis y dermis incluyendo grasa subcutánea y músculo. La Figura 20E y Figura 20F representan ratones a los que se inyectaron 4x10<sup>7</sup> esporas de *Bacillus* que se habían premezclado inmediatamente con la nanoemulsión de BCTP a la dilución final 1:10. Estos animales mostraron lesiones cutáneas mínimas con área media de 0,02 cm<sup>2</sup> (una reducción de aproximadamente el 98% de las lesiones que resultaban de una infección no tratada con esporas). La histología de la Figura 20F indica algo de inflamación, sin embargo la mayoría de las estructuras celulares en la epidermis y dermis estaban intactas. Toda la histopatología se muestra a aumento 4X.

La Figura 21A-Figura 21F representan fotografías generales e histológicas de animales con heridas experimentales infectadas con esporas de *Bacillus cereus*. La Figura 21A y Figura 21B representan ratones con heridas experimentales que se infectaron con 2,5x10<sup>7</sup> esporas de *Bacillus cereus* pero no se trataron. El examen histológico de estas heridas indicó necrosis extensiva y una respuesta inflamatoria notable. La Figura 21C y Figura 21D representan ratones con heridas que se infectaron con 2,5x10<sup>7</sup> esporas de *Bacillus cereus* y se irrigaron 1 hora después con solución salina. A las 48 horas, había áreas necróticas grandes que rodeaban a las heridas con un área media de 4,86 cm<sup>2</sup>. Además, el 80% de los animales en este grupo murieron como resultado de la infección. La histología de estas lesiones indicó necrosis total de la dermis y subdermis y grandes números de organismos *Bacillus* vegetativos. La Figura 21E y Figura 21F representan ratones con heridas que se infectaron con 2,5x10<sup>7</sup> esporas de *Bacillus cereus* y se irrigaron 1 hora después con una dilución 1:10 de BCTP. Hubo áreas pequeñas de necrosis adyacentes a las heridas (0,06 cm<sup>2</sup>) que se redujeron el 98% en comparación con animales que recibieron esporas e irrigación con solución salina. Además, solamente el 20% de los animales murieron de estas heridas. La histología de estas lesiones que no mostró pruebas de *Bacillus* vegetativo ilustra varias realizaciones particulares de las diversas emulsiones de la presente invención.

La Figura 22 ilustra la inhibición de infección por gripe A por preparaciones lipídicas tensioactivas. La Figura 22A representa BCTP, W<sub>80</sub>8P, SS y NN, FIG. 22B: BCTP y SS. Se incubó virus con SLP durante 30 minutos y posteriormente se diluyó y se superpuso en células. La inhibición de infección por gripe A se midió usando ELISA celular. Cada punto de datos representa la media de tres repeticiones +/- un error típico.

La Figura 23 ilustra la eficacia de BCTP como un agente anti-gripal en comparación con TRITON X-100. El virus de gripe A se trató con BCTP, tri(n-butyl) fosfato/TRITON X-100/aceite de soja (TTO), TRITON X-100/aceite de soja (TOA) y TRITON X-100 (T) solamente durante 30 minutos. La concentración de TRITON X-100 fue la misma en todas las preparaciones usadas para el tratamiento. La inhibición de la infección por gripe A se midió usando ELISA celular. Cada punto de datos representa la media de tres repeticiones +/- un error típico.

La Figura 24 muestra que BCTP no afecta a infecciosidad por adenovirus. El vector adenoviral (AD.RSV ntlacZ) se trató con tres diluciones de BCTP durante 30 minutos y posteriormente se usó para transfección de 293 células. Cinco días después se realizó el ensayo de 6-galactosidasa. Cada punto de datos representa la media de ocho repeticiones +/- un error típico.

La Figura 25 ilustra las estructuras de gripe A y adenovirus vistas con microscopía electrónica. Los virus se dejaron sin tratar o se incubaron con BCTP a dilución 1:100 durante 15 y 60 minutos a temperatura ambiente y se sometieron a procedimiento de fijación por microscopía electrónica como se describe en los Ejemplos. La Figura 25A ilustra el virus de gripe A sin tratar; la Figura 25B ilustra el virus de gripe A incubado con BCTP durante 15 minutos; la Figura 25C ilustra el adenovirus sin tratar; y la Figura 25D ilustra el adenovirus incubado con BCTP durante 60 minutos. Para todas las imágenes el aumento = 200.000 x. La barra representa 200 nm.

La Figura 26 ilustra las propiedades antibacterianas de BCTP 1% y 10%. El efecto bactericida (% de muerte) se calculó como:

$$\frac{\text{ufc}(\text{inicial}) - \text{ufc}(\text{post} - \text{tratamiento})}{\text{ufc}(\text{inicial})} \times 100$$

La Figura 27 ilustra las propiedades antivirales de BCTP 10% y 1% como se evalúa por ensayos de reducción de placas.

La Figura 28 ilustra organismos ejemplares que son diana para las emulsiones de la presente invención.

La Figura 29 ilustra varias realizaciones particulares de las diversas composiciones de emulsiones de la invención y ciertos usos para las emulsiones.

La Figura 30 ilustra varias realizaciones particulares de las diversas composiciones de emulsiones de la invención y ciertos usos para las emulsiones.

La Figura 31 representa esquemáticamente diversas formulaciones generalizadas y usos de ciertas realizaciones de la presente invención. La Figura 31A muestra la reducción logarítmica de *E. coli* por diversas nanoemulsiones de la presente invención para diluciones al 10%, 1% y 0,10% de la nanoemulsión. La Figura 31B muestra la reducción logarítmica de esporas *B. globigii* por diversas nanoemulsiones de la presente invención para diluciones al 10%, 1% y 0,10% de la nanoemulsión. La Figura 31C muestra la reducción logarítmica de gripe A (ufl/ml) por diversas nanoemulsiones de la presente invención para diluciones al 10%, 1% y 0,10% de la nanoemulsión.

La Figura 32 muestra un gráfico de la reducción logarítmica de *S. typhimurium* tratado con una emulsión de la presente invención en presencia de EDTA a 40 °C.

La Figura 33 muestra un gráfico de la reducción logarítmica de *S. typhimurium* tratado con una emulsión de la presente invención en presencia de EDTA a 50 °C.

La Figura 34 muestra el efecto lítico de una emulsión de la presente invención en comparación con el efecto lítico de sus ingredientes no emulsionados.

La Figura 35 muestra la reducción logarítmica de *Mycobacterium fortuitum* por una emulsión de la presente invención a temperatura ambiente y 37 °C.

La Figura 36 muestra los datos para la descontaminación de una superficie usando una emulsión de la presente invención.

## Definiciones

Para facilitar un entendimiento de la presente invención, se definen a continuación varios términos y frases:

Como se usa en el presente documento, el término “microorganismo” se refiere a organismos microscópicos y organismos macroscópicos relacionados taxonómicamente dentro de las categorías de algas, bacterias, hongos (incluyendo líquenes), protozoos, virus y agentes subvirales. El término microorganismo abarca tanto los organismos que son en sí mismos patógenos para otro organismo (por ejemplo, animales, incluyendo seres humanos y plantas) como los organismos que producen agentes que son patógenos para el otro organismo, mientras que el organismo en sí mismo no es directamente patógeno o infeccioso para el otro organismo. Como se usa en el presente documento, el término “patógeno”, y equivalentes gramaticales, se refiere a un organismo, incluyendo microorganismos, que provoca enfermedad en otro organismo (por ejemplo, animales y plantas) infectando directamente el otro organismo, o produciendo agentes que provocan enfermedad en otro organismo (por ejemplo, bacterias que producen toxinas patógenas y similares).

Como se usa en el presente documento, el término “enfermedad” se refiere a una desviación de la afección considerada normal o media para miembros de una especie, y que es perjudicial para un individuo afectado en condiciones que no son adversas para la mayoría de individuos de esa especie (por ejemplo, diarrea, náuseas, fiebre, dolor e inflamación, etc.). Una enfermedad puede provocarse o resultar del contacto por microorganismos y/o patógenos.

Los términos “huésped” o “sujeto”, como se usan en el presente documento, se refieren a organismos para tratar por las composiciones de la presente invención. Dichos organismos incluyen organismos que se exponen a, o se sospecha que están expuestos a, uno o más patógenos. Dichos organismos también incluyen organismos para tratar para prevenir exposición indeseada a patógenos. Los organismos incluyen, pero sin limitación, animales (por ejemplo, seres humanos, especies animales domesticadas, animales salvajes) y plantas.

Como se usa en el presente documento, el término “inactivar” y equivalentes gramaticales, significa tener la capacidad para matar, eliminar o reducir la capacidad de un patógeno para infectar y/o provocar una respuesta patológica en un huésped.

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término “fusigénico” se refiera a una emulsión que sea capaz de fusionarse con la membrana de un agente microbiano (por ejemplo, una bacteria o espora bacteriana). Los Ejemplos específicos de emulsiones fusigénicas incluyen, pero sin limitación, W<sub>80</sub>8P descrita en las Patentes de Estados Unidos N° 5.618.840; 5.547.677; y 5.549.901 y NP9 descrita en la Patente de Estados Unidos N° 5.700.679, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. NP9 es un poli (oxi-1,2 etanoolil), alfa-(4-nonilfenal)-omega-hidroxi-tensioactivo ramificado. Aunque sin quedar limitado a lo siguiente, NP9 y otros tensioactivos que pueden ser útiles en la presente invención se describen en la Tabla 1 de la Patente de Estados Unidos 5.662.957, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

Como se usa en el presente documento, el término “lisogénico” se refiere a una emulsión que es capaz de alterar la membrana de un agente microbiano (por ejemplo, una bacteria o espora bacteriana). Una composición lisogénica ejemplar es BCTP. En realizaciones preferidas de la presente invención, la presencia tanto de un agente lisogénico como de uno fusigénico en la misma composición produce un efecto inactivador potenciado que cada uno de los agentes por sí solo. Se describen en detalle en el presente documento procedimientos y composiciones que usan esta composición antimicrobiana mejorada.

El término “emulsión”, como se usa en el presente documento, incluye dispersiones de aceite en agua clásicas o gotas, así como otras estructuras lipídicas que pueden formarse como resultado de fuerzas hidrófobas que alejan los restos apolares (es decir, cadenas de hidrocarburos largas) del agua y acercan los grupos de cabezas polares al agua, cuando se mezcla una fase oleosa inmiscible en agua con una fase acuosa. Estas otras estructuras lipídicas incluyen, pero sin limitación, vesículas lipídicas unilamelares, paucilaminares y multilamelares, micelas y fases lamelares. De forma similar, el término “nanoemulsión”, como se usa en el presente documento, se refiere a dispersiones de aceite en agua que comprenden estructuras lipídicas pequeñas. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, la nanoemulsión comprende una fase oleosa que tiene gotas con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ . Los términos “emulsión” y “nanoemulsión” se usan con frecuencia en el presente documento de forma intercambiable, para hacer referencia a las nanoemulsiones de la presente invención.

Como se usan en el presente documento, las expresiones “en contacto” y “expuesto”, se refieren a poner una o más de las composiciones de la presente invención en contacto con un patógeno o una muestra para proteger contra patógenos de modo que las composiciones de la presente invención puedan inactivar el microorganismo o agentes patógenos, si están presentes. La presente invención contempla que las composiciones desveladas se ponen en contacto con los patógenos o agentes microbianos en volúmenes y/o concentraciones suficientes para inactivar los patógenos o agentes microbianos.

El término “tensioactivo” se refiere a cualquier molécula que tenga tanto un grupo de cabeza polar, que prefiere energéticamente solvatación por agua, como una cola hidrófoba que no se solvata bien por agua. La expresión “tensioactivo catiónico” se refiere a un tensioactivo con un grupo de cabeza catiónico. La expresión “tensioactivo aniónico” se refiere a un tensioactivo con un grupo de cabeza aniónico.

Las expresiones “número de índice de equilibrio hidrófilo-lipófilo” y “número de índice de HLB” se refiere a un índice para correlacionar la estructura química de moléculas tensioactivas con su actividad superficial. El número de índice de HLB puede calcularse por una diversidad de fórmulas empíricas como se describe por Meyers, (Meyers, Surfactant Science and Technology, VCH Publishers Inc., Nueva York, páginas 231-245 [1992]), incorporada en el presente documento por referencia. Como se usa en el presente documento, el número de índice de HLB de un tensioactivo es el número de índice de HLB asignado a ese tensioactivo en McCutcheon's Volume 1: Emulsifiers and Detergents North American Edition, 1996 (incorporado en el presente documento por referencia). El número de índice de HLB varía de 0 a aproximadamente 70 o más para tensioactivos comerciales. Los tensioactivos hidrófilos con alta solubilidad en agua y propiedades solubilizantes están en el extremo superior de la escala, mientras que los tensioactivos con baja solubilidad en agua que son buenos solubilizantes de agua en aceites están en el extremo inferior de la escala.

Como se usa en el presente documento, la expresión “potenciadores de germinación” describe compuestos que actúan para potenciar la germinación de ciertas cepas de bacterias (por ejemplo, aminoácidos L [L-alanina],  $\text{CaCl}_2$ , inosina, etc.).

Como se usa en el presente documento, la expresión “potenciadores de la interacción” describe compuestos que actúan para potenciar la interacción de una emulsión con la pared celular de una bacteria (por ejemplo, una bacteria Gram negativa). Los potenciadores de interacción contemplados incluyen pero sin limitación agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], ácido etilenbis (oxietilenonitrilo) tetraacético [EGTA], y similares) y ciertos agentes biológicos (por ejemplo, albúmina de suero bovino [BSA] y similares).

Los términos “tampón” o “agentes tamponantes” se refieren a materiales que, cuando se añaden a una solución, provocan que la solución resista cambios en el pH.

Las expresiones “agente reductor” y “donador de electrones” se refieren a un material que dona electrones a un segundo material para reducir el estado de oxidación de uno o más de los átomos del segundo material.

La expresión “sal monovalente” se refiere a cualquier sal en la que el metal (por ejemplo, Na, K o Li) tiene una carga neta de 1 + en solución (es decir, un protón más que electrones).

La expresión “sal divalente” se refiere a cualquier sal en la que un metal (por ejemplo, Mg, Ca o Sr) tiene una carga neta 2 + en solución.

Las expresiones “quelante” o “agente quelante” se refieren a cualquier material que tenga más de un átomo con un par solitario de electrones que estén disponibles para enlazar con un ion metálico.

El término “solución” se refiere a una mezcla acuosa o no acuosa.

Como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico”, se refiere a composiciones que reducen la infecciosidad, morbilidad o aparición de mortalidad en un huésped en contacto con un microorganismo patógeno o que evitan la infecciosidad, morbilidad o aparición de mortalidad en un huésped en contacto con un microorganismo patógeno. Dichos agentes pueden comprender adicionalmente compuestos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, adyuvantes, excipientes, estabilizadores, diluyentes y similares). En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos de la presente invención se administran en forma de emulsiones tópicas, composiciones inyectables, soluciones ingeribles y similares. Cuando la vía es tópica, la forma puede ser, por ejemplo, una crema, pomada, ungüento o pulverización.

Las expresiones “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable”, como se usan en el presente documento, se refieren a composiciones que no producen sustancialmente reacciones alérgicas o inmunológicas adversas cuando se administran a un huésped (por ejemplo, un animal o un ser humano). Además, en ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden formularse para uso hortícola o agrícola. Dichas formulaciones incluyen baños, pulverizaciones, tratamientos de semillas, inyecciones del tallo, pulverizaciones y brumas. Como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico), agentes isotónicos y retardantes de la absorción, disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico), y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión “por vía tópica” se refiere a aplicación de las composiciones de la presente invención a la superficie de la piel y células y tejidos mucosos (por ejemplo, mucosa alveolar, bucal, lingual, masticatoria o nasal y otros tejidos y células que revisten órganos huecos o cavidades corporales).

Como se usa en el presente documento, la expresión “agentes activos por vía tópica” se refiere a composiciones de la presente invención que inducen respuestas farmacológicas en el sitio de aplicación (contacto) a un huésped.

Como se usa en el presente documento, la expresión “fármacos activos por vía sistémica” se usan ampliamente para indicar una sustancia o composición que producirá una respuesta farmacológica en un sitio lejos del punto de aplicación o entrada en un sujeto.

Como se usa en el presente documento, la expresión “dispositivos médicos” incluye cualquier material o dispositivo que se use sobre, en o a través del cuerpo de un paciente en el transcurso del tratamiento médico (por ejemplo, para una enfermedad o lesión). Los dispositivos médicos incluyen, pero sin limitación, artículos tales como implantes médicos, dispositivos de cuidado de heridas, dispositivos de suministro farmacológico, y dispositivos de protección personal y de cavidades corporales. Los implantes médicos incluyen, pero sin limitación, catéteres urinarios, catéteres intravasculares, derivaciones de diálisis, tubos de drenaje de heridas, suturas cutáneas, injertos vasculares, mallas implantables, dispositivos intraoculares, válvulas cardíacas y similares. Los dispositivos de cuidado de heridas incluyen, pero sin limitación, vendajes de heridas generales, materiales de injertos biológicos, cierres y vendajes de cinta y telas de incisión quirúrgica. Los dispositivos de suministro farmacológico incluyen, pero sin limitación, agujas, parches cutáneos de suministro farmacológico, parches mucosos de suministro farmacológico y esponjas médicas. Los dispositivos de protección personal y de cavidades corporales, incluyen, pero sin limitación, tampones, esponjas, guantes quirúrgicos y de examen, y cepillos de dientes. Los dispositivos de control de la natalidad incluyen, pero sin limitación, dispositivos intrauterinos (DIU), diafragmas y preservativos.

Como se usa en el presente documento, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la retirada de contaminantes o compuestos no deseados de una muestra o composición. Como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente purificado” se refiere a la retirada de aproximadamente 70 a 90%, hasta el 100%, de los contaminantes o compuestos no deseados de una muestra o composición.

Como se usa en el presente documento, el término “superficie” se usa en su sentido más amplio. En un sentido, el término se refiere a los límites más externos de un organismo u objeto inanimado (por ejemplo, vehículos, edificios y equipamiento de procesamiento de alimentos, etc.) que pueden ponerse en contacto con las composiciones de la presente invención (por ejemplo, para animales: la piel, pelo y pelaje, etc., y para plantas: las hojas, tallos, partes de floración y cuerpos fructíferos, etc.). En otro sentido, el término también se refiere a las membranas internas y superficies de animales y plantas (por ejemplo, para animales: el tracto digestivo, tejidos vasculares y similares, y para plantas: los tejidos vasculares, etc.) que pueden entrar en contacto con composiciones por cualquiera de varias vías de suministro transdérmico (por ejemplo, inyección, ingestión, suministro transdérmico, inhalación y similares).

Como se usa en el presente documento, el término “muestra” se usa en su sentido más amplio. En un sentido puede hacer referencia a células o tejidos animales. En otro sentido, se pretende que incluya una muestra de ensayo o cultivo obtenido de cualquier fuente, tal como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden obtenerse de plantas o animales (incluyendo seres humanos) y abarcar fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua y muestras industriales. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente invención.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención comprende composiciones y procedimientos para la reducción de la infecciosidad, morbilidad y tasa de mortalidad asociada con una diversidad de organismos microbianos y patógenos. La presente invención también se refiere a procedimientos y composiciones para descontaminar áreas colonizadas o infectadas de otro modo por organismos patógenos. Además, la presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para reducir la infecciosidad de organismos patógenos en productos alimentarios. En realizaciones preferidas, se consigue reducción de la infecciosidad, morbilidad y mortalidad de organismos patógenos poniendo en contacto el organismo patógeno con una composición de aceite en agua que comprende una fase acuosa y fase oleosa, y al menos otro compuesto. Ciertas realizaciones ilustrativas de la presente invención se describen posteriormente. La presente invención no se limita a estas realizaciones específicas. La descripción se proporciona en las siguientes secciones: I) Composiciones ejemplares; II) Técnicas de formulación ejemplares; III) Propiedades y actividades, IV) Usos, V) Ejemplos específicos.

**I. Composiciones ejemplares**

En realizaciones preferidas, las emulsiones de la presente invención comprenden (i) una fase acuosa, (ii) una fase oleosa; y al menos un compuesto adicional. En algunas realizaciones de la presente invención, estos compuestos adicionales se mezclan en la fase acuosa u oleosa de la composición. En otras realizaciones, estos compuestos adicionales se mezclan en una composición de fases oleosa y acuosa previamente emulsionadas. En algunas de estas realizaciones, se mezclan uno o más compuestos adicionales en una composición de emulsión existente inmediatamente antes de su uso. En otras realizaciones, se mezclan uno o más compuestos adicionales en una composición de emulsión existente antes del uso inmediato de las composiciones.

Los compuestos adicionales adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, uno o más disolventes, tensioactivos y detergentes orgánicos, y más particularmente basados en fosfato orgánico, compuestos que contienen halógeno catiónico, potenciadores de la germinación, potenciadores de la interacción, aditivos alimentarios (por ejemplo, saporíferos, edulcorantes, agentes de masificación y similares) y compuestos farmacéuticamente aceptables. Ciertas realizaciones ejemplares de los diversos compuestos contemplados para su uso en las composiciones de la presente invención se presentan posteriormente.

**A. Fase acuosa**

En ciertas realizaciones preferidas, la emulsión comprende de aproximadamente 5 a 60, preferentemente de 10 a 40, más preferentemente de 15 a 30% en volumen de fase acuosa, basándose en el volumen total de la emulsión. En realizaciones preferidas, la fase acuosa comprende agua a un pH de aproximadamente 4 a 10, preferentemente de aproximadamente 6 a 8. Cuando las emulsiones de la presente invención contienen un potenciador de la germinación, el pH es preferentemente de 6 a 8. El agua es preferentemente desionizada (en lo sucesivo en el presente documento "DiH<sub>2</sub>O"). En algunas realizaciones la fase acuosa comprende solución salina tamponada con fosfato (PBS). En las realizaciones de la presente invención pretendidas para consumo por, o contacto con, un huésped, la fase acuosa, y cualquier compuesto adicional proporcionado en la fase acuosa, puede ser además estéril y sin pirógenos.

**B. Fase oleosa y disolventes**

En ciertas realizaciones preferidas, la fase oleosa (por ejemplo, aceite vehículo) de la emulsión de la presente invención comprende 30-90, preferentemente 60-80, y más preferentemente 60-70% en volumen de aceite, basándose en el volumen total de la emulsión. Los aceites adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite de soja, aceite de cacahuete, aceite de linaza, aceite de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de escualeno, aceite de oliva, aceite de canola, aceite de maíz, aceite de colza, aceite de cártamo, aceite de girasol, aceites de pescado, aceites saporíferos, vitaminas insolubles en agua y mezclas de los mismos. En realizaciones particularmente preferidas, se usa aceite de soja. Los aceites contemplados adicionales incluyen aceites de motor, aceites minerales y mantequilla. En realizaciones preferidas de la presente invención, la fase oleosa se distribuye preferentemente por toda la fase acuosa como gotas que tienen un tamaño de partícula medio en el intervalo de aproximadamente 1-2 micrómetros, más preferentemente de 0,2 a 0,8, y más preferentemente aproximadamente 0,8 micrómetros. En otras realizaciones, la fase acuosa puede distribuirse en la fase oleosa.

En algunas realizaciones, la fase oleosa comprende 3-15, preferentemente 5-10% en volumen de un disolvente orgánico, basándose en el volumen total de la emulsión. Aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo particular, se contempla que los disolventes basados en fosfato orgánico empleados en las emulsiones sirven para retirar o alterar los lípidos en las membranas de los patógenos. Por lo tanto, cualquier disolvente que retire los esteroides o fosfolípidos de las membranas microbianas encuentra uso en las emulsiones de la presente invención. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, disolventes basados en fosfato orgánico o alcoholes. En realizaciones preferidas, los disolventes basados en fosfato orgánico incluyen, pero sin limitación, dialquil- y trialquil fosfatos (por ejemplo, tri-n-butil fosfato [TBP]) en cualquier combinación. Un trialquil fosfato particularmente preferido en ciertas realizaciones comprende tri-n-butil fosfato, que es un plastificante. Además, en una realización preferida, cada grupo alquilo del di- o trialquil fosfato tiene de uno a diez o más átomos

de carbono, más preferentemente de dos a ocho átomos de carbono. La presente invención también contempla que cada grupo alquilo del di- o trialquil fosfato puede ser o no idéntico a los otros. En ciertas realizaciones, pueden emplearse mezclas de diferentes dialquil o trialquil fosfatos. La composición comprende etanol, más alcoholes como disolventes, dichos disolventes incluyen, pero sin limitación, metanol, propanol y octanol. En las realizaciones de la presente invención pretendidas para consumo por, o contacto con, un huésped, la fase oleosa de cualquier compuesto adicional proporcionado en la fase oleosa, puede ser además estéril y sin pirógenos.

### C. Tensioactivos y detergentes

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden además uno o más tensioactivos o detergentes (por ejemplo, de aproximadamente 3 al 15%, y preferentemente aproximadamente 10%). Aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo particular, se contempla que los tensioactivos, cuando están presentes en las composiciones, ayudan a estabilizar las composiciones. Se contemplan tensioactivos tanto no iónicos (no aniónicos) como iónicos. Adicionalmente, los tensioactivos de la familia BRIJ de tensioactivos encuentran uso en las composiciones de la presente invención. El tensioactivo puede proporcionarse en la fase acuosa o la oleosa. Los tensioactivos para su uso con las emulsiones incluyen una diversidad de tensioactivos aniónicos y no iónicos, así como otros compuestos emulsionantes que son capaces de promover la formación de emulsiones de aceite en agua. En general, los compuestos emulsionantes son relativamente hidrófilos, y pueden usarse mezclas de compuestos emulsionantes para conseguir las cualidades necesarias. En algunas formulaciones, los tensioactivos no iónicos tienen ventajas sobre emulsionantes iónicos porque son sustancialmente más compatibles con un amplio intervalo de pH y con frecuencia forman emulsiones más estables que los emulsionantes iónicos (por ejemplo, de tipo jabón). Por lo tanto, en ciertas realizaciones preferidas, la composición de la presente invención comprende uno o más tensioactivos no iónicos tales como tensioactivos de polisorbato (por ejemplo, polioxietilén éteres), detergentes de polisorbato, feoxipolietoxietanoles, y similares. Los ejemplos de detergentes de polisorbato útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, TWEEN 20, TWEEN 40, TWEEN 60, TWEEN 80, etc.

TWEEN 60 (polioxietilensorbitan monoestearato), junto con TWEEN 20, TWEEN 40 y TWEEN 80, comprenden polisorbatos que se usan como emulsionantes en varias composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones de la presente invención, estos compuestos también se usan como co-componentes con adyuvantes. Los tensioactivos de TWEEN también parecen tener efectos virucidas en virus de envoltura lipídica (véase por ejemplo, Eriksson y col., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5 (Supl. 3): S37-S44 [1994]).

Los ejemplos de feoxipolietoxietanoles, y polímeros de los mismos, útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, TRITON (por ejemplo, X-100, X-301, X-165, X-102, X-200), y TYLOXAPOL. TRITON X-100 es un detergente no iónico fuerte y agente de dispersión ampliamente usado para extraer lípidos y proteínas de estructuras biológicas. También tiene un efecto virucida contra espectro amplio de virus con envoltura (véase por ejemplo, Maha e Igarashi, Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 28: 718 [1997]; y Portocala y col., Virologie 27: 261 [1976]). Debido a esta actividad antiviral, se emplea para inactivar patógenos virales en plasma humano congelado nuevo (véase por ejemplo, Horowitz y col., Blood 79: 826 [1992]).

En realizaciones particularmente preferidas, se emplean los tensioactivos TRITON X-100 (t-octilfenoxipolietoxietanol), y/o TYLOXAPOL. Algunas otras realizaciones emplean espermicidas (por ejemplo, Nonoxinol-9). Pueden determinarse tensioactivos y detergentes adicionales útiles en las composiciones de la presente invención a partir de trabajos de referencia (por ejemplo, McCutcheon's Volume 1: Emulsions and Detergents - North American Edition, 2000).

En algunas realizaciones, como se muestra en la Figura 28, las composiciones que comprenden un tensioactivo y un disolvente orgánico son útiles para inactivar virus con envoltura y bacterias Gram positivas.

### D. Compuestos que contienen halógenos catiónicos

Las composiciones de la presente invención comprenden además un compuesto que contiene halógenos catiónicos (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a 1,0% en peso o más, basándose en el peso total de la emulsión). En realizaciones preferidas, el compuesto que contiene halógenos catiónicos está preferentemente premezclado con la fase oleosa; sin embargo, debería entenderse que el compuesto que contiene halógenos catiónicos puede proporcionarse en combinación con la composición de emulsión en una formulación definida. Pueden seleccionarse compuestos que contienen halógenos adecuados, por ejemplo, de compuestos que comprenden iones cloruro, fluoruro, bromuro y yoduro. En realizaciones preferidas, los compuestos que contienen halógenos catiónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, haluros de cetilpiridinio, haluros de cetiltrimetilamonio, haluros de cetildimetilamonio, haluros de cetildimetilbencilamonio, haluros de cetiltributildifosfonio, haluros de dodeciltrimetilamonio o haluros de tetradeciltrimetilamonio. En algunas realizaciones particulares, los compuestos que contienen halógenos catiónicos adecuados comprenden, pero sin limitación, cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilbencildimetilamonio, bromuro de cetilpiridinio (CPB), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de cetildimetilamonio, bromuro de cetiltributildifosfonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio y bromuro de tetradeciltrimetilamonio. En realizaciones particularmente preferidas, el compuesto que contiene halógenos catiónicos es CPC, aunque las composiciones de la presente invención no se limitan a formulación con un compuesto que contiene catiónicos particular.

En algunas realizaciones, la adición de 1,0% en peso o más de un compuesto que contiene catiónicos a las composiciones de la emulsión de la presente invención proporciona una composición que es útil en la inactivación de virus con envoltura, bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y hongos.

#### E. Potenciadores de la germinación

5 En otras realizaciones de la presente invención, las composiciones comprenden además uno o más compuestos potenciadores de la germinación (por ejemplo, de aproximadamente 1 mM a 15 mM, y más preferentemente de aproximadamente 5 mM a 10 mM). En realizaciones preferidas, el compuesto potenciador de la germinación se proporciona en la fase acuosa antes de formación de la emulsión. La presente invención contempla que cuando se añaden potenciadores de la germinación a las composiciones desveladas se potencian las propiedades esporicidas de las composiciones. La presente invención contempla además que dichos potenciadores de la germinación inician la actividad esporicida cerca de pH neutro (entre pH 6 – 8, y preferentemente 7). Dichas emulsiones de pH neutro pueden obtenerse, por ejemplo, diluyendo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o mediante preparaciones de emulsiones neutras. La actividad esporicida de las composiciones se produce preferentemente cuando las esporas inician la germinación.

15 En realizaciones específicas, se ha demostrado que las emulsiones de la presente invención tienen actividad esporicida. Aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo particular, se cree que el componente fusigénico de las emulsiones actúa para iniciar la germinación y antes de que se complete la reversión a la forma vegetativa el componente lisogénico de la emulsión actúa para lisar la nueva espora en germinación. Estos componentes de la emulsión actúan por lo tanto en concierto para dejar la espora susceptible a alteración por las emulsiones. La adición de potenciador de la germinación facilita además la actividad antiesporicida de las emulsiones de la presente invención, por ejemplo, acelerando la velocidad a la que se produce la actividad esporicida.

La germinación de endosporas bacterianas y esporas fúngicas se asocia con metabolismo aumentado y resistencia reducida a calor y reactivos químicos. Para que se produzca germinación, la espora debe detectar que el ambiente es adecuado para mantener la vegetación y reproducción. El aminoácido L-alanina estimula la germinación de esporas bacterianas (véase por ejemplo, Hills, J. Gen. Micro. 4: 38 [1950]; y Halvorson y Church, Bacteriol Rev. 21: 112 [1957]). También se ha indicado que L-alanina y L-prolina inician la germinación de esporas fúngicas (Yanagita, Arch Mikrobiol 26: 329 [1957]). Los  $\alpha$ -aminoácidos simples, tales como glicina y L-alanina, ocupan una posición central en el metabolismo. La transaminación o desaminación de  $\alpha$ -aminoácidos produce los carbohidratos glicogénicos o quetogénicos y el nitrógeno necesario para metabolismo y crecimiento. Por ejemplo, la transaminación o desaminación de L-alanina produce piruvato que es el producto final del metabolismo glicolítico (Ruta Embden-Meyerhof-Parnas). La oxidación de piruvato por complejo de piruvato deshidrogenasa produce acetil-CoA, NADH,  $H^+$  y  $CO_2$ . Acetil-CoA es el sustrato iniciador del ciclo del ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) que a su vez alimenta la cadena del transporte de electrones mitocondrial. Acetil-CoA es también la fuente de carbono última para síntesis de ácidos grasos así como para síntesis de esteroles. Los  $\alpha$ -aminoácidos simples pueden proporcionar el nitrógeno,  $CO_2$ , equivalentes glicogénicos y/o quetogénicos requeridos para germinación y la actividad metabólica a continuación.

En ciertas realizaciones, los agentes potenciadores de germinación adecuados de la invención incluyen, pero sin limitación,  $\alpha$ -aminoácidos que comprenden glicina y los L-enantiómeros de alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, fenilalanina, tirosina y los alquil ésteres de los mismos. Puede encontrarse información adicional sobre los efectos de aminoácidos en la germinación en la Patente de Estados Unidos Nº 5.510.104, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, también puede usarse una mezcla de glucosa, fructosa, asparagina, cloruro sódico (NaCl), cloruro de amonio ( $NH_4Cl$ ), cloruro cálcico ( $CaCl_2$ ) y cloruro potásico (KCl). En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, la formulación comprende los potenciadores de germinación L-alanina,  $CaCl_2$ , Inosina y  $NH_4Cl$ . En algunas realizaciones, las composiciones comprenden además una o más formas comunes de medios de crecimiento (por ejemplo, caldo de soja de tripticasa y similares) que pueden en sí mismos comprender o no adicionalmente potenciadores de la germinación y tampones.

Los compuestos anteriores son meramente potenciadores de la germinación ejemplares y se entiende que otros potenciadores de la germinación conocidos encontrarán uso en las composiciones de la presente invención. Un potenciador de la germinación candidato debería cumplir dos criterios para su inclusión en las composiciones de la presente invención: debería poder asociarse con las emulsiones de la presente invención y debería aumentar la tasa de germinación de una espora diana cuando se incorpora en las emulsiones de la presente invención. Un experto en la materia puede determinar si un agente particular tiene la función deseada de actuar como un potenciador de la germinación aplicando dicho agente en combinación con las composiciones de la presente invención a una diana y comparando la inactivación de la diana cuando se pone en contacto con la mezcla con activación de dianas similares por la composición de la presente invención sin el agente. Cualquier agente que aumente la germinación, y por lo tanto reduzca o inhiba el crecimiento de los organismos, se considera un potenciador adecuado para su uso en la presente invención.

60



En otras realizaciones más, la adición de un potenciador de la germinación (o medio de crecimiento) a una composición de emulsión neutra produce una composición que es útil en el tratamiento de esporas bacterianas además de virus con envoltura, bacterias Gram negativas y bacteria Gram positivas.

#### F. Potenciadores de la interacción

- 5 En otras realizaciones más, las composiciones de la presente invención comprenden uno o más compuestos capaces de aumentar la interacción de las composiciones (es decir, "potenciador de la interacción") con patógenos diana (por ejemplo, la pared celular de bacterias Gram negativas tales como *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas*). En realizaciones preferidas, el potenciador de la interacción está preferentemente premezclado con la fase oleosa; sin embargo, en otras realizaciones el potenciador de interacción se proporciona en combinación con las composiciones después de emulsificación. En ciertas realizaciones preferidas, el potenciador de interacción es un agente quelante (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] o ácido etilenbis(oxietilenoitrilo)tetraacético [EGTA] en una tampón [por ejemplo, tampón tris]). Se entiende que los agentes quelantes son compuestos potenciadores de la interacción meramente ejemplares. De hecho, se contemplan otros agentes que aumentan la interacción de las composiciones de la presente invención con agentes microbianos y/o patógenos. En realizaciones particularmente preferidas, el potenciador de la interacción está a una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 250  $\mu\text{M}$ . Un experto en la materia podrá determinar si un agente particular tiene la función deseada de actuar como un potenciador de interacción aplicando dicho agente en combinación con las composiciones de la presente invención a una diana y comparando la inactivación de la diana cuando se pone en contacto con la mezcla con inactivación de dianas similares por la composición de la presente invención sin el agente. Cualquier agente que aumente la interacción y por lo tanto reduzca o inhiba el crecimiento de las bacterias en comparación con ese parámetro en su ausencia se considera un potenciador de la interacción.

En algunas realizaciones, la adición de un potenciador de la interacción a las composiciones de la presente invención produce una composición que es útil en el tratamiento de virus con envoltura, algunas bacterias Gram positivas y algunas bacterias Gram negativas.

#### 25 II. Formulaciones ejemplares

En la sección A), expuesta posteriormente, la presente invención describe técnicas ejemplares para realizar formulaciones genéricas de las composiciones desveladas. Adicionalmente, la presente invención enumera varias recetas de formulación específica, aunque ejemplar, en la sección B) expuesta posteriormente.

#### A. Técnicas de formulación

- 30 Las emulsiones de aceite en agua que inactivan patógenos de la presente invención pueden formarse usando técnicas formadoras de emulsión clásicas. Brevemente, la fase oleosa se mezcla con la fase acuosa bajo fuerzas de cizallamiento relativamente altas (por ejemplo, usando fuerzas hidráulicas y mecánicas altas) para obtener una emulsión de aceite en agua que contiene gotas de aceite, que son de aproximadamente 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ , preferentemente 1-2  $\mu\text{m}$ , de diámetro. La emulsión se forma mezclando la fase oleosa con un fase acuosa en una relación en volumen que varía de aproximadamente 1:9 a 5:1, preferentemente de aproximadamente 5:1 a 3:1, más preferentemente 4:1, de fase oleosa y fase acuosa. Las fases oleosa y acuosa pueden mezclarse usando cualquier aparato capaz de producir fuerzas de cizallamiento suficientes para formar una emulsión tales como Prensas Francesas o mezcladores de alto cizallamiento (por ejemplo, están disponibles mezcladores de alto cizallamiento aprobados por la FDA, por ejemplo, de Admix, Inc., Manchester, NH). Se describen procedimientos para producir las emulsiones en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.103.497 y 4.895.452, incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad.

- En realizaciones preferidas, las composiciones usadas en los procedimientos de la presente invención comprenden gotas de una fase oleosa discontinua dispersada en una fase acuosa continua, tal como agua. En realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención son estables, y no se descomponen incluso después de largos periodos de almacenamiento (por ejemplo, uno o más años). Ciertas composiciones de la presente invención no son tóxicas y son seguras cuando se ingieren, inhalan o se ponen en contacto con la piel de un huésped. Esto se diferencia de muchos microbiocidas químicos que son irritantes conocidos. Adicionalmente, en algunas realizaciones, las composiciones tampoco son tóxicas para plantas.

- Las composiciones de la presente invención pueden producirse en grandes cantidades y son estables durante muchos meses a un amplio intervalo de temperaturas. Sin diluir, tienden a tener la textura de una crema semi-sólida y pueden aplicarse por vía tópica manualmente o mezclarse con agua. Diluidas tienden a tener una consistencia y apariencia similar a la leche desnatada, y pueden pulverizarse para descontaminar superficies o potencialmente interaccionar con esporas aerosolizadas antes de la inhalación. Estas propiedades proporcionan una flexibilidad que es útil para una amplia serie de aplicaciones antimicrobianas. Adicionalmente, estas propiedades hacen a las composiciones de la presente invención particularmente apropiadas para aplicaciones de descontaminación.

Como se ha indicado anteriormente, al menos una parte de la emulsión puede estar en forma de estructuras lipídicas que incluyen, pero sin limitación, vesículas lipídicas unilamelares, multilamelares y paucilamelares, micelas

y fases lamelares.

Algunas realizaciones de la presente invención emplean una fase oleosa que contiene etanol. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las emulsiones de la presente invención contienen (i) una fase acuosa y (ii) una fase oleosa que contiene etanol como el disolvente orgánico y opcionalmente un potenciador de la germinación y (iii) TYLOXAPOL como el tensioactivo (preferentemente 2-5%, más preferentemente 3%). Esta formulación es altamente eficaz contra microbios y además no es irritante y no es tóxica para usuarios mamíferos (y por lo tanto puede ponerse en contacto con membranas mucosas).

En algunas otras realizaciones, las emulsiones de la presente invención comprenden una primera emulsión emulsionada dentro de una segunda emulsión, en la que (a) la primera emulsión comprende (i) una fase acuosa; y (ii) una fase oleosa que comprende un aceite y un disolvente orgánico; y (iii) un tensioactivo; y (b) la segunda emulsión comprende (i) una fase acuosa; y (ii) una fase oleosa que comprende un aceite y compuesto que contiene catiónico; y (iii) un tensioactivo.

## B. Formulaciones ejemplares

La siguiente descripción proporciona varias emulsiones ejemplares incluyendo formulaciones para composiciones BCTP y  $X_8W_{60}PC$ . BCTP comprende una nanoemulsión de agua en aceite, en la que la fase oleosa se preparó a partir de aceite de soja, Tri-n-butil fosfato y TRITON X-100 en agua al 80%.  $X_8W_{60}PC$  comprende una mezcla de volúmenes iguales de BCTP con  $W_{80}8P$ .  $W_{80}8P$  es un compuesto de tipo liposoma compuesto de monoestearato de glicerol, esteroides de soja refinados (por ejemplo, esteroides GENEROL), TWEEN 60, aceite de soja, un CPC que contiene halógenos iónicos catiónicos y aceite de menta. La familia del GENEROL son un grupo de esteroides de soja polietoxilados (Henkel Corporation, Ambler, Pensilvania). Se proporcionan formulaciones de emulsiones en la Tabla 1 para ciertas realizaciones de la presente invención. Estas formulaciones particulares pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos N° 5.700.679 (NN); 5.618.840; 5.549.901 ( $W_{80}8P$ ); y 5.547.677, incorporadas en el presente documento por referencia en su totalidad. Se presentan ciertas otras formulaciones de emulsión en la Figura 29. Además, la Figura 30 presenta esquemáticamente formulaciones generalizadas y usos de ciertas realizaciones de la presente invención.

La emulsión  $X_8W_{60}PC$  se fabrica realizando en primer lugar la emulsión  $W_{80}8P$  y emulsiones BCTP por separado. Después se vuelve a emulsionar una mezcla de estas dos emulsiones para producir una composición de emulsión nueva denominada  $X_8W_{60}PC$ . Se describen procedimientos para producir dichas emulsiones en las Patentes de Estados Unidos N° 5.103.497 y 4.895.452. Estos compuestos tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro, y pueden inactivar bacterias vegetativas mediante alteración de membrana.

**Tabla 1**

Nombre	Fórmula de fase oleosa	Relación de fase acuosa y oleosa (Vol/Vol)
BCTP	1 volumen de Tri(N-butil)fosfato 1 volumen de TRITON X-100 8 volúmenes de aceite de soja	4:1
NN	86,5 g de glicerol monooleato 60,1 ml de nonoxynol-9 24,2 g de GENEROL 122 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio 554 g de aceite de soja	3:1
$W_{80}8P$	86,5 g de glicerol monooleato 21,2 g de polisorbato 60 24,2 g de GENEROL 122 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio 4 ml de aceite de menta 554 g de aceite de soja	3,2:1
SS	86,5 g de glicerol monooleato 21,2 g de polisorbato 60 24,2 g de GENEROL 122 3,27 g de cloruro de cetilpiridinio 554 g de aceite de soja	3,2:1 (bismuto 1% en agua)

Las composiciones enumeradas anteriormente son solamente ejemplares y los expertos en la materia podrán alterar las cantidades de los componentes para llegar a una composición de nanoemulsión adecuada para los fines de la presente invención. Los expertos en la materia entenderán que la relación de fase oleosa y agua así como el vehículo de aceite individual, CPC tensioactivo y tampón de fosfato orgánico, componentes de cada composición, pueden variar.

Aunque ciertas composiciones que comprenden BCTP tienen una relación de agua y aceite de 4:1, se entiende que el BCTP puede formularse para tener más o menos de una fase acuosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, hay 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más partes de la fase acuosa por cada parte de la fase oleosa. Lo mismo sucede para la formulación de W<sub>80</sub>8P. De forma similar, la relación de Tri(N-butil)fosfato:TRITON X-100:aceite de soja también puede variarse.

Aunque la Tabla 1 enumera cantidades específicas de glicerol monooleato, polisorbato 60, GENEROL 122, cloruro de cetilpiridinio y aceite vehículo para W<sub>80</sub>8P, estas son meramente ejemplares. Puede formularse una emulsión que tiene las propiedades de W<sub>80</sub>8P que tiene diferentes concentraciones de cada uno de estos componentes o de hecho diferentes componentes que cumplirán la misma función. Por ejemplo, la emulsión puede tener entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 g de glicerol monooleato en la fase oleosa inicial. En otras realizaciones, la emulsión puede tener entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 g de polisorbato 60 en la fase oleosa inicial. En otra realización más, la composición puede comprender entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 g de un esteroide GENEROL en la fase oleosa inicial.

La estructura de las nanoemulsiones de ciertas realizaciones de las emulsiones de la presente invención puede desempeñar un papel en su actividad biocida así como contribuir a la no toxicidad de estas emulsiones. Por ejemplo, el componente activo BCTP, TRITON-X100 muestra menos actividad biocida contra virus a concentraciones equivalentes a BCTP 11%. Añadir la fase oleosa al detergente y disolvente reduce notablemente la toxicidad de estos agentes en cultivo tisular a las mismas concentraciones. Sin quedar ligado a ninguna teoría (no es necesario un entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención, y la presente invención no se limita a ningún mecanismo particular), se sugiere que la nanoemulsión potencia la interacción de sus componentes con los patógenos facilitando de este modo la inactivación del patógeno y reduciendo la toxicidad de los componentes individuales. Debería observarse que cuando todos los componentes de BCTP se combinan en una composición pero no están en una estructura de nanoemulsión, la mezcla no es tan eficaz como un antimicrobiano como cuando los componentes están en una estructura de nanoemulsión.

Se presentan posteriormente numerosas realizaciones adicionales presentadas en clases de formulaciones con composiciones similares. Se proporciona el efecto de varias de estas composiciones como materiales antipatógenos en la Figura 31. Las siguientes composiciones enumeran diversas relaciones y mezclas de componentes activos. Un experto en la materia apreciará que las formulaciones enumeradas posteriormente son ejemplares y que formulaciones adicionales que comprenden intervalos de porcentajes similares de los componentes enumerados están dentro del alcance de la presente invención.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la formulación de la invención comprende de aproximadamente 3 a 8% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de cloruro de cetilpiridinio (CPC), aproximadamente del 60 al 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja), aproximadamente del 15 al 25% en volumen de fase acuosa (por ejemplo, DiH<sub>2</sub>O o PBS), y en algunas formulaciones menos de aproximadamente el 1% en volumen de NaOH 1 N. Algunas de estas realizaciones comprenden PBS. Se contempla que la adición de NaOH 1 N y/o PBS en algunas de estas realizaciones, permite al usuario controlar provechosamente el pH de las formulaciones, de modo que se consiguen intervalos de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0, y más preferentemente de aproximadamente 7,1 a 8,5. Por ejemplo, una realización de la presente invención comprende aproximadamente 3% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 24% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Y3EC). Otra realización similar comprende aproximadamente 3,5% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol y aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 23,5% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Y3.5EC). Otra realización más comprende aproximadamente 3% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 0,067% en volumen de NaOH 1 N, de modo que el pH de la formulación es de aproximadamente 7,1, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 23,93% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Y3EC pH 7,1). Otra realización más comprende aproximadamente 3% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 0,67% en volumen de NaOH 1 N, de modo que el pH de la formulación es aproximadamente 8,5, y aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 23,33% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Y3EC pH 8,5). Otra realización similar comprende aproximadamente 4% de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% de CPC, y aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 23% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Y4EC). En otra realización más, la formulación comprende aproximadamente 8% de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% de etanol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, y aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 19% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado

en el presente documento Y8EC). Una realización adicional comprende aproximadamente 8% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 19% en volumen de PBS 1x (designado en el presente documento Y8EC PBS).

- 5 En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8% en volumen de etanol, y aproximadamente 1% en volumen de CPC, y aproximadamente 64% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja), y aproximadamente 27% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS) (designado en el presente documento EC).

- 10 En la presente invención, algunas realizaciones comprenden de aproximadamente 8% en volumen de dodecil sulfato sódico (SDS), aproximadamente 8% en volumen de tributil fosfato (TBP) y aproximadamente 64% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja) y aproximadamente 20% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS) (designado en el presente documento S8P).

- 15 En ciertas realizaciones de la presente invención, la formulación de la invención comprende de aproximadamente 1 a 2% en volumen de TRITON X-100, de aproximadamente 1 a 2% en volumen de TYLOXAPOL, de aproximadamente 7 a 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de cloruro de cetilpiridinio (CPC), de aproximadamente 64 a 57,6% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja) y aproximadamente 23% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS). Adicionalmente, algunas de estas formulaciones comprenden además L-alanina/inosina aproximadamente 5 mM y cloruro de amonio aproximadamente 10 mM. Algunas de estas formulaciones comprenden PBS. Se contempla que la adición de PBS en algunas de estas realizaciones, permite al
- 20 usuario controlar provechosamente el pH de las formulaciones. Por ejemplo, una realización de la presente invención comprende aproximadamente 2% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 2% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 23% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  de fase acuosa. En otra realización, la formulación comprende aproximadamente 1,8% en volumen de TRITON X-100,
- 25 aproximadamente 1,8% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2% en volumen de etanol, aproximadamente 0,9% en volumen de CPC, L-alanina/inosina aproximadamente 5 mM, y cloruro de amonio aproximadamente 10 mM, aproximadamente 57,6% en volumen de aceite de soja y el resto de PBS 1x (designado en el presente documento X2Y2EC/GE 90%).

- 30 En realizaciones alternativas de la presente invención, las formulaciones comprenden de aproximadamente 5% en volumen de TWEEN 80, de aproximadamente 8% en volumen de etanol, de aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja) y aproximadamente 22% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento  $W_{80}5\text{EC}$ ).

- 35 En otras realizaciones más de la presente invención, las formulaciones comprenden de aproximadamente 5% en volumen de TWEEN 20, de aproximadamente 8% en volumen de etanol, de aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja) y aproximadamente 22% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento  $W_{20}5\text{EC}$ ).

- 40 En otras realizaciones más de la presente invención, las formulaciones comprenden de aproximadamente 2 a 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 60 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja o de oliva) y aproximadamente 15 a 25% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS). Por ejemplo, la presente invención contempla formulaciones que comprenden aproximadamente 2% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 26% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X2E). En otras realizaciones similares, las formulaciones comprenden
- 45 aproximadamente 3% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 25% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X3E). En otras realizaciones más, las formulaciones comprenden aproximadamente 4% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 24% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X4E). En otras realizaciones más, las formulaciones comprenden aproximadamente 5% en volumen de TRITON X-100,
- 50 aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 23% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X5E). Otra realización de la presente invención comprende aproximadamente 6% en volumen de TRITONX-100, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 22% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X6E). En más realizaciones adicionales de la presente invención, las
- 55 formulaciones comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 20% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8E). En más realizaciones adicionales de la presente invención, las formulaciones comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de oliva y aproximadamente 20% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$
- 60 (designado en el presente documento X8E O). En otra realización más comprende 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente

64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 19% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8EC).

En realizaciones alternativas de la presente invención, las formulaciones comprenden de aproximadamente 1 a 2% en volumen de TRITON X-100, de aproximadamente 1 a 2% en volumen de TYLOXAPOL, de aproximadamente 6 a 8% en volumen de TBP, de aproximadamente 0,5 a 1,0% en volumen de CPC, de aproximadamente 60 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, de soja), y de aproximadamente 1 a 35% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS). Adicionalmente, algunas de estas formulaciones pueden comprender de aproximadamente 1 a 5% en volumen de caldo de soja de tripticasa, de aproximadamente 0,5 a 1,5% en volumen de extracto de levadura, L-alanina/inosina aproximadamente 5 mM, cloruro de amonio aproximadamente 10 mM y de aproximadamente 20 a 40% en volumen de fórmula infantil líquida. En algunas de las realizaciones que comprenden fórmula infantil líquida, la fórmula comprende un hidrolizado de caseína (por ejemplo, Neutramigen, o Progestimil, y similares). En algunas de estas realizaciones, las formulaciones de la invención comprenden además de aproximadamente 0,1 a 1,0% en volumen de tiosulfato sódico, y de aproximadamente 0,1 a 1,0% en volumen de citrato sódico. Otras realizaciones similares que comprenden estos componentes básicos emplean solución salina tamponada con fosfato (PBS) como la fase acuosa. Por ejemplo, una realización comprende aproximadamente 2% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 2% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 23% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X2Y2EC). En otras realizaciones más, la fórmula de la invención comprende aproximadamente 2% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 2% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 0,9% en volumen de tiosulfato sódico, aproximadamente 0,1% en volumen de citrato sódico, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 22% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X2Y2PC STS1). En otra realización similar, las formulaciones comprenden aproximadamente 1,7% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 1,7% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 6,8% en volumen de TBP, aproximadamente 0,85% de CPC, aproximadamente 29,2% de NEUTRAMIGEN, aproximadamente 54,4% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 4,9% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X2Y2PC/bebé 85%). En otra realización más de la presente invención, las formulaciones comprenden aproximadamente 1,8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 1,8% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2% en volumen de TBP, aproximadamente 0,9% en volumen de CPC, L-alanina/inosina aproximadamente 5 mM, cloruro de amonio aproximadamente 10 mM, aproximadamente 57,6% en volumen de aceite de soja y el resto del % en volumen de PBS 0,1 x (designado en el presente documento X2Y2PC/GE 90%). En otra realización más, las formulaciones comprenden aproximadamente 1,8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 1,8% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2% en volumen de TBP, aproximadamente 0,9% en volumen de CPC, aproximadamente 0,9% en volumen de CPC, y aproximadamente 3% en volumen de caldo de soja de tripticasa, aproximadamente 57,6% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 27,7% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X2Y2PC/TSB 90%). En otra realización de la presente invención, las formulaciones comprenden aproximadamente 1,8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 1,8% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 7,2% en volumen de TBP, aproximadamente 0,9% en volumen de CPC, aproximadamente 1% en volumen de extracto de levadura, aproximadamente 57,6% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 29,7% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X2Y2PC/YE 90%).

En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 3% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de TBP, y aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 60 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja o de oliva) y aproximadamente 15 a 30% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS). En una realización particular de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 3% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de TBP y aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 24% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento Y3PC).

En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden de aproximadamente 4 a 8% en volumen de TRITON X-100, de aproximadamente 5 a 8% en volumen de TBP, de aproximadamente 30 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja o de oliva) y aproximadamente 0 a 30% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS). Adicionalmente, algunas de estas realizaciones comprenden además aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 1% en volumen de cloruro de benzalconio, aproximadamente 1% en volumen de bromuro de cetilpiridinio, aproximadamente 1% en volumen de bromuro de cetildimetiltilamonio, EDTA 500  $\mu\text{M}$ , cloruro de amonio aproximadamente 10 mM, inosina aproximadamente 5 mM y L-alanina aproximadamente 5 mM. Por ejemplo, en algunas de estas realizaciones, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 20% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8P). En otra realización de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 19% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8PC). En otra realización más, las formulaciones comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 50% en volumen de aceite de soja, y

aproximadamente 33% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento ATB-X1001). En otra realización más, las formulaciones comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 2% en volumen de CPC, aproximadamente 50% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 32% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento ATB-X002). Otra realización de la presente invención comprende aproximadamente 4% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 4% en volumen de TBP, aproximadamente 0,5% en volumen de CPC, aproximadamente 32% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 59,5% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8PC 50%). Otra realización relacionada más comprende aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 0,5% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 19,5% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8PC<sub>1/2</sub>). En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 2% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 18% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8PC2). En otras realizaciones, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% de TBP, aproximadamente 1% de cloruro de benzalconio, aproximadamente 50% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 33% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8P BC). En una realización alternativa de la presente invención, la formulación comprende aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% en volumen de bromuro de cetilpiridinio, aproximadamente 50% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 33% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8P CPB). En otra realización ejemplar de la presente invención, las formulaciones comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% en volumen de bromuro de cetildimetiltilamonio, aproximadamente 50% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 33% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8P CTAB). En más realizaciones adicionales, la presente invención comprende aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% en volumen de CPC, EDTA aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 15,8% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8PC EDTA). Realizaciones similares adicionales comprenden 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% en volumen de CPC, cloruro de amonio aproximadamente 10 mM, inosina aproximadamente 5 mM, L-alanina aproximadamente 5 mM, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 19% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS (designado en el presente documento X8PC GE<sub>1x</sub>). En otra realización de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden además aproximadamente 5% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 5% de TBP, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 40% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 49% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X5P<sub>5</sub> C).

En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 2% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 6% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 20% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X2Y6E).

En una realización adicional de la presente invención, las formulaciones comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100 y aproximadamente 8% en volumen de glicerol, aproximadamente 60 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja o de oliva), y aproximadamente 15 a 25% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS). Ciertas realizaciones relacionadas comprenden además aproximadamente 1% en volumen de ácido ascórbico L. Por ejemplo, una realización particular comprende aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de glicerol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 20% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8G). En otra realización más, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 8% en volumen de glicerol, aproximadamente 1% en volumen de ácido ascórbico L, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 19% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8GV<sub>c</sub>).

En más realizaciones adicionales, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, de aproximadamente 0,5 a 0,8% en volumen de TWEEN 60, de aproximadamente 0,5 a 2,0% en volumen de CPC, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 60 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja o de oliva) y aproximadamente 15 a 25% en volumen de fase acuosa (por ejemplo,  $\text{DiH}_2\text{O}$  o PBS). Por ejemplo, en una realización particular las formulaciones comprenden aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 0,70% en volumen de TWEEN 60, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 18,3% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento X8W60PC<sub>1</sub>). Otra realización relacionada comprende aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 0,71% en volumen de TWEEN 60, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 18,29% en volumen de  $\text{DiH}_2\text{O}$  (designado en el presente documento W60<sub>0,7</sub> X8PC). En otras realizaciones más, las formulaciones de la invención comprenden de aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 0,7% en volumen de TWEEN 60,

- aproximadamente 0,5% en volumen de CPC, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 64 a 70% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 18,8% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento X8WGOPC<sub>2</sub>). En otras realizaciones más, la presente invención comprende aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente 0,71% en volumen de TWEEN 60, aproximadamente 2% en volumen de CPC, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 17,3% en volumen de DiH<sub>2</sub>O. En otra realización de la presente invención, las formulaciones comprenden aproximadamente 0,71% de TWEEN 60, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 25,29% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento W60<sub>0,7</sub> PC).
- En otra realización de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 2% en volumen de dioctil sulfosuccinato, bien aproximadamente 8% en volumen de glicerol o bien aproximadamente 8% en volumen de TBP, además de aproximadamente 60 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja o de oliva) y aproximadamente 20 a 30% en volumen de fase acuosa (por ejemplo, DiH<sub>2</sub>O o PBS). Por ejemplo, una realización de la presente invención comprende aproximadamente 2% en volumen de dioctil sulfosuccinato, aproximadamente 8% en volumen de glicerol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 26% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento D2G). En otra realización relacionada, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 2% en volumen de dioctil sulfosuccinato y aproximadamente 8% en volumen de TBP, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 26% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento D2P).
- En otras realizaciones más de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden de aproximadamente 8 a 10% en volumen de glicerol y aproximadamente 1 a 10% en volumen de CPC, aproximadamente 50 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja o de oliva) y aproximadamente 15 a 30% en volumen de fase acuosa (por ejemplo, DiH<sub>2</sub>O o PBS). Adicionalmente, en algunas de estas realizaciones, las composiciones comprenden además aproximadamente 1% en volumen de ácido ascórbico-L. Por ejemplo, una realización particular comprende aproximadamente 8% en volumen de glicerol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 27% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento GC). Una realización relacionada adicional comprende aproximadamente 10% en volumen de glicerol, aproximadamente 10% en volumen de CPC, aproximadamente 60% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 20% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento GC10). En otra realización más de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 10% en volumen de glicerol, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 1% en volumen de ácido ascórbico L, aproximadamente 64% en volumen de soja o aceite, y aproximadamente 24% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento GCV).
- En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8 a 10% en volumen de glicerol, aproximadamente 8 a 10% en volumen de SDS, aproximadamente 50 a 70% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja o de oliva) y aproximadamente 15 a 30% en volumen de fase acuosa (por ejemplo, DiH<sub>2</sub>O o PBS). Adicionalmente, en algunas de estas realizaciones, las composiciones comprenden además aproximadamente 1% en volumen de lecitina, y aproximadamente 1% en volumen de metil éster de ácido p-hidroxibenzoico. Las realizaciones ejemplares de dichas formulaciones comprenden aproximadamente 8% en volumen de SDS, 8% en volumen de glicerol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 20% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento S8G). Una formulación relacionada comprende aproximadamente 8% en volumen de glicerol, aproximadamente 8% en volumen de SDS, aproximadamente 1% en volumen de lecitina, aproximadamente 1% en volumen de metil éster de ácido p-hidroxibenzoico, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 18% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento S8GL1B1).
- En otra realización más de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 4% en volumen de TWEEN 80, aproximadamente 4% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 8% en volumen de etanol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 19% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento W<sub>80</sub> 4Y4EC).
- En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 0,01% en volumen de CPC, aproximadamente 0,08% en volumen de TYLOXAPOL, aproximadamente 10% en volumen de etanol, aproximadamente 70% en volumen de aceite de soja, y aproximadamente 19,91% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Y.08EC.01).
- En otra realización más de la presente invención, las formulaciones de la invención comprenden aproximadamente 8% en volumen de lauril sulfato sódico, y aproximadamente 8% en volumen de glicerol, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 20% en volumen de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento SLS8G).

### C. Formulaciones adicionales

Las formulaciones específicas descritas anteriormente son simplemente ejemplos para ilustrar la diversidad de composiciones que encuentran uso en la presente invención. La presente invención contempla que muchas variaciones de la formulación anterior, así como nanoemulsiones adicionales, encuentran uso en los procedimientos de la presente invención. Para determinar si una emulsión candidata es adecuada para su uso con la presente invención, se analizan tres criterios. Usando los procedimientos y patrones descritos en el presente documento, las emulsiones candidatas pueden ensayarse fácilmente para determinar si son adecuadas. En primer lugar, los ingredientes deseados se preparan usando los procedimientos descritos en el presente documento, para determinar si puede formarse una emulsión. Si no puede formarse una emulsión, el candidato se rechaza. Por ejemplo, una composición candidata compuesta de tiosulfato sódico al 4,5%, citrato sódico al 0,5%, n-butanol al 10%, aceite de soja al 64% y DiH<sub>2</sub>O al 21% no formó una emulsión.

En segundo lugar, la emulsión candidata debería formar una emulsión estable. Una emulsión es estable si permanece en forma de emulsión durante un periodo suficiente para permitir su uso pretendido. Por ejemplo, para emulsiones que deban almacenarse, enviarse, etc., pueden desearse que la composición permanezca en forma de emulsión durante meses a años. Las emulsiones típicas que son relativamente inestables, perderán su forma en un periodo de un día. Por ejemplo, una composición candidata compuesta de 8% de 1-butanol, 5% de Tween 10, 1% de CPC, 64% de aceite de soja y 22% de DiH<sub>2</sub>O no formó una emulsión estable. Se mostró que las siguientes emulsiones candidatas eran estables usando los procedimientos descritos en el presente documento: 0,08% de TRITON X-100, 0,08% de glicerol, 0,01% de cloruro de cetilpiridinio, 99% de mantequilla, y 0,83% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento mantequilla X8GC 1%); 0,8% de TRITON X-100, 0,8% de glicerol, 0,1% de cloruro de cetilpiridinio, 6,4% de aceite de soja, 1,9% de DiH<sub>2</sub>O y 90% de mantequilla (designado en el presente documento mantequilla X8GC 10%); 2% de W<sub>20</sub>5EC, 1% de Natrosol 250L NF y 97% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento GEL W<sub>20</sub>5EC L 2%); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite mineral de viscosidad 70 y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento aceite mineral W<sub>20</sub>5EC 70); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite mineral de viscosidad 350 y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento aceite mineral W<sub>20</sub>5EC 350).

En tercer lugar, la emulsión candidata debería tener eficacia para su uso pretendido. Por ejemplo, una emulsión antibacteriana debería destruir o incapacitar bacterias a un nivel detectable. Como se muestra en el presente documento, ciertas emulsiones de la presente invención tienen eficacia contra microorganismos específicos, pero no contra otros. Usando los procedimientos descritos en el presente documento, se puede determinar la idoneidad de una emulsión candidata particular contra el microorganismo deseado. Generalmente, esto implica exponer el microorganismo a la emulsión durante uno o más periodos de tiempo en un experimento paralelo con las muestras de control apropiadas (por ejemplo, un control negativo tal como agua) y determinar si, y en qué grado, la emulsión destruye o incapacita al microorganismo. Por ejemplo, se mostró que una composición candidata compuesta de 1% de cloruro de amonio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite de soja y 22% de DiH<sub>2</sub>O no era una emulsión eficaz. Se mostró que las siguientes emulsiones candidatas eran eficaces usando los procedimientos descritos en el presente documento: 5% de Tween 20, 5% de cloruro de cetilpiridinio, 10% de glicerol, 64% de aceite de soja y 20% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento W<sub>20</sub>5GC5); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 10% de glicerol, 64% de aceite de soja y 20% de DiH<sub>2</sub>O (designada en el presente documento W<sub>20</sub>5GC); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite de oliva y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento aceite de oliva W<sub>20</sub>5EC); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite de linaza y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento aceite de linaza W<sub>20</sub>5EC); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite de maíz y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento aceite de maíz W<sub>20</sub>5EC); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite de coco y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento aceite de coco W<sub>20</sub>5EC); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite de semilla de algodón y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento aceite de semilla de algodón W<sub>20</sub>5EC); 8% de dextrosa, 5% de Tween 10, 1% de cloruro de cetilpiridinio, 64% de aceite de soja y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento dextrosa W<sub>20</sub>5C); 8% de PEG 200, 5% de Tween 10, 1% cloruro de cetilpiridinio, 64% de aceite de soja, y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento PEG 200 W<sub>20</sub>5C); 8% de metanol, 5% de Tween 10, 1% de cloruro de cetilpiridinio, 64% de aceite de soja y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento metanol W<sub>20</sub>5C); 8% de PEG 1000, 5% de Tween 10, 1% de cloruro de cetilpiridinio, 64% de aceite de soja y 22% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento PEG 1000 W<sub>20</sub>5C); 2% de W<sub>20</sub>5EC, 2% de Natrosol 250H NF y 96% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Natrosol 2 W<sub>20</sub>5EC 2%, también llamado GEL W<sub>20</sub>5EC 2%); 2% de W<sub>20</sub>5EC, 1% de Natrosol 250H NF, y 97% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Natrosol 1 W<sub>20</sub> 5EC 2%); 2% de W<sub>20</sub>5EC, 3% de Natrosol 250H NF y 95% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Natrosol 3 W<sub>20</sub>5EC 2%); 2% de W<sub>20</sub>5EC, 0,5% de Natrosol 250H NF y 97,5% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Natrosol 0,5 W<sub>20</sub>5EC 2%); 2% de W<sub>20</sub>5EC, 2% de Metocel A y 96% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Metocel A W<sub>20</sub>5EC 2%); 2% de W<sub>20</sub>5EC, 2% de Metocel K y 96% de DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Metocel K W<sub>20</sub>5EC 2%); 2% de Natrosol, 0,1% de X8PC, PBS 0,1 x, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM y DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento X8PC/GE 0,1% + Natrosol 2%); 2% de Natrosol, 0,8% de TRITON X-100, 0,8% de tributil fosfato, 6,4% de aceite de soja, 0,1% de cloruro de cetilpiridinio, PBS 0,1 x, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM y DiH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento X8PC/GE 10% + Natrosol 2%); 1% de cloruro de



cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de manteca y 22% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento manteca W<sub>20</sub>5EC); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de etanol, 64% de aceite mineral y 22% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento aceite mineral W<sub>20</sub>5EC); 0,1% de cloruro de cetilpiridinio, 2% de nerolidol, 5% de Tween 20, 10% de etanol, 64% de aceite de soja, y 18,9% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento W<sub>20</sub>5EC<sub>0,1</sub>N); 0,1% de cloruro de cetilpiridinio, 2% de farnesol, 5% de Tween 20, 10% de etanol, 64% de aceite de soja y 18,9% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento W<sub>20</sub>5EC<sub>0,1</sub> F); 0,1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 10% de etanol, 64% de aceite de soja y 20,9% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento W<sub>20</sub>5EC<sub>0,1</sub>); 10% de cloruro de cetilpiridinio, 8% de tributil fosfato, 8% de TRITON X-100, 54% de aceite de soja y 20% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento X8PC<sub>10</sub>); 5% de cloruro de cetilpiridinio, 8% de TRITON X-100, 8% de tributil fosfato, 59% de aceite de soja y 20% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento X8PC<sub>5</sub>); 0,02% de cloruro de cetilpiridinio, 0,1% de Tween 20, 10% de etanol, 70% de aceite de soja y 19,88% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento W<sub>20</sub>0.1EC<sub>0,02</sub>); 1% de cloruro de cetilpiridinio, 5% de Tween 20, 8% de glicerol, 64% de Mobil 1 y 22% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento Mobil 1 W<sub>20</sub>5GC); 7,2% de TRITON X-100, 7,2% de tributil fosfato, 0,9% de cloruro de cetilpiridinio, 57,6% de aceite de soja, PBS 0,1 x, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM y 25,87% de diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento X8PC/GE 90%); 7,2% de Triton X-100, 7,2% de tributil fosfato, 0,9% de cloruro de cetilpiridinio, 57,6% de aceite de soja, 1% de EDTA, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, PBS 0,1x y diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento X8PC/GE EDTA 90%); y 7,2% de Triton X-100, 7,2% de tributil fosfato, 0,9% de cloruro de cetilpiridinio, 57,6% de aceite de soja, 1% de tiosulfato sódico, L-alanina 5 mM, inosina 5 mM, cloruro de amonio 10 mM, PBS 0,1x y diH<sub>2</sub>O (designado en el presente documento X8PC/GE STS 90%).

### III. Propiedades y actividades

Las composiciones específicas de la presente invención poseen una serie de actividades y propiedades beneficiosas. Se exponen a continuación varias de las propiedades y actividades beneficiosas ejemplares: A) actividad microbicida y microbiostática; B) actividad esporicida y esporostática; C) actividad virucida y virostática; D) actividad fungicida y fungistática; y E) efectos *in vivo*. Adicionalmente, la Figura 31A-C proporciona propiedades de ciertas formulaciones ejemplares de la presente invención.

#### A. Actividad microbicida y microbiostática

Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para inactivar rápidamente bacterias. En ciertas realizaciones, las composiciones son particularmente eficaces en la inactivación de bacterias Gram positivas. En realizaciones preferidas, la inactivación de bacterias se produce después de aproximadamente cinco a diez minutos. Por lo tanto, las bacterias pueden ponerse en contacto con una emulsión de acuerdo con la presente invención y se inactivarán de una manera rápida y eficaz. Se espera que el periodo de tiempo entre la puesta en contacto e inactivación puede ser tan corto como de 5-10 minutos o menos cuando la bacteria se expone directamente a la emulsión. Sin embargo, se entiende que cuando las emulsiones de la presente invención se emplean en un contexto terapéutico y se aplican por vía sistémica, la inactivación puede producirse durante un periodo de tiempo más largo incluyendo, pero sin limitación 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 minutos después de la aplicación. Además, en realizaciones adicionales, puede ser que la inactivación tarde dos, tres, cuatro, cinco o seis horas en producirse.

En otras realizaciones, las composiciones y procedimientos de la invención también pueden inactivar rápidamente ciertas bacterias Gram negativas. En algunas realizaciones, las emulsiones que inactivan bacterias se premezclan con un compuesto que aumenta la interacción de la emulsión por la pared celular. El uso de estos potenciadores en las composiciones de la presente invención se analiza posteriormente en el presente documento. Debería observarse que ciertas emulsiones especialmente las que comprenden potenciadores son eficaces contra ciertas bacterias Gram positivas y negativas y pueden administrarse por vía oral en la que entrarán en contacto con bacterias del intestino necesarias.

En realizaciones específicas, la presente invención ha mostrado que las emulsiones de la presente invención tienen actividad biocida selectiva potente con mínima toxicidad contra bacterias vegetativas. BCTP fue altamente eficaz contra *B. cereus*, *B. circulans* y *B. megaterium*, *C. perfringens*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *V. cholerae* clásica y Eltor (Figura 26). Esta inactivación comienza inmediatamente tras el contacto y se completa en un periodo de 15 a 30 minutos para la mayoría de los microorganismos susceptibles.

La Figura 31A muestra la eficacia de varias nanoemulsiones ejemplares de la presente invención contra *E. coli*.

#### B. Actividad esporicida y esporostática

En ciertas realizaciones específicas, la presente invención ha demostrado que las emulsiones de la presente invención tienen actividad esporicida. Sin quedar ligado a ninguna teoría (no es necesario un entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención, y la presente invención no se limita a ningún mecanismo particular), se propone que la capacidad esporicida de estas emulsiones se produce mediante inicio de la germinación sin reversión completa a la forma vegetativa dejando la espora susceptible a alteración por las emulsiones. El inicio de la germinación podría medirse por la acción de la emulsión o sus componentes.

Los resultados de estudios de microscopía electrónica muestran alteración del revestimiento de espora y corteza con disgregación de los contenidos del núcleo después del tratamiento con BCTP. La actividad esporicida parece estar mediada por los componentes tanto TRITON X-100 como tri-n-butil fosfato puesto que las nanoemulsiones que carecen de uno de los componentes están inactivas *in vivo*. Esta acción única de las emulsiones, que es similar en eficacia a lejía al 1%, es interesante porque las esporas de *Bacillus* generalmente son resistentes a la mayoría de los desinfectantes incluyendo muchos detergentes usados habitualmente (Russell, Clin. Micro. 3, 99 [1990]).

La presente invención demuestra que la mezcla de BCTP con esporas de *B. cereus* antes de la inyección en ratones evitó el efecto patológico de *B. cereus*. Además, la presente invención muestra que el tratamiento con BCTP de heridas simuladas contaminadas con esporas de *B. cereus* redujo notablemente el riesgo de infección y mortalidad en ratones. Los animales de control, que se inyectaron con BCTP solo diluido 1:10, no mostraron ningún efecto inflamatorio lo que demuestra que BCTP no tiene toxicidad cutánea en ratones. Estos resultados sugieren que el tratamiento inmediato de esporas antes de o después de la exposición puede reducir eficazmente la gravedad del daño tisular de la infección cutánea experimental.

Otros experimentos realizados durante el desarrollo de la presente invención compararon los efectos de BCTP y otras emulsiones derivadas de BCTP para inactivar diferentes esporas de *Bacillus*. BCTP diluido hasta 1:1000 (v/v) inactivó más del 90% de esporas de *B. anthracis* en cuatro horas, y también fue esporicida contra otras tres especies de *Bacillus* mediante la aparente alteración del revestimiento de la espora. X<sub>8</sub>W<sub>60</sub> PC diluido 1:1000 tuvo más actividad esporicida contra *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. subtilis* y tuvo una aparición de la acción en menos de 30 minutos. En ratones, la mezcla de BCTP con *B. cereus* antes de inyección subcutánea o irrigación de heridas con BCTP 1 hora después de la inoculación de esporas dio como resultado más del 98% de reducción del tamaño de la lesión cutánea. La mortalidad se redujo 4 veces en el último experimento. Las presentes composiciones son estables, se dispersan fácilmente, no son irritantes y no son tóxicas en comparación con los otros agentes esporicidas disponibles.

Las emulsiones de aceite en agua inactivadoras de bacterias usadas en los procedimientos de la presente invención pueden usarse para inactivar una diversidad de bacterias y esporas bacterianas tras el contacto. Por ejemplo, las emulsiones desveladas en el presente documento pueden usarse para inactivar *Bacillus* incluyendo *B. cereus*, *B. circulans* y *B. megaterium*, incluyendo también *Clostridium* (por ejemplo, *C. botulinum* y *C. tetani*). Los procedimientos de la presente invención pueden ser particularmente útiles en la inactivación de ciertos agentes de guerra biológica (por ejemplo, *B. anthracis*). Además, las formulaciones de la presente invención también encuentran uso al combatir *C. perfringens*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *V. cholerae* clásica y Eltor (Figura 26).

BCTP contiene TRITON X-100 mientras que SS y W<sub>80</sub>8P contienen TWEEN 60 y NN contenía tensioactivo nonoxinol-9. Cada uno es un tensioactivo no iónico, pero difiere en su química y características biológicas. El nonoxinol-9 tiene fuerte actividad espermicida y se usa ampliamente como un componente de productos anticonceptivos suministrados por vía vaginal (Lee, 1996). Se ha reivindicado que tiene efecto virucida contra virus con envoltura (Hermonat y col., 1992; Zeitlin. y col., 1997). Sin embargo, no se ha mostrado que nonoxinol-9 sea eficaz contra virus sin envoltura (Hermonat y col., 1992).

La Figura 31B muestra la eficacia de varias nanoemulsiones ejemplares de la presente invención contra esporas de *B. globigii*.

### C. Actividad virucida y virostática

En realizaciones adicionales, se demostró que las composiciones de nanoemulsión de la presente invención tienen propiedades antivirales. El efecto de estas emulsiones en los agentes virales se controló usando ensayo de reducción de placas (PRA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) celular, ensayo de P-galactosidasa y microscopía electrónica (ME) y la toxicidad celular de las preparaciones lipídicas se evaluó usando un ensayo de tinción con (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) (Mosmann 1983).

Hubo una reducción notable de la infecciosidad por gripe A de células MDCK como se midió por ELISA celular con posterior confirmación mediante PRA. BCTP y SS a dilución 1:10 redujo la infecciosidad por virus más del 95%. Otras dos emulsiones mostraron solamente efectos intermedios en el virus reduciendo la infecciosidad aproximadamente el 40% a la dilución 1:10. BCTP fue la preparación más potente y mostró efecto virucida no reducido incluso a dilución 1:100. Los estudios cinéticos mostraron que 5 minutos de incubación de virus con BCTP a dilución 1:10 anuló completamente su infecciosidad. TRITON X-100, un compuesto activo de BCTP, a dilución de 1:5000 solo inhibió parcialmente la infecciosidad del virus en comparación con BCTP, lo que indica que la nanoemulsión en sí misma contribuye a la eficacia antiviral. Para examinar adicionalmente las propiedades antivirales de BCTP, se investigó su acción sobre virus sin envoltura. El tratamiento con BCTP no afectó a la replicación de construcción de adenovirus lacZ en células 293 como se midió usando ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. Cuando se examinó con ME, el virus de gripe A estaba completamente alterado después de incubación con BCTP mientras que el adenovirus permaneció intacto.

Además, la preincubación del virus con BCTP 10% y 1% en PBS elimina completamente los virus de herpes, Sendai, sindbis y vaccinia como se evalúa por ensayos de reducción de placas (Figura 27). Los análisis de ciclo temporal mostraron que la aparición de inactivación era rápida y completa en un periodo de 5 minutos de incubación con BCTP 10% y en un periodo de 30 minutos con BCTP 1%. Los adenovirus tratados con diluciones diferentes de BCTP no mostraron reducción de la infecciosidad.

La eficacia de ciertas composiciones basadas en BCTP contra diversos ataques virales y su toxicidad mínima para membranas mucosas demuestra su potencial como desinfectantes eficaces y agentes para la prevención de enfermedades que resultan de infección con virus con envoltura.

La Figura 31C muestra la eficacia de varias nanoemulsiones ejemplares de la presente invención contra gripe A.

#### 10 D. Actividad fungicida y fungistática

Otra propiedad más de las nanoemulsiones de la presente invención es que poseen actividad antifúngica. Los agentes habituales de infecciones fúngicas incluyen diversas especies de los géneros *Candida* y *Aspergillus*, y tipos de los mismos, así como otros. Aunque las infecciones de hongos externos pueden ser relativamente menores, las infecciones fúngicas sistémicas pueden dar lugar a consecuencias médicas graves. Hay una incidencia creciente de infecciones fúngicas en seres humanos, atribuible en parte a un número creciente de pacientes que tienen sistemas inmunitarios deteriorados. La enfermedad fúngica, particularmente cuando es sistémica, puede presentar peligro para la vida en pacientes que tengan un sistema inmunitario deteriorado.

Los experimentos realizados durante el desarrollo de la presente invención han mostrado que BCTP 1% tiene una actividad fungistática mayor del 92% cuando se aplica a *Candida albicans*. Se cultivó *Candida* a 37 °C durante una noche. Las células se lavaron después y se contaron usando un hemacitómetro. Se mezcló una cantidad conocida de células con diferentes concentraciones de BCTP y se incubó durante 24 horas. Después se cultivaron las *Candida* en agar de dextrosa, se incubaron durante una noche y se contaron las colonias. El efecto fungistático del BCTP se determinó como sigue:

$$\text{Efecto fungistático (FSE)} = 1 - \frac{\text{Nº de células tratadas} - \text{Nº inicial de células}}{\text{Nº de células no tratadas} - \text{Nº inicial de células}} \times 100$$

Un experto en la materia podrá tomar las formulaciones de la presente invención y colocarlas en formulaciones apropiadas para el tratamiento de enfermedad fúngica. Las nanoemulsiones de la presente invención encuentran uso al combatir infecciones tales como pie de atleta, candidiasis y otras infecciones fúngicas agudas o sistémicas.

#### E. Efectos *in vivo*

Los estudios en animales demostraron el efecto protector y terapéutico de las presentes composiciones y procedimientos. La infección por *Bacillus cereus* en animales experimentales se ha usado previamente como un sistema modelo para el estudio de carbunco (Véase, por ejemplo, Burdon y Wende, J Infect. Diseases. 170 (2): 272 [1960]; Lamanna y Jones, J. Bact. 85:532 [1963]; y Burdon y col., J Infect. Diseases. 117:307 [1967]). El síndrome de enfermedad inducido en animales infectados de forma experimental con *B. cereus* es similar al carbunco (Drobniowski, Clin. microbio. Rev. 6:324 [1993]; y Fritz y col., Lab. Invest. 73:691 [1995]). Los experimentos realizados durante el desarrollo de la presente invención demostraron que la mezcla de BCTP con esporas de *B. cereus* antes de inyectar en ratones evitó el efecto patológico de *B. cereus*. Además, se demostró que el tratamiento con BCTP de heridas simuladas contaminadas con esporas de *B. cereus* redujo notablemente el riesgo de infección y mortalidad en ratones. Los animales de control, a los que se inyectó BCTP solo diluido 1:10, no mostraron ningún efecto inflamatorio lo que demuestra que BCTP no tiene toxicidad cutánea en ratones. Estos resultados sugieren que el tratamiento inmediato de esporas antes de o después de la exposición puede reducir eficazmente la gravedad del daño tisular de la infección cutánea experimental.

En un ejemplo particular, se emplearon cobayas como animales experimentales para el estudio de infección por *C. perfringens*. Se realizó una herida cutánea de 1,5 cm, se aplastó el músculo subyacente y se infectó con  $5 \times 10^7$  ufc de *C. perfringens* sin ningún tratamiento adicional. Se infectó a otro grupo con el mismo número de bacterias, 1 hora después se irrigó con solución salina o BCTP para simular la descontaminación después de la exposición. La irrigación de heridas infectadas de forma experimental con solución salina no dio como resultado ningún beneficio aparente. Sin embargo, la irrigación con BCTP de la herida infectada con *C. perfringens* mostró reducción notable del edema, reacción inflamatoria y necrosis. Como tales, se demostró que ciertas formulaciones de la presente invención pueden usarse para combatir una infección bacteriana.

Además, una inyección subcutánea de BCTP al 10% no provocó tensión en los animales experimentales y dio como resultado ausencia de daño tisular histológico general. Todas las ratas en el estudio de toxicidad oral mostraron aumento de peso durante el periodo del estudio. No se observaron señales clínicas adversas y todos los tejidos parecían dentro de los límites normales en examen general. Los cultivos bacterianos de las heces de animales

tratados no fueron significativamente diferentes de los de animales no tratados.

#### IV. Usos ejemplares

Se exponen a continuación varios usos ejemplares para las composiciones desveladas en el presente documento:

- 5 A) Compuestos farmacéuticos y terapéuticos; B) Descontaminación y esterilización; C) Preparación de alimentos; y  
D) Kits, así como una descripción de procedimientos y sistemas para la E) Modificación, preparación y suministro de las composiciones de la presente invención.

##### A. Compuestos farmacéuticos y terapéuticos

10 La presente invención contempla formulaciones que pueden emplearse en composiciones farmacéuticas y terapéuticas y aplicaciones adecuadas para combatir y/o tratar infecciones microbianas. Dichas composiciones pueden emplearse para reducir la infección, destruir microbios, inhibir el crecimiento microbiano o anular de otro modo los efectos deletéreos de la infección microbiana.

15 Para aplicaciones *in vivo*, las composiciones pueden administrarse en cualquier forma farmacéuticamente aceptable eficaz a animales de sangre caliente, incluyendo sujetos humanos y animales. Generalmente, esto implica preparar composiciones que están esencialmente sin pirógenos, así como otras impurezas que pueden ser perjudiciales para seres humanos o animales.

20 Los ejemplos particulares de formas farmacéuticamente aceptables incluyen pero sin limitación oral, nasal, bucal, rectal, vaginal, tópica o pulverización nasal o en cualquier otra forma eficaz para suministrar composiciones activas de la presente invención a un sitio de infección de microorganismos. En realizaciones preferidas, la vía de administración se diseña para obtener contacto directo de las composiciones con los microorganismos infecciosos. En otras realizaciones, la administración puede ser por inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Las composiciones también pueden administrarse a sujetos por vía parenteral o intraperitoneal. Dichas composiciones normalmente se administrarán como composiciones farmacéuticamente aceptables. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente farmacéuticamente aceptable convencional sea incompatible con las emulsiones de la presente invención, se contempla el uso de medios y agentes farmacéuticamente aceptables conocidos en estas realizaciones particulares. En realizaciones adicionales, también pueden incorporarse principios activos complementarios a las composiciones.

30 Para aplicaciones tópicas, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede tomar la forma de un líquido, crema, espuma, loción o gel, y puede comprender adicionalmente disolventes orgánicos, emulsionantes, agentes gelificantes, humectantes, estabilizadores, tensioactivos, agentes humectantes, conservantes, agentes de liberación temporalizada y cantidades menores de humectantes, agentes secuestrantes, colorantes, perfumes y otros componentes habitualmente empleados en composiciones farmacéuticas para administración tópica.

35 Las formas de comprimido y dosificación de las composiciones en las que se formulan las emulsiones para administración oral o tópica incluyen cápsulas líquidas, y supositorios. En formas de dosificación sólidas para administración oral, las composiciones pueden mezclarse con uno o más diluyentes sustancialmente inertes (por ejemplo, sacarosa, lactosa o almidón, y similares) y puede comprender adicionalmente agentes lubricantes, agentes tamponantes, revestimientos entéricos, y otros componentes bien conocidos por los expertos en la materia.

40 En otra realización de la invención, las composiciones de la invención pueden diseñarse específicamente para aplicaciones *in vitro*, tales como desinfección o esterilización de instrumentos y dispositivos médicos, lentes de contacto y similares, particularmente cuando se pretende que los dispositivos o lentes se usen en contacto con un paciente o usuario. Por ejemplo, las composiciones pueden usarse para limpiar y descontaminar instrumentos y suministros médicos y quirúrgicos antes de poner en contacto con un sujeto. Adicionalmente, las composiciones pueden usarse para ayudar de forma postoperatoria, o después de cualquier procedimiento invasivo, a minimizar la aparición de infecciones postoperatorias. En realizaciones especialmente preferidas, las composiciones se administran a sujetos con defensas inmunológicas deterioradas o ineficaces (por ejemplo, los ancianos y muy jóvenes, víctimas de quemadura y traumatismo y los infectados con VIH y similares). Para aplicaciones de este tipo, las composiciones pueden proporcionarse convenientemente en forma de un líquido, espuma, pasta o gel y pueden proporcionarse con emulsionantes, tensioactivos, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes, iones metálicos, antibióticos y otros componentes habitualmente hallados en composiciones de este tipo.

50 En otras realizaciones, las composiciones pueden impregnarse en materiales absorbentes, tales como suturas, vendas y gasas, o usarse para revestir la superficie de materiales de fase sólida, tales como grapas quirúrgicas, cremalleras y catéteres para suministrar las composiciones a un sitio para la prevención de infección microbiana. Otros sistemas de suministro de este tipo resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

55 En otra realización más, las composiciones pueden usarse en la industria de la atención sanitaria personal en desodorantes, jarabes, agentes del tratamiento de acné/dermatofito, tratamientos para halitosis, tratamientos para infecciones de levaduras vaginales, y similares. Las composiciones también pueden usarse para tratar otras infecciones microbianas internas y externas (por ejemplo, gripe, *H. simplex*, etc.). En estas aplicaciones, las emulsiones pueden formularse con vehículos terapéuticos como se ha descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, las composiciones y procedimientos antimicrobianos de la presente invención también incluyen una diversidad de terapias de combinación. Por ejemplo, con frecuencia los agentes antimicrobianos individuales son mucho menos eficaces en la inhibición de microbios que varios agentes empleados juntos entre sí. Este enfoque es con frecuencia ventajoso para evitar los problemas encontrados como resultado de resistencia a multifármacos. Esto es particularmente prevalente en bacterias que tienen transportadores de fármacos que median en el flujo de salida de fármacos del organismo. La presente invención contempla además el uso de los presentes procedimientos y composiciones en dichas terapias de combinación.

Hay una enorme cantidad de agentes antimicrobianos actualmente disponibles para uso en el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y virales. Para un tratado exhaustivo sobre las clases generales de dichos fármacos y sus mecanismos de acción, el experto en la materia puede referirse a Goodman y Gilman "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Eds. Hardman y col., 9ª edición, Pub. McGraw Hill, capítulos 43 a 50, 1996, (incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad). Generalmente, estos agentes incluyen agentes que inhiben la síntesis de pared celular (por ejemplo, penicilinas, cefalosporinas, cicloserina, vancomicina, bacitracina); y los agentes antifúngicos de imidazol (por ejemplo, miconazol, ketoconazol y clotrimazol); agentes que actúan directamente para alterar la membrana celular del microorganismo (por ejemplo, detergentes tales como polmixina y colistimetato y los antifúngicos nistatina y anfotericina B); agentes que afectan a las subunidades ribosómicas para inhibir la síntesis proteica (por ejemplo, cloranfenicol, las tetraciclinas, ertromicina y clindamicina); agentes que alteran la síntesis proteica y conducen a muerte celular (por ejemplo, aminoglicósidos); agentes que afectan al metabolismo de ácidos nucleicos (por ejemplo, las rifamicinas y las quinolonas); los antimetabolitos (por ejemplo, trimetoprim y sulfonamidas); y los análogos de ácidos nucleicos tales como zidovudina, ganciclovir, vidarabina y aciclovir, que actúan para inhibir enzimas virales esenciales para la síntesis de ADN. Pueden emplearse diversas combinaciones de compuestos antimicrobianos.

Las cantidades reales de composiciones y cualquier agente potenciador en las composiciones pueden variarse para obtener cantidades de emulsión y agentes potenciadores en el sitio de tratamiento que sean eficaces en la destrucción de microorganismos vegetativos así como esporulares y neutralizar sus productos tóxicos. En consecuencia, las cantidades seleccionadas dependerán de la naturaleza y el sitio para el tratamiento, la respuesta deseada, la duración deseada de acción biocida y otros factores. Generalmente, las composiciones de emulsión de la invención comprenderán al menos 0,001% a 100%, preferentemente de 0,01 a 90%, de emulsión por ml de composición líquida. Se prevé que las infecciones virales puedan tratarse usando entre aproximadamente 0,01% y 100% de emulsión por ml de composición líquida. Las infecciones bacterianas pueden atacarse con composiciones que comprenden entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 100% de emulsión por ml de composición líquida. Las esporas pueden destruirse por emulsiones que comprenden de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 100% de emulsión por ml de composición líquida. Estos son intervalos meramente ejemplares. Se prevé que las formulaciones puedan comprender aproximadamente 0,001%, aproximadamente 0,0025%, aproximadamente 0,005%, aproximadamente 0,0075%, aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,025%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,075%, aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1,0%, aproximadamente 2,5%, aproximadamente 5%, aproximadamente 7,5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12,5%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o aproximadamente 100% de emulsión por ml de composición líquida. Debería entenderse que se contempla que un intervalo entre dos cifras cualesquiera enumeradas anteriormente está abarcado dentro de los límites de la presente invención. Se producirá necesariamente cierta variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que esté siendo tratado.

La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración humana, las preparaciones deberían cumplir los patrones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como se requiere por la Oficina de Patrones Biológicos de la FDA.

## **B. Descontaminación y esterilización**

En general, la presente invención contempla composiciones y procedimientos que encuentran uso como agentes de descontaminación ambiental y para el tratamiento de bajas en ataques tanto militares como terroristas. La inactivación de una amplia serie de patógenos, incluyendo bacterias vegetativas y virus con envoltura (Véase, por ejemplo, Chatlyne y col. "A lipid emulsion with effective virucidal activity against HIV-1 and other common viruses," Foundation for Retrovirology and Human Health, 3rd Conference on retroviruses and Opportunistic Infections, Washington, DC, Estados Unidos [1996]) y esporas bacterianas, combinadas con baja toxicidad en animales experimentales, hace a las presentes emulsiones adecuadas para su uso como agentes de descontaminación generales antes de que se identifique un patógeno específico. Pueden producirse composiciones preferidas de la presente invención rápidamente en grandes cantidades y son estables durante muchos meses a una amplia serie de temperaturas. Estas propiedades proporcionan una flexibilidad que es útil para una amplia serie de aplicaciones de descontaminación.

Por ejemplo, ciertas formulaciones de la presente invención son especialmente eficaces para destruir muchas de las esporas bacterianas y agentes usados en guerra biológica. A este respecto, las composiciones y procedimientos del presente documento son útiles en la descontaminación de personal y materiales contaminados por agentes de guerra biológica. Las soluciones de las presentes composiciones pueden pulverizarse directamente sobre materiales o personal contaminado de sistemas de pulverización aéreos o basados en tierra. En ciertas de estas aplicaciones, la presente invención contempla que puede ponerse en contacto una cantidad eficaz de la composición con materiales o personal contaminado de modo que se produzca descontaminación. Como alternativa, pueden proporcionarse kits de descontaminación personales a militares o civiles que probablemente se contaminen con agentes biológicos.

La inactivación de una amplia serie de patógenos, incluyendo bacterias vegetativas y virus con envoltura (Véase, por ejemplo, Chatlyne y col. "A lipid emulsion with effective virucidal activity against HIV-1 and other common viruses," Foundation for Retrovirology and Human Health, 3rd Conference on retroviruses and Opportunistic Infections, Washington, DC, Estados Unidos [1996]) y esporas bacterianas (Véase, por ejemplo, Hamouda y col., J. Infect. Disease 180:1939 [1999]), combinado con baja toxicidad hacia las presentes composiciones particularmente adecuadas para su uso como agentes de descontaminación generales antes de que se identifique un patógeno específico.

Por lo tanto, ciertas realizaciones de la presente invención contemplan específicamente el uso de las presentes composiciones en desinfectantes y detergentes para descontaminar suelo, maquinaria, vehículos y otro equipamiento, y vías de agua que pueden haberse sometido a un patógeno no deseado. Dichos procedimientos de descontaminación pueden implicar aplicación sencilla de la formulación en forma de una pulverización líquida o pueden requerir un régimen más riguroso. Además, las presentes emulsiones pueden usarse para tratar cultivos con respecto a diversos virus vegetales (en lugar de o para su uso con antibióticos convencionales).

Además de su uso en descontaminación de tierra y equipamiento, las formulaciones también encuentran uso en detergentes domésticos para fines de desinfección generales. Además, algunas realizaciones de la presente invención pueden usarse para evitar la contaminación de alimentos con bacterias u hongos (por ejemplo, composiciones no tóxicas). Esto puede realizarse en el procedimiento de preparación del alimento o mediante adición al alimento como un aditivo, desinfectante, o conservante.

Las emulsiones de la invención se usan preferentemente en superficies duras en forma líquida. En consecuencia, los componentes anteriores se mezclan con uno o más líquidos vehículo acuosos. La elección de vehículo acuoso no es crítica. Sin embargo, sería seguro y debería ser químicamente compatible con las emulsiones de la invención. En algunas realizaciones, el líquido vehículo acuoso comprende disolventes habitualmente usados en composiciones de limpieza de superficies duras. Dichos disolventes deberían ser compatibles con las emulsiones de la invención y deberían ser químicamente estables al pH de las emulsiones. También deberían tener buenas propiedades de restos/formación de película. Se describen disolventes para su uso en limpiadores de superficies duras, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.108.660, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

En realizaciones preferidas, el vehículo acuoso es agua o una mezcla miscible de alcohol y agua. El alcohol puede usarse para ajustar la viscosidad de las composiciones. En algunas realizaciones, los alcoholes son preferentemente alcoholes C2-C4. En realizaciones particularmente preferidas, se emplea etanol. Por ejemplo, en una realización preferida, el líquido vehículo acuoso es agua o una mezcla de agua-etanol que contiene de aproximadamente 0 a aproximadamente 50% de etanol. La presente invención también incorpora composiciones no líquidas. Estas composiciones no líquidas pueden estar en formas granulares, de polvo o gel, preferentemente en formas granulares.

Opcionalmente, algunas composiciones contienen materiales adyuvantes que aumentan la limpieza y estética siempre que no interfieran con la actividad de las emulsiones de la invención. Las composiciones pueden comprender opcionalmente un tensioactivo auxiliar que no interfiere. Puede emplearse opcionalmente una amplia diversidad de tensioactivos orgánicos, solubles en agua. La elección de tensioactivo auxiliar depende de los deseos del usuario con respecto al fin pretendido de las composiciones y la disponibilidad comercial del tensioactivo. Otros aditivos opcionales tales como perfumes, abrillantadores, enzimas, colorantes y similares pueden emplearse en las composiciones para potenciar la estética y/o el rendimiento de limpieza. También pueden emplearse en las composiciones formadores de detergente. Los formadores de detergente secuestran iones de dureza de magnesio y calcio que podrían de otro modo unirse con y hacer menos eficaces los tensioactivos auxiliares o co-tensioactivos. Los formadores de detergente son especialmente útiles cuando se emplean tensioactivos auxiliares o co-tensioactivos, y son aún más útiles cuando las composiciones se diluyen antes de su uso con agua del grifo excepcionalmente dura por ejemplo, por encima de 0,205 gramos/litro.

En otras realizaciones, la composición comprende además supresores de espuma. En estas realizaciones, las composiciones comprenden preferentemente una cantidad suficiente de un supresor de espuma para evitar la formación de espuma excesiva cuando se pone en contacto a las composiciones con superficies duras. Los supresores de espumas son especialmente útiles en formulaciones para aplicación sin aclarado de la composición. El supresor de espuma puede proporcionarse por medios conocidos y convencionales. La selección del supresor de

espuma depende de su capacidad para formularse en las composiciones, y el perfil de restos y limpieza de las composiciones. El supresor de espuma debe ser químicamente compatible con los componentes de las composiciones, debe ser funcional en el intervalo de pH descrito en el presente documento, y no debería dejar un resto visible en superficies limpiadas. Pueden usarse co-tensioactivos de baja formación de espumas como supresores de espuma para mediar en el perfil de espuma en las composiciones. Nuevamente son suficientes concentraciones de co-tensioactivo entre aproximadamente 1 parte y aproximadamente 3%.

Los ejemplos de co-tensioactivos adecuados para su uso en el presente documento incluyen copolímeros en bloque (por ejemplo, geles PLURONIC y TETRONIC [geles poliméricos de poli (etilen óxido)-b-poli (propilen óxido)-b-poli (etilen óxido)], BASF Company, Parsippany, NJ) y alcoholes primarios y secundarios alquilados (por ejemplo, etoxilados/propoxilados (por ejemplo, TERIGTOL [Union Carbide, Danbury, CT]; POLY-TERGENTO [Olin Corporation, Norwalk, CT]). El supresor de espuma opcional preferentemente comprende un material basado en silicona. Estos materiales son eficaces como supresores de espuma a concentraciones muy bajas. A concentraciones bajas, los supresores de espuma basados en silicona tienen menos probabilidades de interferir con el rendimiento de limpieza de las composiciones. Un ejemplo de supresores de espuma basados en silicona adecuados para su uso en las composiciones es Dow Corning DSE. Estos supresores de espuma basados en silicona opcionales pero preferidos pueden incorporarse en la composición por medios conocidos y convencionales.

En otras realizaciones más, las composiciones pueden usarse por trabajadores de cuidados sanitarios, o cualquier persona en contacto con personas o áreas con infecciones microbianas, para sus necesidades de seguridad sanitaria personal y descontaminación. Además, las emulsiones de la invención pueden formularse en pulverizaciones para usos hospitalarios y domésticos tales como limpieza y desinfección de dispositivos médicos y habitaciones de pacientes, aparatos domésticos, superficies de cocina y baño, etc. En realizaciones similares, las composiciones pueden usarse por trabajadores de servicios de limpieza y ambientales, trabajadores de procesamiento de alimentos y agrícolas y personal de laboratorio cuando es probable que estos individuos entren en contacto con agentes biológicos infecciosos. Adicionalmente, las composiciones pueden usarse por viajeros y personas en contacto con áreas que probablemente alberguen agentes infecciosos y patológicos.

### C. Preparación de alimentos

La presente invención también contempla que ciertas composiciones descritas en el presente documento pueden emplearse en las industrias de procesamiento y preparación de alimentos para prevenir y tratar alimentos contaminados con bacterias, hongos y toxinas portadas por la comida. Por lo tanto, dichas composiciones pueden emplearse para reducir o inhibir el crecimiento microbiano o anular de otro modo los efectos deletéreos de contaminación microbiana de los alimentos. Para estas aplicaciones, las composiciones de emulsión se aplican en formas aceptables en la industria alimentaria tales como aditivos, conservantes o condimentos.

La frase "aceptable en la industria alimentaria" se refiere a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas o alérgicas cuando se toman por vía oral por seres humanos o animales. Como se usa en el presente documento, "aceptable en los medios de la industria alimentaria" incluye todos y cada uno de los disolventes, sustancias de dispersión, todas y cada una de las especias y hierbas y sus extractos. Excepto en la medida en que cualquier aditivo, conservante y condimento convencional es incompatible con las emulsiones de la presente invención, se contempla su uso en la prevención o tratamiento de microbios portados por alimentos y sus productos tóxicos. También pueden incorporarse principios activos complementarios a las composiciones. Para dichas aplicaciones, los vehículos aceptables pueden tomar la forma de líquidos, cremas, espumas, geles y pueden comprender adicionalmente disolventes, emulsionantes, agentes gelificantes, humectantes, estabilizadores, agentes humectantes, conservantes, agentes de secuestro, colorantes, perfumes y otros componentes habitualmente empleados en la industria del procesamiento alimentario.

En otra realización de la presente invención, las composiciones pueden diseñarse específicamente para aplicaciones tales como desinfectar o esterilizar dispositivos, equipamiento y áreas de la industria alimentaria en las que el alimento se procesa, envasa y almacena. Para aplicaciones de este tipo, las composiciones pueden proporcionarse convenientemente en forma de un líquido o espuma, y pueden proporcionarse con emulsionantes, tensioactivos, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes y otros componentes habitualmente hallados en composiciones de este tipo. En algunas realizaciones, las composiciones se aplican a productos o productos agrícolas antes de o durante el transporte de dichos bienes. Las composiciones de la invención pueden impregnarse en materiales absorbentes habitualmente usados en el material de envasado para la prevención de la contaminación del alimento durante transporte y almacenamiento (por ejemplo, envases de cartón o papel). Otros sistemas de suministro de este tipo serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

Las cantidades reales de las emulsiones y agentes potenciadores en las composiciones de la invención pueden variarse para obtener concentraciones apropiadas de emulsión y agentes potenciadores para evitar o inhibir eficazmente la contaminación alimentaria provocada por microbios portados por los alimentos y sus productos tóxicos. En consecuencia, las concentraciones seleccionadas dependerán de la naturaleza del producto alimentario, envase, procedimiento de almacenamiento y otros factores. Generalmente, las composiciones de la emulsión de la invención comprenderán al menos 0,001% a aproximadamente 90% de emulsión en composición líquida. Se prevé que las formulaciones pueden comprender aproximadamente 0,001%, aproximadamente 0,0025%,

aproximadamente 0,005%, aproximadamente 0,0075%, aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,025%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,075%, aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1,0%, aproximadamente 2,5%, aproximadamente 5%, aproximadamente 7,5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12,5%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o aproximadamente 100% de emulsión por ml de composición líquida. Debería entenderse que se contempla específicamente que un intervalo entre dos cifras cualesquiera enumeradas anteriormente está abarcado dentro de los límites de la presente invención.

En realizaciones particulares, pueden usarse emulsiones como desinfectantes y detergentes para descontaminar y evitar la infección microbiana de alimento, suelo y agua, maquinaria y otro equipamiento, y animales.

Las emulsiones de la invención pueden usarse por la industria alimentaria para evitar la contaminación. Por ejemplo, la inclusión de la emulsión dentro del producto alimentario en sí mismo sería eficaz en la destrucción de bacterias que pueden haber contaminado accidentalmente carne o aves de corral. Esto también podría permitir a la industria usar un espectro potencialmente más amplio de productos alimentarios y reducir costes.

Ciertas realizaciones de la presente invención también pueden usarse en la industria de las bebidas. Por ejemplo, las emulsiones de la invención podrían incluirse en productos de zumos para evitar el crecimiento de ciertos hongos, que provoca la contaminación y conducen a la producción de micotoxinas, que son peligrosas para los consumidores. Mediante la adición de pequeñas cantidades de las emulsiones de la invención, se evitaron los contaminantes fúngicos más habituales en zumo de frutas. Este efecto se consiguió con tan poco como una parte en 10.000 de la emulsión (una cantidad que no alteró el sabor o la composición del producto de zumo).

Las emulsiones de la invención pueden usarse para retirar esencialmente agentes infecciosos en maquinaria y otro equipamiento. Por ejemplo, las emulsiones pueden usarse para eliminar contaminaciones en plantas de procesamiento de carne, particularmente de organismos tales como *Listeria monocytogenes*, limpiando mataderos o instalaciones de envasado de alimentos continuamente con la emulsión.

La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para aplicación individual. Además, dicha aplicación anterior debería cumplir los patrones generales de seguridad y pureza como se requiere por la oficina de la FDA.

#### **D. Kits**

En otras realizaciones de la presente invención, los procedimientos y composiciones, o componentes de los procedimientos y composiciones pueden formularse en una única formulación, o pueden separarse en formulaciones separadas para mezcla posterior durante su uso, como puede desearse para una aplicación particular. Dichos componentes pueden colocarse provechosamente en kits para su uso contra infecciones microbianas, descontaminar instrumentos y similares. En algunas realizaciones, dichos kits contienen todos los materiales y reactivos esenciales requeridos para el suministro de las formulaciones de la presente invención al sitio de su acción pretendida.

En algunas realizaciones, pretendidas para su uso *in vivo*, los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden formularse en una única composición o composiciones separadas inyectables farmacéuticamente aceptables. En este caso, el medio de recipiente puede en sí mismo ser un inhalante, jeringa, pipeta, cuentagotas u otro aparato similar, del que puede aplicarse la formulación a un área infectada del cuerpo, tal como los pulmones, inyectarse a un animal, o incluso aplicarse a y mezclarse con los otros componentes del kit.

Los kits de la presente invención también incluyen típicamente un medio para contener los frascos en confinamiento estrecho para venta comercial (por ejemplo, recipientes de plástico moldeados por soplado o de inyección en los que se conservan los frascos deseados). Independientemente del número o tipo de recipientes, los kits de la invención también pueden comprender, o envasarse con, un instrumento para ayudar a la inyección/administración o colocación de la composición compleja última dentro del cuerpo de un animal. Dicho instrumento puede ser un inhalante, jeringa y toallita antiséptica, pipeta, pinzas, cuchara de medición, cuentagotas o cualquier vehículo de suministro médicamente aprobado similar.

#### **E. Modificación, preparación y suministro**

La presente invención proporciona además una diversidad de procedimientos y sistemas para la modificación de las nanoemulsiones de la presente invención, la incorporación de las nanoemulsiones en otros productos, envasado y suministro de las composiciones de la presente invención, y procedimientos para reducir los costes asociados con el uso o manipulación de materiales o muestras que puedan contaminarse con microorganismos. La siguiente descripción pretende proporcionar simplemente algunos ejemplos de la modificación, preparación y suministro de las composiciones de la presente invención. Los expertos en la materia apreciarán variaciones de dichos procedimientos.



En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para mejorar o alterar las nanoemulsiones descritas en el presente documento. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, tomar una nanoemulsión descrita en el presente documento y cambiar uno o más componentes de la nanoemulsión. Dichos cambios incluyen, pero no se limitan a, añadir o retirar uno o más componentes. La nanoemulsión alterada puede después ensayarse para determinar si tiene propiedades deseadas útiles. En algunas realizaciones de la presente invención, las nanoemulsiones de la presente invención, o las derivadas de las nanoemulsiones de la presente invención, se diluyen. Las muestras diluidas pueden después ensayarse para determinar si mantienen la funcionalidad deseada. En otras realizaciones más de la presente invención, las nanoemulsiones de la presente invención, o las derivadas de las nanoemulsiones de la presente invención se pasan a través de un procedimiento de control de calidad (QC) y/o garantía de calidad (QA) para confirmar la idoneidad de la nanoemulsión para venta o suministro a un usuario o vendedor.

En algunas realizaciones de la presente invención, las nanoemulsiones de la presente invención se añaden a otro producto para añadir o mejorar capacidades antimicrobianas del producto o para ensayar una capacidad antimicrobiana sospechada o proporcionar una que se percibe que está mejorada al producto (es decir, se contempla que la adición de una nanoemulsión de la presente invención a un producto está dentro del alcance de la presente invención, independientemente de si tiene una capacidad antimicrobiana detectable, o cualquiera). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las nanoemulsiones de la presente invención se añaden a materiales de limpieza o desinfectantes (por ejemplo, agentes de limpieza domésticos). En otras realizaciones, las nanoemulsiones se añaden a materiales médicos o de primeros auxilios. Por ejemplo, las nanoemulsiones pueden añadirse a (o usarse directamente como) agentes de esterilización y productos de cuidado de heridas. En otras realizaciones más, las nanoemulsiones se añaden a productos industriales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las nanoemulsiones se añaden a aceites de motor para prevenir o reducir, por ejemplo, la contaminación fúngica. Como se ha descrito anteriormente, puede sintetizarse emulsión eficaz, estable, incluso usando aceite de motor como el componente de aceite (por ejemplo, W<sub>20</sub>5GC Mobil 1). En otras realizaciones más, las nanoemulsiones se añaden a productos alimentarios. Por ejemplo, las nanoemulsiones pueden añadirse a bebidas para evitar el crecimiento de organismos no deseados en la bebida.

La nanoemulsión de la presente invención, bien sola o bien junto con otros materiales puede proporcionarse en muchos tipos diferentes de recipientes y sistemas de suministro. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, las nanoemulsiones se proporcionan en una crema u otra forma sólida o semisólida. Durante el desarrollo de la presente invención, se determinó que las emulsiones de la presente invención pueden incorporarse en formulaciones de hidrogel manteniendo a la vez capacidades antimicrobianas. El uso de las emulsiones en hidrogel proporciona varias características útiles. Por ejemplo, pueden prepararse hidrogeles en estructuras semisólidas de tamaños y formas deseados. Esto permite, por ejemplo, la inserción de los materiales de hidrogel en tubos u otras vías para crear filtros antimicrobianos (es decir, los materiales pasados a través del hidrogel se descontaminan por las emulsiones de la presente invención).

Las nanoemulsiones pueden suministrarse (por ejemplo, al usuario o clientes) en cualquier recipiente adecuado. Puede usarse un recipiente que proporcione uno o más usos individuales o dosificaciones de múltiples usos de la nanoemulsión para la aplicación deseada. En algunas realizaciones de la presente invención, las nanoemulsiones se proporcionan en una suspensión o forma líquida. Dichas nanoemulsiones pueden suministrarse en cualquier recipiente adecuado incluyendo frascos de pulverización (por ejemplo, frascos de pulverización presurizados). Para usos industriales u otros a gran escala, pueden proporcionarse volúmenes grandes (por ejemplo, de decenas a miles de litros) de nanoemulsión en un recipiente individual configurado de forma apropiada para permitir la distribución o uso de la nanoemulsión.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, se usan nanoemulsiones de la presente invención junto con una práctica de negocio existente para reducir los costes asociados con o mejorar la seguridad del funcionamiento de la práctica de negocio. Por ejemplo, el uso de las nanoemulsiones de la presente invención puede reducir costes asociados con el uso o manipulación de materiales o muestras que podrían contaminarse con microorganismos. En algunas realizaciones, las nanoemulsiones de la presente invención se usan para mejorar la seguridad o reducir los costes asociados con la industria médica. Por ejemplo, las nanoemulsiones encuentran uso como agentes de esterilización baratos y eficaces para su uso en materiales médicos (por ejemplo, la superficie que entra en contacto con animales, personas o muestras biológicas) o con pacientes (por ejemplo, por vía interna o vía externa). Las nanoemulsiones también encuentran uso como agentes de esterilización baratos y eficaces para procesamiento y manipulación de alimentos y aplicaciones industriales. En algunas de dichas realizaciones, la presente invención proporciona nanoemulsiones no tóxicas. Por ejemplo, se proporcionan nanoemulsiones en el presente documento que incluyen ingredientes que están actualmente aprobados por las agencias reguladoras apropiadas (por ejemplo, FDA, USDA, etc.) para su uso en aplicaciones médicas, agrícolas y alimentarias. Además, se proporcionan en el presente documento procedimientos para la generación de nanoemulsiones adicionales con la funcionalidad deseada que pueden estar compuestas completamente de sustancias no tóxicas y aprobadas. Como tales, las nanoemulsiones de la presente invención pueden usarse en aplicaciones sin incurrir en tener que sufrir el procedimiento caro y largo de obtener la aprobación reguladora. De hecho, las emulsiones pueden ser menos tóxicas que la suma de sus componentes individuales. Por ejemplo, se ensayó X8PC para comparar el efecto lítico de la emulsión en los glóbulos rojos de oveja ensayados en placas de agar sangre en comparación con el efecto lítico de mezclas de los ingredientes no emulsionados. Los datos se presentan en la Figura 34. Las dos barras

negras en la Figura 34 muestran el efecto lítico de la nanoemulsión X8PC en comparación con el efecto lítico de una mezcla no emulsionada de todos los ingredientes.

## V. Ejemplos específicos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

En la divulgación experimental dada a continuación, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes);  $\mu$  (micrómetro), M (molar);  $\mu$ M (micromolar); mM (milimolar), N (normal); mol (moles); mmol (milimoles);  $\mu$ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos);  $\mu$ g (microgramos); ng (nanogramos); l (litros); ml (mililitros);  $\mu$ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros);  $\mu$ m (micrómetros); nM (nanomolar); °C (grados centígrados); y PBS (solución salina tamponada con fosfato).

### Ejemplo 1

#### Procedimientos para formular emulsiones

La emulsión se produce como sigue: se realiza una fase oleosa mezclando disolvente orgánico, aceite y tensioactivo y calentando después la mezcla resultante a 37-90 °C durante hasta una hora. La emulsión se forma bien con un instrumento de jeringa recíproca o bien con un mezclador de alto cizallamiento Silverson. La fase acuosa se añade a la fase oleosa y se mezcla durante 1-30 minutos, preferentemente durante 5 minutos. Para emulsiones que contienen ingredientes volátiles, se añaden los ingredientes volátiles junto con la fase acuosa.

En una realización particular, la emulsión se formó como sigue: se realizó una fase oleosa mezclando tributil fosfato, aceite de soja y un tensioactivo (por ejemplo, TRITON X-100) y calentando después la mezcla resultante a 86 °C durante una hora. Se produjo después una emulsión inyectando agua en la fase oleosa a una relación volumen/volumen de una parte de fase oleosa por cuatro partes de agua. La emulsión puede producirse manualmente, con instrumentación de jeringa recíproca, o con instrumentación de flujo discontinuo o continuo. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos para producir estas emulsiones y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.103.497 y 4.895.452. La Tabla 2 muestra las proporciones de cada componente, el pH, y el tamaño de la emulsión como se mide en un instrumento de medición por láser Coulter LS 130 equipado con un baño de agua en circulación.

**Tabla 2**

Componentes químicos de emulsión	Porcentaje de cada componente	pH	Tamaño de Coulter medio (en micrómetros)	Intervalo de Coulter medio (en micrómetros)
BCTP				
TRITON X-100	2%	5,16	1,074	0,758-1,428
Tributil fosfato	2%			
Aceite (por ejemplo, de soja)	16%			
Agua	80%			
BCTP 0.1 *		5,37	0,944	0,625-1,333
TRITON X-100	0,20%			
Tributil fosfato	0,20%			
Aceite (por ejemplo, de soja)	1,60%			
Agua	98%			
* Esta emulsión se obtuvo diluyendo la emulsión de BCTP con agua en una relación de 1:9				

Las emulsiones de la presente invención son altamente estables. De hecho, se produjeron emulsiones como se ha descrito anteriormente y se permitió que reposaran durante una noche a temperatura ambiente en tubos de polipropileno sellados de 50 a 1000 ml. Las emulsiones se controlaron después con respecto a señales de separación. Las emulsiones que no mostraron señales de separación se consideraron "estables". Las emulsiones estables se controlaron después durante 1 año y se descubrió que mantenía la estabilidad.

Se produjeron de nuevo emulsiones como se ha descrito anteriormente y se permitió que reposaran durante una noche a -20 °C en tubos de polipropileno de 50 ml sellados. Las emulsiones se supervisaron después con respecto a señales de separación. Las emulsiones que no mostraron señales de separación se consideraron "estables". Se ha descubierto que las emulsiones BCTP y BCTP 0.1 permanecen sustancialmente sin cambios después de

almacenamiento a temperatura ambiente durante al menos 24 meses.

## Ejemplo 2

### Caracterización de una emulsión inactivadora de bacterias ejemplar de la presente invención como un liposoma emulsionado formado en gotas lipídicas

- 5 Se formó una emulsión inactivadora de bacterias de la presente invención, designada  $X_8W_{60}PC$ , mezclando una emulsión de aceite en agua que contenía lípidos con BCTP. En particular, se mezclaron una emulsión de aceite en agua que contiene lípidos que tiene glicerol monooleato (GMO) como el lípido primario y cloruro de cetilpiridinio (CPC) como un agente productor de carga positiva (denominado en el presente documento emulsión lipídica GMO/CPC o "W<sub>80</sub>8P") y BCTP en una relación 1:1 (volumen a volumen). La Patente de Estados Unidos N° 5.547.677 describe la emulsión lipídica GMO/CPC y otras emulsiones lipídicas relacionadas que pueden combinarse con BCTP para proporcionar las emulsiones de aceite en agua inactivadoras de bacterias de la presente invención.

## Ejemplo 3

### Estudio de eficacia bactericida *in vitro* I - bacterias Gram positivas

- 15 Para estudiar la eficacia bactericida de las emulsiones de la presente invención, las emulsiones se mezclaron con diversas bacterias durante 10 minutos y después se sembraron en placas en medios microbiológicos convencionales a diversas diluciones. Después se compararon los recuentos de colonias con cultivos no tratados para determinar el porcentaje de bacterias destruidas por el tratamiento. La Tabla 3 resume los resultados del experimento.

Tabla 3

Organismo	Inóculo (UFC)	% de destrucción	Emulsión ensayada
<i>Vibrio cholerae</i> clásica	$1,3 \times 10^8$	100	BCTP
<i>Vibrio cholerae</i> Eltor	$5,1 \times 10^8$	100	BCTP
<i>Vibrio parahemolytica</i>	$4,0 \times 10^7$	98-100	BCTP

- 20 Para estudiar el efecto bactericida de las emulsiones de la presente invención en diversas formas vegetativas de especies de *Bacillus*, se mezcló una emulsión a tres diluciones con cuatro especies de *Bacillus* durante 10 minutos y después se sembraron en placas en medio microbiológico. Después se compararon los recuentos de colonia con cultivos no tratados para determinar el porcentaje de bacterias destruidas por el tratamiento. La Tabla 4 contiene un resumen de los resultados bactericidas de varios experimentos con el porcentaje medio de destrucción en paréntesis.

Tabla 4

BCTP/dilución	<i>B. cereus</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
01:10	99% (99%)	95-99% (97%)	99% (99%)	99% (99%)
1:100	97-99% (98%)	74-93% (84%)	96-97% (96%)	99% (99%)
1:1000	0% (0%)	45-60% (52%)	0-32% (16%)	0-39% (20%)

## Ejemplo 4

### Estudio de eficacia bactericida *in vitro* II - bacterias Gram negativas

- 30 Para aumentar la captación de las emulsiones inactivadoras de bacterias por las paredes celulares de bacterias Gram negativas, potenciando de este modo el efecto microbiocida de las emulsiones en las bacterias Gram negativas resistentes, se premezcló EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) con las emulsiones. El EDTA se usó en concentración baja (50-25  $\mu M$ ) y la mezcla se incubó con las diversas bacterias Gram negativas durante 15 minutos. El efecto microbiocida de la mezcla se midió después en caldo de soja de tripticasa. Los resultados se exponen en la Tabla 5 posterior. Hubo más del 99% de reducción del recuento bacteriano usando BCTP en diluciones 1/100. Esta reducción del recuento no se debió al efecto de destrucción de EDTA solo como se muestra a partir del grupo de control en el que EDTA 250  $\mu M$  solo no pudo reducir el recuento bacteriano en 15 minutos.

35

Tabla 5

Bacteria	Bacterias solamente (UFC)	Bacterias + BCTP (UFC)	Bacterias + BCTP + EDTA (UFC)	Bacterias + EDTA (UFC)
<b>S. typhimurium</b>	1.830.000	1.370.000	40	790.000
<b>S. dysenteriae</b>	910.000	690.000	0	320.000

## Ejemplo 5

Estudio de eficacia bactericida *in vitro* III - formas vegetativas y esporas

- 5 Se utilizó *Bacillus cereus* (*B. cereus*, ATCC N° 14579) como un sistema modelo para *Bacillus anthracis*. Se realizaron experimentos con preparaciones diluidas en BCTP para estudiar el efecto bactericida de los compuestos de la presente invención en la forma vegetativa (con crecimiento activo) de *B. cereus*. Se evaluó el tratamiento en el medio durante 10 minutos a 37 °C. Como se resume en la Tabla 6, la emulsión de BCTP es eficaz contra la forma vegetativa de *B. cereus*. Una exposición de 10 minutos con esta preparación es suficiente para destrucción
- 10 prácticamente completa de formas vegetativas de *B. cereus* a todas las concentraciones ensayadas incluyendo diluciones de hasta 1:100.

Tabla 6

Emulsión	No diluido	1:10	1:100
<b>BCTP</b>	> 99%	> 99%	59 -> 99%
	Media = > 99%	Media = > 99%	Media = 82%
Número de experimentos = 4			

- 15 La forma de spora de *B. anthracis* es uno de los organismos que más probablemente se use como un arma biológica. Se conoce bien que las esporas son altamente resistentes a la mayoría de los desinfectantes. Como se ha descrito anteriormente, la destrucción eficaz de esporas habitualmente requiere el uso de compuestos químicos tóxicos e irritantes tales como formaldehído o hipoclorito sódico (es decir, lejía). Se realizó por lo tanto el mismo experimento con la forma de esporas de *B. cereus*. Como se muestra en la Tabla 7, el tratamiento en ambos medios durante 10 minutos a 37 °C no fue suficiente para destruir esporas de *B. cereus*.

Tabla 7

Emulsión	No diluido	1:10	1:100
<b>BCTP</b>	0% - 12%	0%	0%
	Media = 6%	Media = 0%	Media = 0%
Número de experimentos = 2			

- 20 Para evaluar la eficacia de los compuestos de la presente invención en la forma de spora de *B. cereus* durante un periodo de tiempo, se incorporó BCTP en medio de agar sólido a dilución 1:100 y las esporas se extendieron uniformemente en la superficie y se incubaron durante 96 horas a 37 °C. No se produjo crecimiento en medio de agar sólido en el que se había incorporado BCTP, hasta 96 horas (es decir, > 99% de destrucción, media > 99% de destrucción, 3 experimentos).
- 25 En un intento de definir con más precisión el momento en el que se produce la destrucción de esporas por BCTP, se realizó el siguiente experimento. Brevemente, se trató una preparación de esporas con BCTP a una dilución de 1:100 y se comparó con un control no tratado. El número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) se cuantificó después de 0,5, 1, 2, 4, 6, y 8 horas. Como se muestra en la Figura 1, UFC/ml en el control no tratado aumentó durante las primeras 4 horas de incubación y después alcanzó una meseta. Los frotis bacterianos
- 30 preparados en tiempo cero, 1, 2, 4 y 6 horas, y teñidos con respecto a estructuras de spora, revelaron que a las 2 horas no permanecían estructuras de spora (Figuras 2A-2C). Por lo tanto, se produjo el 100% de germinación de esporas en el control no tratado en el punto temporal de 2 horas. En la preparación de esporas tratada con BCTP, UFC/ml no mostró aumento durante las primeras 2 horas y después se redujo rápidamente durante el periodo de tiempo de 2 a 4 horas. La reducción de UFC/ml de línea basal durante 2-4 horas fue de aproximadamente 1000
- 35 veces. Los frotis bacterianos preparados en los mismos puntos temporales y teñidos con respecto a estructuras de esporas revelaron que permanecían estructuras de esporas hasta el final del experimento a las 8 horas. Por lo tanto, la germinación de esporas no se produjo en el cultivo tratado con BCTP debido a inhibición del proceso de germinación o debido a que las esporas se dañaron y fueron incapaces de germinar. Para determinar si las emulsiones eran eficaces en la destrucción de otras especies de *Bacillus*, además de *B. cereus*, se realizó un

experimento similar como se ha descrito anteriormente, en el que se trataron preparaciones de esporas con emulsiones y se compararon con un control no tratado después de cuatro horas de incubación. La siguiente Tabla 8 muestra los resultados en los que los números representan la actividad esporicida media de varios experimentos.

Tabla 8

BCTP/dilución	<i>B. cereus</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
1:10	82%	61%	93%	31%
1:100	91%	80%	92%	39%

(continuación)

BCTP/dilución	<i>B. cereus</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
1:1000	47%	73%	94%	22%

### Ejemplo 6

#### Estudio de eficacia bactericida *in Vivo*

Se realizaron estudios a animales para demostrar el efecto protector y terapéutico de las emulsiones de la invención *in vivo*. Se ha usado infección por *Bacillus cereus* en animales experimentales previamente como un sistema modelo para el estudio de carbunco (Burdon y Wende, 1960; Burdon y col, 1967; Lamanna y Jones, 1963). El síndrome de enfermedad inducido en animales infectados de forma experimental con *B. cereus* es en algunos aspectos similar al carbunco (Drobniewski, 1993; Fritz y col, 1995). Las emulsiones de la invención se mezclaron con esporas de *B. cereus* antes de inyectar a ratones.

#### Irrigación de heridas cutáneas

Se infectó una herida cutánea de 1 cm con  $2,5 \times 10^7$  esporas de *B. cereus*, después se cerró sin ningún tratamiento adicional. Los otros grupos se infectaron con el mismo número de esporas. Una hora después, las heridas se irrigaron con emulsión de la invención o solución salina para simular la descontaminación post-exposición. A las 48 horas, había grandes áreas necróticas rodeando las heridas con un área media de  $4,86 \text{ cm}^2$ . Además, el 60% de los animales de este grupo murieron como resultado de la infección. La histología de estas lesiones indicó necrosis total de la dermis y subdermis y grandes números de organismos de *Bacillus* vegetativos. La irrigación de heridas infectadas experimentalmente con solución salina no dio como resultado ningún beneficio aparente.

La irrigación de heridas infectadas con esporas de *B. cereus* con emulsión de la invención mostró beneficio sustancial, dando como resultado una reducción del 98% uniforme en el tamaño de la lesión de  $4,86 \text{ cm}^2$  a  $0,06 \text{ cm}^2$ . Esta reducción del tamaño de la lesión se vio acompañada de una reducción tres veces de la mortalidad (del 60% al 20%) en comparación con animales experimentales que no recibieron tratamiento o recibieron irrigación salina. La histología de estas lesiones no demostró pruebas de organismos *Bacillus* vegetativos y alteración mínima de la epidermis (Hamouda y col, 1999).

#### Inyección subcutánea

A ratones CD-1 se les inyectó emulsión de la invención diluida 1:10 en solución salina como un control y no mostraron señales de tensión o reacción inflamatoria, bien en análisis general o histológico. Para ensayar el efecto patogénico de esporas de *B. cereus in vivo* y el efecto esporicida de la emulsión de la invención, se mezcló una suspensión de  $4 \times 10^7$  esporas de *B. cereus* con solución salina o con emulsión de la invención a una dilución final de 1:10 y después se inyectó inmediatamente por vía subcutánea en la espalda de ratones CD-1.

Los ratones que se infectaron por vía subcutánea con esporas de *B. cereus* sin emulsión de la invención desarrollaron edema grave a las 6-8 horas. Esto se siguió de un área necrótica gris que rodeaba el sitio de inyección a las 18-24 horas, con desprendimiento grave de la piel presente a las 48 horas, dejando una lesión de color rojo seca.

La inyección simultánea de esporas y emulsión de la invención dio como resultado más del 98% de reducción del tamaño de la lesión necrótica de  $1,68 \text{ cm}^2$  a  $0,02 \text{ cm}^2$  cuando las esporas se premezclaron con un emulsión de la invención. Esto se asoció con edema o inflamación mínimo (Hamouda y col, 1999).

#### Córnea de conejo

La córnea de conejos se irrigó con diversas concentraciones de las emulsiones de la invención y se supervisó a las 24 y 48 horas. No se observaron irritaciones o anomalías cuando se usaron composiciones en cantidades terapéuticas.

**Membrana mucosa**

Se realizó toxicidad intranasal en ratones por instalación de 25 µl de 4% de la nanoemulsión por orificio nasal. No se observaron cambios clínicos o histopatológicos en estos ratones.

- 5 Se realizó ensayo de toxicidad oral en ratones introduciendo por sonda hasta 8 ml por kg de nanoemulsión al 25%. Las ratas no perdieron peso o mostraron señales de toxicidad bien de forma clínica o bien histopatológica. No se observaron cambios en la flora bacteriana del intestino como resultado de la administración oral de las emulsiones.

- 10 En una realización particular, se pasó *Bacillus cereus* tres veces en agar sangre (TSA con sangre de oveja al 5%, REMEL). Se desprendió por raspado *B. cereus* de la placa de tercer pase y se resuspendió en caldo de soja de tripticasa (TSB) (disponible de BBL). La suspensión de *B. cereus* se dividió en dos tubos. Se añadió un volumen igual de solución salina estéril a un tubo y se inyectó 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspensión de *B. cereus*/solución salina mezclada por vía subcutánea en 5 ratones CD-1. Se añadió un volumen igual de BCTP (diluido 1:5 en solución salina estéril) a un tubo y se mezcló, dando una dilución final de BCTP a 1:10. La suspensión de *B. cereus*/BCTP se incubó a 37 °C durante 10 minutos mientras se mezclaba. Se inyectó 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspensión de *B. cereus*/BCTP por vía subcutánea en 5 ratones CD-1. Se mezclaron volúmenes iguales de BCTP (diluido 1:5 en solución salina estéril) y TSB dando una dilución final de BCTP a 1:10. Se inyectaron 0,1 cm<sup>3</sup> de BCTP/TSB por vía subcutánea en 5 ratones CD-1.

- 20 El número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *B. cereus* en los inóculos se cuantificó como sigue: se realizaron diluciones en serie 10 veces de las suspensiones de *B. cereus* y *B. cereus*/BCTP en H<sub>2</sub>O destilada. Se inocularon a partir de cada dilución placas duplicadas de TSA (10 µl por placa). Las placas TSA se incubaron durante una noche a 37 °C. Se realizaron recuentos de colonias y se calculó el número de ufc/cm<sup>3</sup>. Las lesiones necróticas parecían ser menores en ratones que se habían inoculado con *B. cereus* que se pretrataron con BCTP. La siguiente Tabla 9 muestra los resultados del experimento.

**Tabla 9**

Inóculo	ID Nº	Observación (24 horas)
<b><i>B. cereus</i> 3,1 x 10<sup>7</sup> ufc/ratón</b>	1528	necrosis en el sitio de inyección
	1529	necrosis en el sitio de inyección
	1530	muerto
	1531	muerto
	1532	necrosis en el sitio de inyección
<b><i>B. cereus</i> 8,0 x 10<sup>5</sup> ufc/ratón (tratado con BCTP)</b>	1348	necrosis en el sitio de inyección
	1349	sin reacción
	1360	sin reacción
	1526	necrosis en el sitio de inyección
	1527	necrosis en el sitio de inyección
<b>BCTP/TSB</b>	1326	sin reacción
	1400	sin reacción
	1375	sin reacción
	1346	sin reacción
	1347	sin reacción

- 25 Se cultivó *Bacillus cereus* en Agar Nutriente (Difco) con Extracto de Levadura al 0,1% (Difco) y MnSO<sub>4</sub> 50 µg/ml para inducción de la formación de esporas. La placa se raspó y se suspendió en etanol al 50% estéril y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación para lisar las bacterias vegetativas restantes. La suspensión se centrifugó a 2.500 x g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en diH<sub>2</sub>O, se centrifugó a 2.500 X g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Se dividió la suspensión de esporas. El sedimento se resuspendió en TSB. Se inyectaron 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspensión de esporas *B. cereus* diluida 1:2 con solución salina por vía subcutánea en 3 ratones CD-1. Se mezclaron volúmenes iguales de BCTP (diluido 1:5 en solución salina estéril) y suspensión de esporas *B. cereus*, dando una dilución final de BCTP a 1:10 (tiempo de preincubación). Se inyectaron 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspensión de *B. cereus*/BCTP por vía subcutánea a 3 ratones CD-1. El número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *B. cereus* en el inóculo se cuantificó como sigue. Se realizaron diluciones en serie 10 veces de las suspensiones de *B. cereus* y *B. cereus*/BCTP en H<sub>2</sub>O destilada. Se inocularon a partir de cada dilución placas por duplicado de TSA (10 µl por placa). Las placas de TSA se incubaron durante una noche a 37 °C. Se realizaron recuentos de colonias y se calculó el número de ufc/cm<sup>3</sup>. Las lesiones necróticas parecían ser menores en ratones que se habían inoculado con esporas de *B. cereus* que se pretrataron con BCTP. Las observaciones de estos estudios se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Inóculo	Observación (24 horas)
<i>B. cereus</i> 6,4 x 10 <sup>6</sup> esporas/ratón	2/3 (66%) ratones mostraron necrosis en el sitio de inyección
<i>B. cereus</i> 4,8 x 10 <sup>6</sup> esporas/ratón (tratado con BCTP)	1/3 (33%) ratones mostraron necrosis en el sitio de inyección
<i>B. cereus</i> 4,8 x 10 <sup>6</sup> formas vegetativas/ratón	3/3 (100%) ratones mostraron necrosis en el sitio de inyección
<i>B. cereus</i> lisado 4,8 x 10 <sup>6</sup> ufc/ratón	3/3 (100%) ratones no mostraron síntomas
BCTP/TSB	1/3 (33%) ratones parecían tener algo de necrosis cutánea

Se cultivó *Bacillus cereus* en Agar Nutriente (Difco) con Extracto de Levadura al 0,1% (Difco) y MnSO<sub>4</sub> 50 µg/ml para inducción de la formación de esporas. La placa se raspó y se suspendió en etanol al 50% estéril y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación para lisar las bacterias vegetativas restantes. La suspensión se centrifugó a 2.500 x g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en H<sub>2</sub>O destilada, se centrifugó a 2.500 X g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en TSB. La suspensión de esporas *B. cereus* se dividió en tres tubos. Se añadió un volumen igual de solución salina estéril a un tubo y se mezcló. Se inyectaron por vía subcutánea 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspensión de *B. cereus*/solución salina en 10 ratones CD-1. Se añadió un volumen igual de BCTP (diluido 1:5 en solución salina estéril) al segundo tubo y se mezcló, dando una dilución final de BCTP a 1:10. La suspensión de esporas de *B. cereus*/BCTP (1:10) se incubó a 37 °C durante 4 horas mientras se mezclaba. Se inyectaron por vía subcutánea 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspensión de esporas de *B. cereus*/BCTP (1:10) en 10 ratones CD-1. Se añadió un volumen igual de BCTP (diluido 1:50 en solución salina estéril) al tercer tubo y se mezcló, dando una dilución final de BCTP a 1:100. Se incubó la suspensión de esporas de *B. cereus*/BCTP (1:10) a 37 °C durante 4 horas mientras se mezclaba. Se inyectaron por vía subcutánea 0,1 cm<sup>3</sup> de la suspensión de esporas de *B. cereus*/BCTP (1:10) a 10 ratones CD-1. Se mezclaron volúmenes iguales de BCTP (diluido 1:5 en solución salina estéril) y TSB, dando una dilución final de BCTP a 1:10. Se inyectaron por vía subcutánea 0,1 cm<sup>3</sup> del BCTP/TSB en 10 ratones CD-1. Se mezclaron volúmenes iguales de BCTP (diluido 1:50 en solución salina estéril) y TSB, dando una dilución final de BCTP a 1:100. Se inyectaron por vía subcutánea 0,1 cm<sup>3</sup> del BCTP/TSB en 10 ratones CD-1. Las observaciones de estos estudios se muestran en la Tabla 11 y Tabla 12.

Tabla 11

Inóculo sc	ID Nº	Observación a las 24 horas
<i>B. cereus</i> 5,5 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón, grupo sin tratamiento	1	Lesión cutánea de 2,4 cm <sup>2</sup> con área necrótica de 0,08 cm <sup>2</sup>
	2	sin anomalías observadas
	3	Moribundo con lesión cutánea de 8 cm <sup>2</sup> y parálisis de las extremidades posteriores
	4	Lesión cutánea de 3,52 cm <sup>2</sup>
	5	Lesión cutánea de 1,44 cm <sup>2</sup>
	6	Lesión cutánea de 3,4 cm <sup>2</sup>
	7	Lesión cutánea de 5,5 cm <sup>2</sup>
	8	Lesión cutánea de 5,5 cm <sup>2</sup>
	9	Lesión cutánea de 3,3 cm <sup>2</sup> con área necrótica de 0,72 cm <sup>2</sup>
	10	Lesión cutánea de 2,64 cm <sup>2</sup> con dos áreas necróticas (0,33 cm <sup>2</sup> y 0,1 cm <sup>2</sup> )
		Tamaño de lesión media en el grupo de esporas solamente 3,97 cm <sup>2</sup> (1/10 (10%) sin anomalías observadas)
Nota: Lesiones cutáneas de color gris con edema, áreas necróticas rojas/secas.		

Tabla 12

Inóculo sc	ID Nº	Observación a las 24 horas
<b>B. cereus</b> 1,8 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón, en el grupo tratado con BCTP 1:10	41	Sin anomalías observadas
	42	Sin anomalías observadas
	43	Lesión cutánea blanca de 1,2 cm <sup>2</sup> con centro gris, edema ligero
	44	Lesión cutánea blanca de 0,78 cm <sup>2</sup>
	45	Lesión cutánea blanca de 0,13 cm <sup>2</sup>
	46	Lesión cutánea blanca de 2,2 cm <sup>2</sup>
	47	Lesión cutánea blanca de 1,8 cm <sup>2</sup> con área marrón de 0,1 cm <sup>2</sup>
	48	Lesión cutánea blanca de 1 cm <sup>2</sup> con centro gris
	49	Lesión cutánea blanca de 0,78 cm <sup>2</sup>
	50	Sin anomalías observadas
		<b>Tamaño de lesión medio en grupo de tratamiento con BCTP 1:10 = 1,13 cm<sup>2</sup></b> <b>(3/10 (30%) sin anomalías observadas)</b>

(continuación)

Inóculo sc	ID Nº	Observación a las 24 horas
<b>B. cereus</b> 1,8 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón, en el grupo tratado con BCTP 1:100	51	Lesión cutánea gris de 2,1 cm <sup>2</sup>
	52	Lesión cutánea gris de 0,72 cm <sup>2</sup>
	53	Lesión cutánea gris de 1,5 cm <sup>2</sup>
	54	Lesión cutánea gris de 1,2 cm <sup>2</sup>
	55	Lesión cutánea gris de 3,15 cm <sup>2</sup>
	56	Lesión cutánea gris de 0,6 cm <sup>2</sup>
	57	Lesión cutánea gris de 0,5 cm <sup>2</sup>
	58	Lesión cutánea gris de 2,25 cm <sup>2</sup>
	59	Lesión cutánea gris de 4,8 cm <sup>2</sup> con área necrótica de 1 cm <sup>2</sup> de diámetro
	60	Lesión cutánea gris de 2,7 cm <sup>2</sup>
		<b>Tamaño de lesión medio en grupo de tratamiento con BCTP 1:100 = 1,9 cm<sup>2</sup></b> <b>(0/10 (0%) sin anomalías observadas)</b>
<b>BCTP 1:10 solamente</b>	11	Área blanca de 2,6 cm <sup>2</sup>
	12	Área blanca de 0,15 cm <sup>2</sup>
	13	Sin anomalías observadas
	14	Área blanca de 0,15 cm <sup>2</sup>
	15	Área blanca de 0,35 cm <sup>2</sup>
	16	Sin anomalías observadas
	17	Área blanca de 0,12 cm <sup>2</sup>
	18	Sin anomalías observadas
	19	Área blanca de 0,56 cm <sup>2</sup>
	20	Área blanca de 0,3 cm <sup>2</sup>
		<b>Tamaño de lesión medio en grupo solamente con BCTP 1:10 = 0,60 cm<sup>2</sup></b> <b>(3/10 (0%) sin anomalías observadas)</b>
<b>BCTP 1:100 solamente</b>	21-30	Sin anomalías observadas <b>Tamaño de lesión medio en grupo solamente con BCTP 1:100 = 0 cm<sup>2</sup></b> <b>(10/10 (100%) sin anomalías observadas)</b>



TSB solamente	31-40	Sin anomalías observadas <b>Tamaño de lesión medio en el grupo solamente con TSB = 0 cm<sup>2</sup></b> <b>(10/10 (100%) sin anomalías observadas)</b>
---------------	-------	--

5 Se intentó volver a aislar *B. cereus* de lesiones cutáneas, sangre, hígado y bazo (Tabla 13). Las lesiones cutáneas se limpiaron con betadine seguido de alcohol isopropílico estéril al 70%. Se realizó una incisión en el margen de la lesión y se frotó. El pecho se limpió con betadine seguido de alcohol isopropílico estéril al 70%. Se extrajo sangre por punción cardíaca. El abdomen se limpió con betadine seguido de alcohol isopropílico estéril al 70%. Se abrieron la piel y los músculos abdominales con instrumentos estériles separados. Se retiraron muestras de hígado y bazo usando instrumentos estériles separados. Las muestras de hígado y bazo se pasaron brevemente a través de una llama y se cortaron usando instrumentos estériles. Se usó la superficie recién expuesta para cultivo. Se inoculó agar BHI (Difco) y se incubó de forma aerobia a 37 °C durante una noche.

Tabla 13

Inóculo sc	ID Nº	Necropsia	Re-aislamiento de <i>B. cereus</i> del sitio de lesión cutánea
<b><i>B. cereus</i></b> 5,5 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón en el grupo sin tratar	3	24 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	6	48 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	7	48 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	8	72 horas	Lesión cutánea 100 ufc
	9	72 horas	Lesión cutánea 25 ufc
	10	72 horas	Lesión cutánea 100 ufc
	1	96 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	4	96 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	5	96 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
			UFC media en grupo de esporas sin tratar = 214* *(6/9 (67%)>300 UFC)
<b><i>B. cereus</i></b> 2,8 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón en el grupo tratado con BCTP 1:10	48	48 horas	Lesión cutánea 17 ufc
	50	48 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	46	72 horas	Lesión cutánea > 200 ufc
	47	72 horas	Lesión cutánea 100 ufc
	49	72 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	41	96 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	42*	96 horas	Lesión cutánea 20 ufc
	43		Cultivos no realizados
	44	96 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	45		Cultivos no realizados
	46		Cultivos no realizados
			UFC media en grupo de BCTP 1:10 = 192* *(318 (38%)>300 UFC)

<b>B. cereus</b> 1.8 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón en el grupo tratado con BCTP 1:100	48	48 horas	Lesión cutánea 18 ufc
	50*	48 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	52	72 horas	Lesión cutánea 1 ufc
	54	72 horas	Re-aislamiento negativo
	56	72 horas	Lesión cutánea > 300 ufc
	58	96 horas	Lesión cutánea 173 ufc
	59	96 horas	Lesión cutánea 4 ufc
	60	96 horas	Lesión cutánea 6 ufc
			UFC media en grupo de BCTP 1:100 = 100 *(2/8 (25%)> 00 UFC)
* Aunque no estaban presentes lesiones en estos ratones, los organismos se retiraron del sitio de inyección			

El pretratamiento tanto de *B. cereus* vegetativo como de esporas de *B. cereus* reduce su capacidad para provocar síntomas de la enfermedad cuando se introducen en animales experimentales. Estos se refleja en el menor tamaño de las lesiones cutáneas y los números generalmente menores de *B. cereus* recuperados de las lesiones. Además, se produce re-aislamiento menos frecuente de *B. cereus* de sangre, hígado y bazo lo que sugiere que la septicemia puede evitarse.

### Ejemplo 7

#### Estudio de toxicidad *in vivo* I

Se inyectó a ratones CD-1 por vía subcutánea 0,1 cm<sup>3</sup> de los compuestos de la presente invención y se observaron durante 4 días con respecto a señales de inflamación y/o necrosis. Se realizaron diluciones de los compuestos en solución salina estéril. Se conservaron muestras tisulares de ratones en formalina tamponada neutra 10% para examen histopatológico. Se indicó que las muestras de piel y músculo (de ratones a los que se inyectaron compuestos no diluidos) enviadas para revisión histológica mostraban indicios de necrosis tisular. Las muestras tisulares de ratones a los que se inyectaron compuestos diluidos no se examinaron histológicamente. Las Tablas 14 y 15 muestran los resultados de experimentos individuales.

**Tabla 14**

Compuesto	Ratón ID Nº	Dilución	Observación
BCTP	1326	no diluido	necrosis
	1327	no diluido	sin reacción
	1328	1:10	sin reacción
	1329	1:10	sin reacción
	1324	1:100	sin reacción
	1331	1:100	sin reacción
Salino	1344		sin reacción
	1345		sin reacción

**Tabla 15**

Compuesto	Ratón ID Nº	Dilución	Observación
BCTP	1376	no diluido	necrosis
	1377	no diluido	necrosis mínima
	1378	1:10	sin reacción
	1379	1:10	sin reacción
	1380	1:100	sin reacción
	1381	1:100	sin reacción
Salino	1394		sin reacción
	1395		sin reacción

Se inyectó a cobayas por vía intramuscular (en ambas patas traseras) 1,0 cm<sup>3</sup> de compuestos de la presente invención por sitio y se observaron durante 4 días con respecto a señales de inflamación y/o necrosis. Se realizaron diluciones de los compuestos en solución salina estéril.

- 5 Se conservaron muestras tisulares de cobayas en formalina tamponada neutra al 10% para examen histológico. Las muestras tisulares no se examinaron histológicamente.

**Tabla 16**

Compuesto	Cobaya	Dilución	Observación
BCTP	1023-1	no diluido	sin reacción
	1023-2	1:10	sin reacción
	1023-3	1:100	sin reacción
Salino	1023-10		sin reacción

Los resultados del estudio de toxicidad *in vivo* I muestran que la inyección subcutánea intramuscular de los compuestos ensayados no dio como resultado daño tisular observable en general y no parecía provocar tensión en los animales experimentales (Tabla 16).

## 10 Ejemplo 8

### Estudio de Toxicidad *In Vivo* II

- Se colocó un grupo de ratas Sprague-Dawley que consistía cada uno en cinco machos y cinco hembras en jaulas individuales y se aclimataron durante cinco días antes de la dosificación. Las ratas se dosificaron diariamente durante 14 días. El día 0-13, durante 14 días consecutivos cada rata del grupo I recibió por sonda 3 ml de BCTP, concentración 1:100, respectivamente. Se determinó que el volumen de 3 ml era la dosis oral máxima permisible para ratas. Antes de la dosificación el día 0 y día 7, se pesó cada rata. A continuación las ratas se pesaron semanalmente durante el transcurso del estudio. Los animales se observaron diariamente con respecto a enfermedad o mortalidad. Se permitió que los animales descansaran durante 14 días. El día 28 las ratas se pesaron y se sacrificaron. Los resultados de peso medio del estudio de toxicidad oral se muestran en la Tabla 17. Los pesos medios para machos y hembras los días 0, 7 y 14, 21 y 28 y los aumentos de peso medios del día 0-28, también se muestran en la Tabla 17. Una rata murió debido a traumatismo mecánico de la manipulación de la intubación de sonda durante la dosificación el día 14. Todas las ratas supervivientes aumentaron de peso durante el transcurso de 28 días del estudio y no se presentó enfermedad. Por lo tanto, aunque se sabe que el tributil fosfato solo es tóxico e irritante para las membranas mucosas, cuando se incorpora en las emulsiones de la presente invención, estas características no aparecen. La emulsión de BCTP, concentración 1:100, también se ensayó con respecto a toxicidad dérmica en conejos de acuerdo con los protocolos proporcionados en 16 CFR § 1500.3. La emulsión no era irritante para la piel en los animales ensayados.

**Tabla 17**

Número de rata	Sexo	Volumen de dosis ml	Peso corporal (g) día 0	Peso corporal (g) día 7	Peso corporal (g) día 14	Peso corporal (g) día 21	Peso corporal (g) día 28	Aumento de peso (g) día 0 día 28
9028	m	3	332,01	356,52	388,66	429,9	394,07	62,06
9029	m	3	278,62	294,65	296,23	310,7	392,6	113,98
9030	m	3	329,02	360,67	325,26	403,43	443,16	114,14
9031	m	3	334,64	297,04	338,82	357,5	416,89	82,25
9032	m	3	339,03	394,39	347,9	331,38	357,53	18,5
Media WT			266,26	340,65	339,37	400,85	78,18	
9063	F	3	302	298,08	388,66	338,41	347,98	45,98
9064	F	3	254,54	247,97	256,78	278,17	279,2	24,66
9065	F	3	225,99	253,81	273,38	290,54	308,68	82,69

Número de rata	Sexo	Volumen de dosis ml	Peso corporal (g) día 0	Peso corporal (g) día 7	Peso corporal (g) día 14	Peso corporal (g) día 21	Peso corporal (g) día 28	Aumento de peso (g) día 0 día 28
9066	F	3	246,56	260,38	266,21	235,12	272,6	26,04
9067	F	3	279,39	250,97	muerta			
Media WT			261,69	262,24	296,25	285,56	302,11	53

Las técnicas generales para ensayo de toxicidad incluyen ensayo de irritación dérmica, ensayo de irritación ocular, ensayo subcutáneo, ensayos intramusculares, irrigación de heridas abiertas, ensayos intranasales y ensayos orales. Pueden realizarse ensayos dérmicos en conejos en los que se apliquen 0,5 ml de emulsión al 10% a la piel de conejos durante 4 horas. La reacción cutánea se registra durante hasta 72 horas. Se usa una escala de Draize para puntuar la irritación. Para ensayos de irritación ocular, se aplican 0,1 ml de la emulsión al 10% al ojo de conejos y se registra la reacción ocular durante hasta 72 horas. Se usa una escala de Draize para puntuar la irritación. Los ensayos subcutáneos intramusculares inyectan 0,1 ml de emulsión al 10% en ratones. Se aplican 2 ml de emulsión al 10% en un ensayo de irrigación de herida abierta usando ratones. Para ensayos intranasales, se aplican 0,25 ml/orificio nasal de emulsión al 2-4% a los ratones. Para ensayos orales, se proporcionan 4 ml/kg/día de emulsión al 10% por vía oral durante una semana o se proporcionan 8 ml/kg de emulsión al 100% en una única dosis.

### Ejemplo 9

#### Estudio *in vitro* con *Bacillus Anthracis*

Se realizaron experimentos con  $X_8W_{60}PC$  para estudiar el efecto bactericida de los compuestos de la presente invención en la forma de spora de *B. anthracis*. La actividad esporicida de diferentes diluciones de  $X_8W_{60}PC$  (en agua) en seis cepas diferentes de *B. anthracis* se muestra en la Figura 3. Como se muestra en las Figuras 4 y 5,  $X_8W_{60}PC$  destruyó más del 98% de siete cepas diferentes de carbunco (las de la Figura 3 y Ames, USAMRID) en un periodo de 4 horas y es tan eficaz como lejía al 1-10%. Se encuentra actividad esporicida similar con diferentes diluciones de  $X_8W_{60}PC$  en los medios (Figura 6). La Figura 7 muestra el ciclo temporal para la actividad esporicida de  $X_8W_{60}PC$  contra la cepa Del Rio, TX de *B. anthracis* en comparación con el tiempo cero a temperatura ambiente. Como se muestra,  $X_8W_{60}PC$  puede destruir esporas de carbunco en un periodo tan corto como 30 minutos.

### Ejemplo 10

#### Mecanismos de acción

El siguiente ejemplo proporciona información sobre los mecanismos de acción propuestos de las emulsiones de la presente invención y para mostrar su actividad esporicida. No se pretende que este mecanismo limite el alcance de la invención y no es necesario un entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención, y la presente invención no se limita a ningún mecanismo particular. Se examinó el efecto de una emulsión lipídica de GMO/CPC ("W<sub>80</sub>8P") y BCTP en *E. coli*. W<sub>80</sub>8P destruyó *E. coli* (en H<sub>2</sub>O desionizada) pero BCTP fue ineficaz contra este organismo. La Figura 8 muestra el control y la Figura 9 muestra la *E. coli* tratada con BCTP. Como se muestra en la Figura 9, la *E. coli* tratada con BCTP parece normal, con estructura definida y membranas lipídicas intactas. La Figura 10 muestra la *E. coli* tratada con P10, en la que las bacterias tienen vacuolas dentro y los contenidos se han hinchado de modo que se ha perdido la estructura definida del organismo. Sin quedar ligado a una teoría particular (no es necesario un entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención, y la presente invención no se limita a ningún mecanismo particular), esta observación sugiere que W<sub>80</sub>8P destruye las bacterias sin lisarlas y en su lugar provoca un cambio en la estructura interna, evidente por la vacuolización e hinchamiento. Se realizó un segundo estudio con *Vibrio cholerae*. A pesar de que *Vibrio cholerae* está estrechamente relacionado con *E. coli*, tanto el BCTP, W<sub>80</sub>8P como  $X_8W_{60}PC$  mataron a este organismo. En comparación con la electromicrofotografía de control (Figura 11), la *Vibrio cholerae* tratada con W<sub>80</sub>8P (Figura 12) muestra de nuevo hinchamiento y cambios en el interior del organismo, pero las células permanecen intactas. Por el contrario, las *Vibrio cholerae* tratadas con BCTP (Figura 13) están completamente lisadas con solamente un residuo celular restante.  $X_8W_{60}PC$  (Figura 14) mostró una combinación de efectos, en la que alguno de los organismos están hinchados pero intactos y algunos están lisados. Esto sugiere claramente que BCTP, W<sub>80</sub>8P y  $X_8W_{60}PC$  actúan por mecanismos diferentes.

Se realizó un tercer estudio comparativo para evaluar la eficacia de las emulsiones a diversas concentraciones. Como se muestra en la Tabla 18,  $X_8W_{60}PC$  es más eficaz como un biocida a concentraciones menores (diluciones mayores) en bacterias sensibles a W<sub>80</sub>8P o BCTP. Además, otras seis bacterias que son resistentes a W<sub>80</sub>8P y BCTP son todas susceptibles a  $X_8W_{60}PC$ . Esta diferencia en la actividad también se ve cuando se comparan W<sub>80</sub>8P y BCTP y  $X_8W_{60}PC$  en ensayos de infecciosidad de gripe. Como se muestra en la Figura 15, tanto BCTP como  $X_8W_{60}PC$  son eficaces a diluciones 1:10 y 1:100, y, adicionalmente,  $X_8W_{60}PC$  es eficaz a la menor concentración, dilución 1:1000. Por el contrario, W<sub>80</sub>8P tiene poca actividad incluso a dilución 1:10, lo que sugiere que no es un

tratamiento eficaz para este organismo con envoltura. Además, X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC destruye especies de levadura que no se destruyen por W<sub>80</sub>8P o BCTP.

Tabla 18

Menor concentración de nanoemulsión requerida para conseguir más del 90% de destrucción de microorganismos seleccionados			
Bacterias	W <sub>80</sub> 8P	BCTP	X <sub>8</sub> W <sub>60</sub> PC
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Sin exterminios	10%	0,1%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1% *	1 %	ND
<i>Streptococcus pneumonia</i>	10%*	1 %	0,1%
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sin exterminios	Sin exterminios	0,1%
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ND	1 %	0,1%
<i>Haemophilus influenzae</i>	10%	1 %	0,1%
<i>Vibrio cholerae</i>	1 %	0,1%	0,1%
<i>E. coli</i>	Sin exterminios #	Sin exterminios	0,1%
<i>Salmonella typhimurium</i>	Sin exterminios	Sin exterminios	10%
<i>Shigella dysenteriae</i>	Sin exterminios #	Sin exterminios	0,1%
<i>Proteus mirabilis</i>	Sin exterminios #	Sin exterminios	1 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sin exterminios	Sin exterminios	10%
Esporas <i>Bacillus anthracis</i>	Sin exterminios a las 4H	0,1 % a las 4H	0,1 %-0,02% a las 4H
Esporas <i>Bacillus cereus</i>	10% a las 4H	1 % a las 4H	0,1 % a las 4H
Esporas <i>Bacillus subtilis</i>	Sin exterminios a las 24H	Sin exterminios a las 24H	0,1 % a las 4H
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ND	ND	0,1%
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ND	ND	0,1%

5

(continuación)

Menor concentración de nanoemulsión requerida para conseguir más del 90% de destrucción de microorganismos seleccionados			
Hongos			
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	Sin exterminios	Sin exterminios	1 %
<i>Candida tropicalis</i>	Sin exterminios	Sin exterminios	1 %
Virus			
Gripe A H2N2	Sin exterminios		
Gripe B / Hong Kong /5/72	ND	1%	ND
Vaccinia	ND	1%	%
Herpes simplex tipo I	ND	1%	0,1%
Sendai	ND	1%	ND
Sindbis	ND	1%	ND
Adenovirus	ND	Sin exterminios	ND
Datos para concentraciones menores no disponibles.			
# Sin muerte excepto en agua desionizada.			
10 ND = no determinado			

### Ejemplo 11

#### Pruebas adicionales de la actividad esporicida de la nanoemulsión contra especies de *Bacillus*

El presente ejemplo proporciona los resultados de investigaciones adicionales de la capacidad de realizaciones particulares de las emulsiones de la presente invención para inactivar diferentes esporas de *Bacillus*. Los procedimientos y resultados de estos estudios se perfilan a continuación.

10

**Preparaciones lipídicas tensioactivas: BCTP**, una nanoemulsión de agua en aceite, en la que la fase oleosa se realizó de aceite de soja, tri-n-butil fosfato y TRITON X-100 en agua al 80%. Se preparó  $X_8W_{60}PC$  mezclando volúmenes iguales de BCTP con  $W_{80}P$  que es un compuesto de tipo liposoma hecho de monoestearato de glicerol, esteroides de soja refinados, TWEEN 60, aceite de soja, un CPC que contiene halógeno iónico catiónico y aceite de menta.

**Preparación de esporas:** Para la inducción de formación de esporas, se cultivaron *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *B. circulans* (ATC 4513), *B. megaterium* (ATCC 14581) y *B. subtilis* (ATCC 11774) durante una semana a 37 °C en agar NAYEMn (Agar Nutriente con Extracto de Levadura 0.1% y  $MnSO_4$  5 mg/l). Las placas se rasparon y se suspendieron las bacterias/esporas en etanol 50% estéril y se incubaron a temperatura ambiente (27 °C) durante 2 horas con agitación para lisar las bacterias vegetativas restantes. La suspensión se centrifugó a 2.500 X g durante 20 minutos y el sedimento se lavó dos veces en  $diH_2O$  frío. El sedimento de esporas se resuspendió en caldo de soja de tripticasa (TSB) y se usó inmediatamente para experimentos. El Dr. Bruce Ivins (USAMRIID, Fort Detrick, Frederick, MD) proporcionó amablemente esporas de *B. anthracis*, cepas Ames y Vollum 1 B, y estas se prepararon como se ha descrito previamente (Ivins y col., 1995). Otras cuatro cepas de carbunco se proporcionaron amablemente por el Dr. Martin Hugh-Jones (LSU, Baton Rouge, LA). Estas cepas representan aislados con alta desemejanza de Sudáfrica; Mozambique; Bison, Canadá; y Del Rio, Texas.

**Ensayos esporicidas in vitro:** Para evaluar la actividad esporicida del medio sólido, se esterilizó en autoclave Agar de Soja de tripticasa (TSA) y se enfrió a 55 °C. Se añadió el BCTP al TSA a una dilución final de 1:100 y se agitó continuamente mientras se vertían las placas. Las preparaciones de esporas se diluyeron en serie (10 veces) y se sembraron en placas alicuotas de 10 µl por duplicado (el mayor inóculo fue de  $10^5$  esporas por placa). Las placas se incubaron durante 48 horas de forma aerobia a 37 °C y se evaluaron con respecto a crecimiento.

Para la evaluación de la actividad esporicida en medio líquido, las esporas se resuspendieron en TSB. Se mezcló 1 ml de suspensión de esporas que contenía  $2 \times 10^6$  esporas (concentración final de  $10^6$  esporas/ml) con 1 ml de BCTP o  $X_8W_{60}PC$  (a concentración final 2X en  $diH_2O$ ) en un tubo de ensayo. Los tubos se incubaron en un rotor de tubos a 37 °C durante 4 horas. Después del tratamiento, las suspensiones se diluyeron 10 veces en  $diH_2O$ . Se sembraron en estrías alicuotas por duplicado (25 µl) de cada dilución en TSA, se incubaron durante una noche a 37 °C y después se contaron las colonias. Se calculó la actividad esporicida expresada como un porcentaje de destrucción:

$$\frac{ufc [inicial] - ufc [post-tratamiento]}{ufc [inicial]} \times 100$$

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces y se calculó la media del porcentaje de destrucción.

**Microscopía electrónica:** Se trataron esporas de *B. cereus* con BCTP a una dilución final de 1:100 en TSB usando matraces de Erlenmeyer en un incubador agitador a 37 °C. Se tomaron muestras de 50 ml a intervalos y se centrifugaron a 2.500 X g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se fijó en glutaraldehído al 4% en cacodilato 0,1 M (pH 7,3). Los sedimentos de esporas se procesaron para microscopía electrónica de transmisión y se examinaron secciones finas después de tñir con acetato de uranilo y citrato de plomo.

**Inhibidores/estimuladores de germinación:** Se suspendieron esporas de *B. cereus* (a una concentración final de  $10^6$  esporas/ml) en TSB con el inhibidor de germinación D-alanina (a una concentración final de 1 µM) o con el estimulador de germinación L-alanina + inosina (a concentración final de 50 µM cada uno) (Titball y Manchee, 1987; Foster y Johnston., 1990; Shibata y col., 1976) y después se mezclaron inmediatamente con BCTP (a una dilución final de 1:100) y se incubaron durante un intervalo variable. Después las mezclas se diluyeron en serie, se sembraron y se incubaron durante una noche. Al día siguiente las placas se contaron y se calculó el porcentaje de actividad esporicida.

**Actividad esporicida in vivo:** Se desarrollaron dos modelos animales; en el primero se mezclaron esporas de *B. cereus* (suspendidas en solución salina estéril) con un volumen igual de BCTP a una dilución final de 1:10. Como control, se mezcló la misma suspensión de esporas *B. cereus* con un volumen igual de solución salina estéril. Después se inyectaron inmediatamente 100 µl de las suspensiones que contenían  $4 \times 10^7$  esporas por vía subcutánea en ratones CD-1.

En el segundo modelo, se creó una herida simulada realizando una incisión en la piel de la espalda de los ratones. La piel se separó del músculo subyacente por disección roma. El "bolsillo" se inoculó con 200 µl que contenía  $2,5 \times 10^7$  esporas (en solución salina) y se cerró usando grapas. Una hora después se retiraron las grapas y se irrigó la herida con 2 ml de solución salina estéril o con 2 ml de BCTP (1:10 en solución salina estéril). Las heridas se cerraron después usando grapas. Los animales se observaron con respecto a señales clínicas. Se realizó histopatología general cuando los animales se sacrificaron 5 días después. El tamaño de la herida se calculó por la siguiente fórmula:  $\frac{1}{2} a \times \frac{1}{2} b \times \pi$  en la que a y b son dos diámetros perpendiculares de la herida.

Actividad esporicida *in vitro*: Para evaluar la actividad esporicida de BCTP, se ensayaron esporas de cuatro especies de género *Bacillus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. megaterium* y *B. subtilis*. BCTP a una dilución 1:100 mostró más del 91% de actividad esporicida contra *B. cereus* y *B. megaterium* en 4 horas (Figura 16). *B. circulans* era menos sensible a BCTP mostrando 80% de reducción en el recuento de esporas, mientras que *B. subtilis* parecía resistente a BCTP en 4 horas. Se realizó una comparación del efecto esporicida de BCTP (a diluciones de 1:10 y 1:100) en esporas de *B. cereus* con una dilución 1:100 de lejía (es decir, hipoclorito sódico al 0,0525%) y no se pusieron de manifiesto diferencias significativas en la tasa o alcance del efecto esporicida. La otra nanoemulsión, X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC, fue más eficaz en la destrucción de esporas de *Bacillus*. A una dilución de 1:1000, mostró 98% de destrucción de esporas de *B. cereus* en 4 horas (en comparación con 47% con dilución 1:1000 de BCTP). X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC a dilución 1:1000 dio como resultado 97,6% de muerte de esporas de *B. subtilis* en 4 horas, a diferencia de su resistencia a BCTP.

**Ciclo temporal esporicida de *B. cereus*:** Se realizó un ciclo temporal para analizar la actividad esporicida de BCTP diluido 1:100 y X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC diluido 1:1000 contra *B. cereus* durante un periodo de 8 horas. La incubación de BCTP diluido 1:100 con esporas *B. cereus* dio como resultado una reducción del 77% en el número de esporas viables en una hora y una reducción del 95% después de 4 horas. De nuevo, X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC diluido 1:1000 fue más eficaz que BCTP 1:100 y dio como resultado aproximadamente el 95% de reducción en el recuento después de 30 minutos (Figura 17).

**Actividad esporicida de *B. anthracis* de BCTP:** Después de los experimentos *in vitro* iniciales, se ensayó la actividad esporicida de BCTP contra dos cepas virulentas de *B. anthracis* (Ames y Vollum 1B). Se descubrió que BCTP a una dilución final 1:100 incorporada en el medio de crecimiento inhibía completamente el crecimiento de 1x10<sup>5</sup> esporas de *B. anthracis*. Además, 4 horas de incubación con BCTP a diluciones de hasta 1:1000 con las esporas Ames o las Vollum 1 B dio como resultado más del 91% de actividad esporicida cuando las mezclas se incubaron a TA, y más del 96% de actividad esporicida cuando las mezclas se incubaron a 37 °C (Tabla 19).

**Tabla 19:** Actividad esporicida de BCTP contra dos cepas diferentes de esporas de *Bacillus anthracis* como se determina por ensayo de reducción de colonias (% de muerte). BCTP a diluciones de hasta 1:1000 destruyó eficazmente > 91% de ambas cepas de esporas en 4 horas a 27 o 37 °C; condiciones que difirieron notablemente en el grado de germinación de esporas. La actividad esporicida fue uniforme a concentraciones de esporas de hasta 1X10<sup>6</sup>/ml.

<i>B. anthracis</i>	Ames	Ames (cont)	Vollum 1 B	
	Temperatura ambiente	37 °C	Temperatura ambiente	37 °C
BCTP 1:10	91%	96%	97%	99%
BCTP 1:100	93%	97%	97%	98%
BCTP 1:1000	93%	97%	98%	99%

**Actividad esporicida de *B. anthracis* de X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC:** Puesto que X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC era eficaz a diluciones mayores y contra más especies de esporas de *Bacillus* que BCTP, se ensayó contra 4 cepas diferentes de *B. anthracis* a diluciones de hasta 1:10.000 a TA para evitar la germinación. X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC mostró máximo de muerte entre 86% y 99,9% a dilución 1:1000 (Tabla 20).

**Tabla 20:** Actividad esporicida de X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC contra 4 cepas diferentes de *B. anthracis* que representan diferentes aislados clínicos. Las esporas se trataron con X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC a diferentes diluciones en TA para reducir la germinación. No hay destrucción significativa a diluciones bajas. El máximo efecto esporicida se observó a dilución 1:1000.

<i>B. anthracis</i>	Sudáfrica	Bison, Canadá	Mozambique	Del Rio, Texas
X <sub>8</sub> W <sub>60</sub> PC 1:10	81,8	85,9	41,9	38
X <sub>8</sub> W <sub>60</sub> PC 1:100	84	88,9	96,5	91,3
X <sub>8</sub> W <sub>60</sub> PC 1:1000	98,4	91,1	99,9	86
X <sub>8</sub> W <sub>60</sub> PC 1:5.000	79,7	41,3	95,7	97,1
X <sub>8</sub> W <sub>60</sub> PC 1:10.000	52,4	80	ND	ND

**Examen por microscopía electrónica de las esporas:** Se llevaron a cabo investigaciones usando *B. cereus* porque es la más estrechamente relacionada con *B. anthracis*. El examen por microscopía electrónica de transmisión de las esporas *B. cereus* tratadas con BCTP diluido 1:100 en TSB durante cuatro horas reveló daño físico a las esporas de *B. cereus*, incluyendo alteración extensiva del revestimiento de la espora y corteza con distorsión y pérdida de densidad en el núcleo (Figura 18).

**Estimulación e inhibición de la germinación:** Para investigar el efecto del inicio de la germinación en el efecto esporicida de BCTP en esporas de *Bacillus*, los inhibidores de germinación D-alanina (Titball y Manchee, 1987; Foster y Johnston, 1990) y los estimuladores de germinación L-alanina e inosina (Shibata y col., 1976) se incubaron con las esporas y BCTP durante 1 hora. El efecto esporicida de BCTP se retardó en presencia de D-alanina 10 mM

y se aceleró en presencia de L-alanina 50  $\mu$ M e inosina 50  $\mu$ M (Figura 19).

Actividad esporicida *in vivo*: se ha usado previamente la infección por *Bacillus cereus* en animales experimentales como un sistema modelo para el estudio del carbunco y provoca una enfermedad similar a la infección de carbunco experimental (Welkos y col., 1986; Drobniewski, 1993; Burdon y Wende, 1960; Burdon y col., 1967; Fritz y col., 1995 y col., 1995; Welkos y Friedlander, 1988). Se desarrollaron dos modelos animales de enfermedad por *B. cereus* cutánea para evaluar la eficacia *in vivo* de BCTP. Debido a que estos modelos implican administración subcutánea de la nanoemulsión, se realizó ensayo de toxicidad *in vivo* de BCTP antes de esta aplicación. Los ratones CD-1 a los que se inyectó BCTP diluido 1:10 en solución salina como control no mostraron señales de tensión o reacción inflamatoria, en análisis general o histológico (Figura 20A, Figura 20B). Para ensayar el efecto patógeno de esporas de *B. cereus in vivo* y el efecto esporicida de BCTP, se mezcló una suspensión de  $4 \times 10^7$  esporas de *B. cereus* con solución salina o con BCTP a una dilución final de 1:10 y después se inyectó inmediatamente por vía subcutánea en la espalda de ratones CD-1. Los ratones que se infectaron por vía subcutánea con esporas de *B. cereus* sin BCTP desarrollaron edema grave a las 6-8 horas. Esto se siguió de un área necrótica gris que rodeaba el sitio de inyección a las 18-24 horas, con desprendimiento grave de la piel presente a las 48 horas, dejando una lesión de color rojo seca (Figura 20C, Figura 20D). La inyección simultánea de esporas y BCTP dio como resultado más del 98% de reducción del tamaño de la lesión necrótica de 1,68 cm<sup>2</sup> a 0,02 cm<sup>2</sup> cuando las esporas se premezclaron con BCTP. Esto se asoció con edema mínimo o inflamación (Figura 20E, Figura 20F).

En estudios adicionales, se infectó una herida cutánea de 1 cm con  $2,5 \times 10^7$  esporas de *B. cereus*, después se cerró sin ningún tratamiento adicional (Figura 21A, Figura 21B). Los otros grupos se infectaron en el mismo el número de esporas, después 1 hora más tarde las heridas se irrigaron con BCTP o solución salina para simular la descontaminación después de exposición. La irrigación de heridas infectadas de forma experimental con solución salina no dio como resultado ningún beneficio aparente (Figura 21C, Figura 21D). La irrigación por BCTP de heridas infectadas con esporas de *B. cereus* mostró beneficio sustancial, que dio como resultado una reducción uniforme del 98% en el tamaño de la lesión de 4,86 cm<sup>2</sup> a 0,06 cm<sup>2</sup> (Figura 21E, Figura 21F). Esta reducción del tamaño de la lesión se vio acompañada de una reducción cuádruple de la mortalidad (del 80% al 20%) en comparación con animales experimentales que no recibieron tratamiento o recibieron irrigación con solución salina.

## Ejemplo 12

### Efecto de relaciones lipídicas tensioactivas (SLPS) en infecciosidad de virus de gripe A *in vitro*

Los virus con envoltura suponen una gran preocupación como patógenos. Se propagan rápidamente y son capaces de sobrevivir fuera de un huésped durante periodos prolongados. El virus de gripe A se seleccionó porque es un modelo bien aceptado para ensayar agentes antivirales (Karaivanova y Spiro, 1998; Mammen y col, 1995; Huang y col, 1991). La gripe es un patógeno respiratorio clínicamente importante que es altamente contagioso y responsable de enfermedad pandémica grave (Mulder y Hers, 1972).

Las glicoproteínas de envoltura, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) no solo determinan la especificidad antigénica de los subtipos de gripe (Schulze, 1997), sino que mutan fácilmente y, como resultado, pueden permitir que el virus evada los sistemas de defensa del huésped. Esto puede dar como resultado el inicio de enfermedad en individuos que son inmunes para cepas estrechamente relacionadas. Lo siguiente es una descripción de los procedimientos y composiciones usados para determinar la eficacia de SLP en la prevención de infecciosidad por gripe A.

**Preparaciones lipídicas tensioactivas (SLP):** Las SLP se realizaron en un procedimiento de dos etapas. Se preparó una fase oleosa mezclando aceites de soja con reactivos enumerados en la Tabla 1 y calentando a 86 °C durante una hora (Florence, 1993). Las SLP se formaron después inyectando agua o bismuto 1% en agua (SS) a la fase oleosa a una relación de volumen/volumen usando una bomba de jeringa recíproca.

**Virus:** El Dr. Hunein F. Maassab (Escuela de Salud Pública, Universidad de Michigan) proporcionó amablemente el virus de la gripe A/AA/6/60 (Hedocher y col., 1996). El virus de gripe A se propagó en las cavidades alantoideas de huevos de gallina sin patógenos fertilizados (SPAFAS, Norwich, CT) usando procedimientos convencionales (Barrett e Inglis, 1985). La reserva de virus se mantuvo en alícuotas ( $10^8$  ufp/ml) de fluidos alantoideos infecciosos a -80 °C. Se proporcionó un vector adenoviral (AD.RSV ntlacZ) por Vector Core Facility (University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, MI) y se mantuvo en alícuotas ( $10^{12}$  ufp/ml a -80 °C). El vector se basa en una cadena principal genómica adenoviral humana (serotipo 5) suprimida de la secuencia de nucleótidos que abarca E1A y E1B y una parte de la región E3. Esto altera la capacidad de los virus para replicar o transformar células no permisivas. Porta el gen LacZ de *Escherichia coli*, que codifica  $\beta$ -galactosidasa, bajo el control del promotor de la repetición terminal larga de virus de sarcoma de Rous (RSV-LTR). Contiene un epítipo de dirección nuclear (designado nt) ligado en el extremo 5' del gen LacZ para facilitar la detección de la expresión proteica (Baragi y col., 1995).

**Células:** Se obtuvieron células de Riñón Canino Madin Darby (MDCK) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Rockville, MD) y se obtuvieron células 293 (CRL 1573; riñón humano embrionario primario transformado) de Vector Core Facility (University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, MI). Las células 293 expresan el gen transformante del adenovirus 5 y por lo tanto restaura la capacidad del vector Ad.RSV ntlacZ para replicar en la



célula huésped (Graham y col., 1977).

**Medio de mantenimiento celular:** se mantuvieron células MDCK en medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle, L-glutamina 2 mM y bicarbonato sódico 1,5 g/l (Mediatech, Inc., Herndon, VA) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS; Hyclone Laboratories, Logan, UT). El medio se complementó con aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1,0 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las células 293 mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Mediatech, Inc., Herndon, VA), que contenía L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato sódico 1,0 mM. También contenía penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y se complementó con FBS al 10% (Hyclone Laboratories, Logan, UT).

**Medios de infección por virus:** El medio de infección por gripe A fue el medio de mantenimiento de células MDCK (sin FBS) complementado con 3,0 µg/ml de tripsina tratada con tolilsulfonil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ). El medio de infección de adenovirus fue medio de mantenimiento de células 293 con una concentración reducida de suero (FBS al 2%).

**Medio de superposición de gripe A:** El medio de superposición consistía en cantidades iguales de medio de infección 2x y agarosa SEAKEM ME 1,6% (FMC BioProducts, Rockland, MD). El medio de superposición de agarosa de tinción consistía en medio de superposición de agarosa más 0,01% de solución roja neutra (Life Technologies, Gaithersburg, MD) sin tripsina tratada con TPCK.

**Ensayos de reducción de placas (PRA):** El ensayo de reducción de placas se realizó con una modificación del procedimiento descrito en otra parte (Hayden y col., 1980). Las células MDCK se sembraron a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en placas FALCON de 12 pocillos y se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> 5% durante 3 días. Se incubaron aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufp de virus de gripe A con preparaciones líquidas tensioactivas como se describe posteriormente. Los tratamientos y controles de virus de gripe A-SLP se diluyeron en medio de infección para contener 30-100 ufp/250 µl. Se inocularon monocapas de células confluentes por triplicado en 3 placas y se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> 5% durante 1 hora. El inóculo/medio se aspiró y se añadió 1 ml de medio de superposición de agarosa/pocillo y las placas se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> 5% hasta que aparecieron placas. Las monocapas se tiñeron con el medio de superposición de agarosa y se continuó la incubación a 37 °C/CO<sub>2</sub> 5%. Las placas se contaron 6-12 horas después de teñir. El recuento de placas medio de 9 pocillos con contracción de preparación lipídica se comparó con el recuento de placas medio de pocillos de virus no tratados.

**Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) celular *in situ*:** Para detectar y cuantificar proteínas virales en células MDCK infectadas con virus de gripe A, se optimizó el ELISA celular *in situ*. Brevemente, se añadieron  $2 \times 10^4$  células MDCK en 100 µl de medio completo a placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron durante una noche. Al día siguiente, el medio en inóculo se retiró y las células se lavaron con medio de mantenimiento sin suero. Se añadieron 100 µl de inóculo viral a los pocillos y se incubó durante 1 hora. El inóculo viral se retiró y se reemplazó con 100 µl de medio de mantenimiento de células MDCK más FBS al 2%. Las células MDCK infectadas se incubaron durante 24 horas adicionales. Después las células se lavaron una vez con PBS y se fijaron con mezcla helada de etanol:acetona (1:1) y se almacenó a -20 °C. El día del ensayo, los pocillos de células fijadas se lavaron con PBS y se bloquearon con leche en polvo 1% en PBS durante 30 minutos a 37 °C. Se añadieron 100 µl de anticuerpo policlonal antiviral de gripe A de hurón a dilución 1:1000 (proporcionada amablemente por el Dr. Hunein F. Maassab, School of Public Health, University of Michigan) a los pocillos durante 1 hora a 37 °C. Las células se lavaron 4 veces con tampón de lavado (PBS y TWEEN-20 0,05%) y se incubaron con 100 µl a dilución 1:1000 de anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-hurón de cabra (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MA) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron 4 veces y se incubaron con 100 µl de sustrato de ELISA 1-STEP TURBO TMB-ELISA (Pierce, Rockford, IL) hasta que se reveló el color. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1 N y las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microtitulación de ELISA.

**Ensayo de β-galactosidasa:** se realizó ensayo de β-galactosidasa en extractos celulares como se describe en otra parte (Lim, 1989). Brevemente, se sembraron células 293 en placas de cultivo tisular de fondo en "U" de 96 pocillos a aproximadamente  $4 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron durante una noche a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5% en medio de mantenimiento. El día siguiente, el medio se retiró y las células se lavaron con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS). Se diluyó la reserva de adenovirus en medio de infección a una concentración de  $5 \times 10^7$  ufp/ml y se mezcló con diferentes concentraciones de BCTP como se describe posteriormente. Después del tratamiento con BCTP, el virus se diluyó con medio de infección a una concentración de  $1 \times 10^4$  ufp/ml y se superpuso en células 293. Las células se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> 5% durante 5 días, después de lo cual las placas se centrifugaron, el medio se retiró y las células se lavaron tres veces con PBS sin Ca++ y Mg++. Después del tercer lavado, el PBS se aspiró y se colocaron 100 µl de tampón de lisis indicador 1x (Promega, Madison, WI) en cada pocillo. Para potenciar la lisis celular, las placas se congelaron y descongelaron tres veces y se realizó el ensayo de β-galactosidasa siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor de β-galactosidasa (Promega, Madison, WI) con algunas modificaciones. Se transfirieron cinco microlitros del extracto celular a una placa de fondo plano de 96 pocillos y se mezcló con 45 µl de tampón de lisis indicadora 1x (1:10). Posteriormente se añadieron 50 µl del tampón de ensayo 2x (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, β-mercaptoetanol 100 mM, ONPG 1,33

mg/ml (Sigma, St. Louis, MO) y se mezclaron con extracto celular. Las placas se incubaron a TA hasta que se reveló un color amarillo pálido. En ese momento la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de bicarbonato sódico 1 M. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 420 nm en un lector de microplaca de ELISA. Se procesó con todos los ensayos un patrón, que consistía en β-galactosidasa (u/µl (Sigma, St. Louis, MO) complementado con tampón de bicina 50 mM (Sigma, St. Louis, MO), pH 7,5 y BSA 100 µg/ml diluido en el tampón de lisis indicador 1x. Las unidades de β-galactosidasa en cada extracto celular se calcularon por análisis de regresión por referencia a los niveles en el patrón y dividido por miligramos de proteína en la muestra de extracto celular.

**Toxicidad celular y tratamiento de virus con preparaciones lipídicas:** Antes del ensayo de susceptibilidad viral, se evaluó la citotoxicidad de SLP en células MDCK y 293 mediante inspección por microscopio y ensayo de MTT. Las diluciones de la mezcla de virus y SLP aplicadas en ensayos de susceptibilidad se realizaron para ser al menos un orden de magnitud mayores que la concentración segura de SLP evaluada. Se incubaron aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufp de gripe A o adenovirus con preparación lipídica a concentraciones finales de 1:10, 1:100 y 1:1000 durante periodos de tiempo diferentes como se indica en los resultados en un agitador. Después de incubación, se realizaron diluciones en serie de la mezcla de SLP/virus en medio de infección apropiado y se superpusieron en células MDCK (gripe A) o 293 (adenovirus) para realizar PRA, ELISA celular o ensayos de β-galactosidasa como se ha descrito anteriormente.

**Microscopía electrónica:** Se semipurificó virus de gripe A de fluido alantoides pasando a través de un colchón de sacarosa al 30% preparado con GTNE (glicina 200 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), NaCl 100 mM y EDTA 1 mM) usando ultracentrifugación (rotor Beckman SW 28 Ti, a 20.000 rpm durante 16 horas). Los virus sedimentados se reconstituyeron en GTNE. Se incubaron diez microlitros de muestras respectivas (adenovirus, virus de la gripe, adenovirus + BCTP, virus de la gripe + BCTP) durante 15 y 60 minutos, después se situaron en rejillas de cobre de malla 200 revestidas con parlodian durante 2 minutos. Después se añadieron 5 µl de glutaraldehído tamponado-cacodilado al 2%. El fluido se retiró con papel de filtro después de 3 minutos. Se añadieron diez microlitros de acetato de uranilo al 7% a la rejilla y se retiró con papel de filtro después de 30 segundos. Se permitió que las rejillas se secaran durante 10 minutos y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM400T. Se registraron microfotografías en película Fuji FG a aumentos de 200.000 x.

**Ensayos de susceptibilidad de gripe A a SLPS:** se investigó el efecto de cuatro preparaciones lipídicas tensioactivas (BCTP, NN, W<sub>80</sub>8P y SS) en infección por gripe A de células MDCK. Todas las preparaciones ensayadas inhibieron infección por virus de gripe A en diversos grados como se muestra en la Figura 22. BCTP y SS mostraron más del 95% de inhibición de infección por gripe A a una dilución 1:10. NN y W<sub>80</sub>8P mostraron solamente un efecto intermedio en virus de gripe A, reduciendo la infección aproximadamente el 40%. El efecto virucida de BCTP no disminuyó incluso a una dilución 1:100. SS mostró menos efecto a una dilución 1:100 inhibiendo la infección por gripe A el 55%. Estas dos preparaciones líquidas a dilución 1:1000 presentaron solamente efecto inhibidor débil en la infecciosidad del virus al intervalo de 22-29% (Figura 23B).

Puesto que BCTP y SS mostraron ambos fuerte efecto inhibidor en la infecciosidad de virus, se usó PRA para verificar los datos obtenidos del ELISA celular. El PRA confirmó la eficacia de BCTP y SS. BCTP redujo el número de placas de una media de 50,88 a 0 a una dilución 1:10 (Tabla 21). A dilución 1:100, BCTP mantuvo la eficacia virucida. A dilución 1:100 SS redujo el número de placas solamente aproximadamente el 7% en comparación con virus no tratados.

Tabla 21

Tratamiento	Unidades formadoras de placas	Unidades formadoras de placas
Dilución del agente:	BCTP	SS
1:10 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup> (+ / - 0,00) <sup>c</sup>	0,00 (+ / - 0,00)
1:100	0,00 (+ / - 0,00)	1,55 (1-0,12)
Virus sin tratamiento	50,88 (+ / - 1-0,25)	23,52 (+ / - 0,18)
<sup>a</sup> El virus se incubó con SLP durante 30 minutos.		
<sup>b</sup> Número de placas.		

**Cinética de la acción de BCTP en virus de gripe A:** Para investigar el tiempo requerido para que BCTP actúe en la infecciosidad de gripe A, el virus se incubó con BCTP a dos diluciones (1:10, 1:100) y cuatro intervalos de tiempo diferentes (5, 10, 15, 30 minutos). Posteriormente, se realizó ensayo de reducción de placas. Como se muestra en la Tabla 22, después de cinco minutos de incubación con BCTP a una de las diluciones, se anuló completamente la infecciosidad del virus de gripe A de células MDCK. No hubo diferencias significativas entre la interacción de BCTP con virus de gripe A independientemente de la concentración o el tiempo.

Tabla 22

Tratamiento con BCTP/dilución			
Tiempo (minutos)	1:10	1:100	Sin tratamiento
5	0,00 <sup>a</sup> (+ / -0,00) <sup>b</sup>	0,00 (+ / -0,00)	35,25 (+ / -0,94)
10	0,00 (+ / -0,00)	0,25 (+ / -0,12)	39,25 (+ / -1,95)
15	0,00 (+ / -0,00)	0,25 (+ / -0,12)	31,50 (+ / -1,05)
30	0,00 (+ / -0,00)	0,00 (+ / -0,00)	26,50 (+ / -0,08)

**Eficacia anti-gripe A de BCTP:** Puesto que el detergente TRITON X-100 tiene actividad antiviral (Maha e Igarashi, 1997; Portocala. y col, 1976), se investigó si TRITON X-100 solo o combinado con componentes de BCTP individuales inhibe la infecciosidad de gripe A en el mismo grado que BCTP. El virus de gripe A se trató con: 1) BCTP, 2) la combinación de tri (n-butil) fosfato, TRITON X-100 y aceite de soja (TTO), 3) TRITON X-100 y aceite de soja (TO), o 4) TRITON X-100 (T) solo. BCTP fue significativamente más eficaz contra virus de gripe A a diluciones 1:10 y 1:100 (dilución de TRITON X-100 de 1:500 y 1:5000) que TRITON X-100 solo o mezclado con los otros componentes ensayados (Figura 23). A la dilución 1:1000, BCTP (dilución de TRITON X-100 de 1:50.000) fue capaz de reducir la infección por gripe A de células MDCK en aproximadamente 50% mientras que TRITON X-100 solo a la misma concentración era completamente ineficaz.

**BCTP no afecta a la infecciosidad de virus sin envoltura:** Para investigar si BCTP puede afectar a la infecciosidad de virus sin envoltura, se usó adenovirus modificado por ingeniería genética que contenía gen LacZ, que codificaba  $\beta$ -galactosidasa. Esta construcción de adenovirus fue deficiente en el gen transformante y por lo tanto puede replicar y transformar solamente células permisivas que contienen el gen transformante de adenovirus 5. Las células 293, que expresan de forma constitutiva gen transformante, se emplearon para promover la replicación de adenovirus y producción de enzima  $\beta$ -galactosidasa. Como se muestra en la Figura 24, el tratamiento con BCTP no afectó a la capacidad del adenovirus para replicar y expresar actividad  $\beta$ -galactosidasa en células 293. Los adenovirus tanto tratados como no tratados con BCTP produjeron aproximadamente 0,11 unidades de enzima  $\beta$ -galactosidasa.

**Acción de BCTP en virus con envoltura:** Puesto que BCTP solamente alteró la infecciosidad de virus con envoltura, la acción de esta nanoemulsión en la integridad del virus con envoltura se investigó adicionalmente usando microscopía electrónica. Como se muestra en la Figura 25D, después de una incubación de 60 minutos con dilución 1:100 de BCTP, la estructura de adenovirus no cambia. Se localizaron varios viriones de gripe A reconocibles después de 15 minutos de incubación con BCTP (Figura 25B), sin embargo, no se encontraron viriones de gripe A reconocibles después de 1 hora de incubación. La eficacia de BCTP contra virus de gripe A y su mínima toxicidad para las membranas mucosas demuestra su potencial como un desinfectante eficaz y agente para la prevención de enfermedades resultantes de la infección con virus con envoltura.

### Ejemplo 13

#### Efectos de la temperatura y EDTA en el tratamiento con W205EC de *S. typhimurium*

Las Figuras 31 y 32 muestran el tratamiento de Salmonella con diferentes emulsiones de la presente invención con la adición de EDTA al 0,1%. El EDTA mejoró la actividad bactericida de la emulsión tanto a 40 °C (Figura 32) como a 50 °C (Figura 33). Las emulsiones se ensayaron a diluciones al 10,0%, 1,0% y 0,1%.

### Ejemplo 14

#### Propiedades antimicrobianas de X8PC y W205EC

Como se ha descrito anteriormente, la emulsión **X8PC** está compuesta de aproximadamente 8% en volumen de TRITON X-100, aproximadamente de 8% en volumen de TBP, aproximadamente 1% de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite de soja y aproximadamente 19% en volumen de DiH<sub>2</sub>O y la emulsión W<sub>20</sub>5EC está compuesta de aproximadamente 5% en volumen de TWEEN 20, de aproximadamente 8% en volumen de etanol, de aproximadamente 1% en volumen de CPC, aproximadamente 64% en volumen de aceite (por ejemplo, aceite de soja) y aproximadamente 22% en volumen de DiH<sub>2</sub>O. **X8PC** y W<sub>20</sub>5EC se ensayaron con respecto a su capacidad para reducir el crecimiento de varios microorganismos en diversas condiciones. La Figura 35 muestra la reducción logarítmica de *Mycobacterium fortuitum* por **X8PC** a diluciones del 10%, 1% y 0,1% a temperatura ambiente y 37 °C.

Una emulsión del 2% de W<sub>20</sub>5EC (con y sin Natrosol 1%, 2% y 3%) mostró en cada caso una reducción logarítmica de aproximadamente 2 en *E. coli* tanto para bacterias secas como húmedas después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. Una emulsión al 2% de W<sub>20</sub>5EC (con y sin Natrosol 1%, 2% y 3%) mostró en cada caso una reducción logarítmica de aproximadamente 4 en *S. aureus* para bacterias tanto húmedas como secas después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. Una emulsión al 2% de W<sub>20</sub>5EC (con y sin Natrosol 1%, 2% y 3%) mostró en cada caso una reducción logarítmica de aproximadamente 3 en *N. gonorrhoeae*.

para bacterias húmedas después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente.

Se realizó un experimento de superficie de goma para ensayar la actividad bactericida de  $W_{20}5EC$  al 1% a múltiples temperaturas y diluido en diferentes tipos de agua. Se embadurnó una superficie de 30,48 centímetros con 20 g de rascaduras de goma. Se pulverizó manualmente *S. typhimurium* en la superficie y se permitió que secase durante 20 minutos. El tratamiento se aplicó en tres intervalos de un minuto con una pausa de un minuto de tiempo entre cada intervalo. Se permitió un periodo de incubación de diez minutos a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la Figura 36. Los datos demuestran que  $W_{20}5EC$  es eficaz usando  $DiH_2O$ , agua destilada y agua del grifo a cada temperatura ensayada.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan en el presente documento por referencia. Diversas modificaciones y variaciones del procedimiento y sistema descritos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia sin alejarse del ámbito y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debería entenderse que la invención como se reivindica no se limitará indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que estén dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en los campos relevantes.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una emulsión de aceite en agua, comprendiendo dicha emulsión de aceite en agua:
  - 5 a) agua;
  - b) aceite;
  - c) un alcohol;
  - d) un tensioactivo; en el que dicho tensioactivo es un tensioactivo de polisorbato; y
  - e) un compuesto que contiene halógenos catiónicos.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende:
  - 10 a) agua;
  - b) aceite;
  - c) un tensioactivo, en el que dicho tensioactivo está seleccionado del grupo que consiste en polioxietilensorbitán monolaurato (TWEEN 20) y polioxietilensorbitán monooleato (TWEEN 80); y
  - d) un compuesto que contiene halógenos catiónicos.
3. La composición de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho aceite comprende un aceite seleccionado del grupo que consiste en un aceite vegetal, aceite de pescado, aceite saporífero, vitaminas insolubles en agua y aceite mineral.
4. La composición de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho aceite vegetal está seleccionado del grupo que consiste en aceite de soja, aceite de aguacate, aceite de linaza, aceite de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de escualeno, aceite de oliva, aceite de canola, aceite de maíz, aceite de colza, aceite de cártamo y aceite de girasol.
  - 20
5. La composición de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende:
  - 25 a) aproximadamente 64% en volumen de aceite;
  - b) aproximadamente 8% en volumen de etanol;
  - c) aproximadamente 5% en volumen de tensioactivo, en el que dicho tensioactivo está seleccionado del grupo que consiste en polioxietilensorbitán monolaurato (TWEEN 20) y polioxietilensorbitán monooleato (TWEEN 80);
  - d) aproximadamente 1% en volumen de cloruro de cetilpiridinio; y
  - e) agua.
6. La composición de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición comprende una dilución de dicha emulsión de aceite en agua.
  - 30
7. La composición de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha dilución es una dilución al 10%, 1,0% o 0,1%.
8. Una composición de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, en la que la enfermedad está seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad provocada por un patógeno bacteriano, una enfermedad provocada por un patógeno viral y una enfermedad provocada por un patógeno fúngico.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que el patógeno bacteriano es una bacteria Gram negativa.
  - 35
10. La composición de la reivindicación 9, en la que la bacteria Gram negativa está seleccionada del grupo que consiste en una bacteria del género *Vibrio*, una bacteria del género *Salmonella*, una bacteria del género *Shigella*, una bacteria del género *Neisseria* y una bacteria del género *Pseudomonas*.
11. La composición de la reivindicación 8, en la que el patógeno bacteriano es una bacteria Gram positiva.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que la bacteria Gram positiva está seleccionada del grupo que consiste en una bacteria del género *Bacillus*, una bacteria del género *Staphylococcus*, una bacteria del género *Clostridium* y una bacteria del género *Haemophilus*.
  - 40
13. La composición de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como un medicamento.

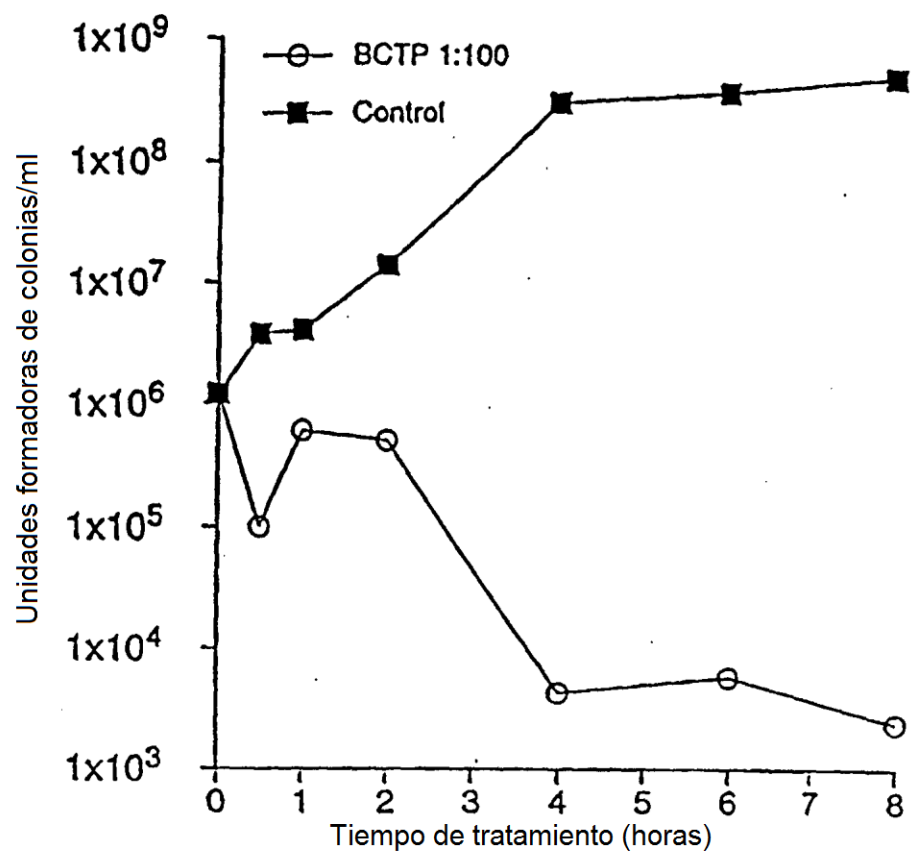


FIG. 1



FIG. 2A

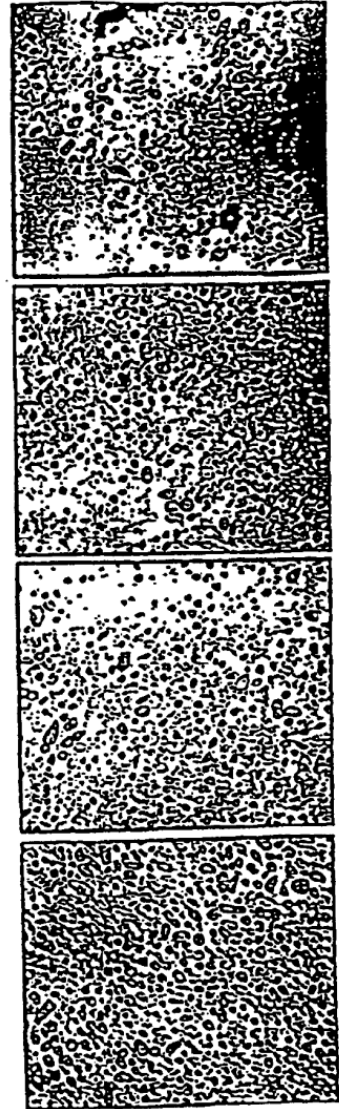
Tiempo cero



Esporas  
de control

FIG. 2B

1 hora      2 horas      4 horas      6 horas



Esporas tratadas  
con BCTP

FIG. 2

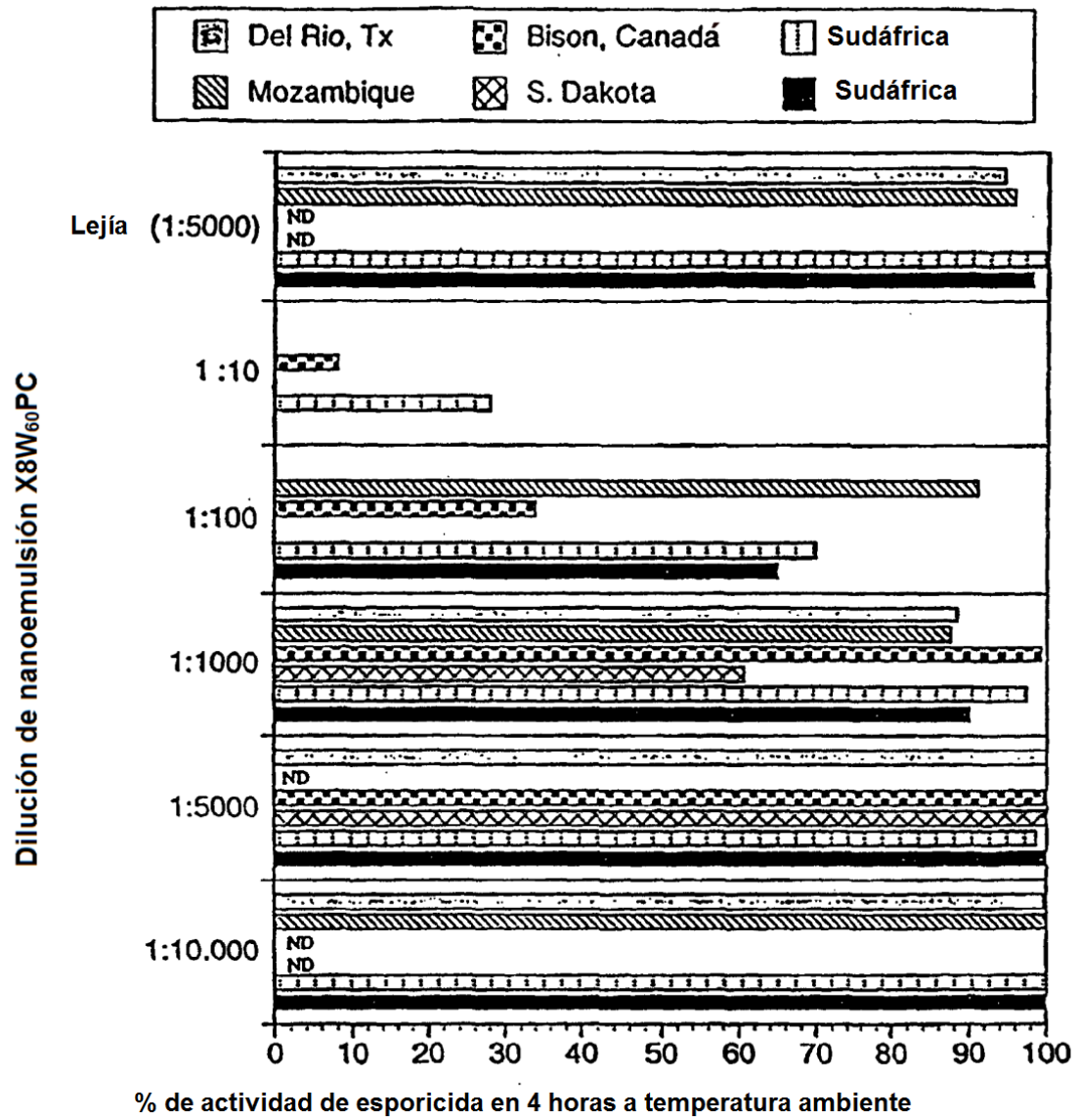


FIG. 3



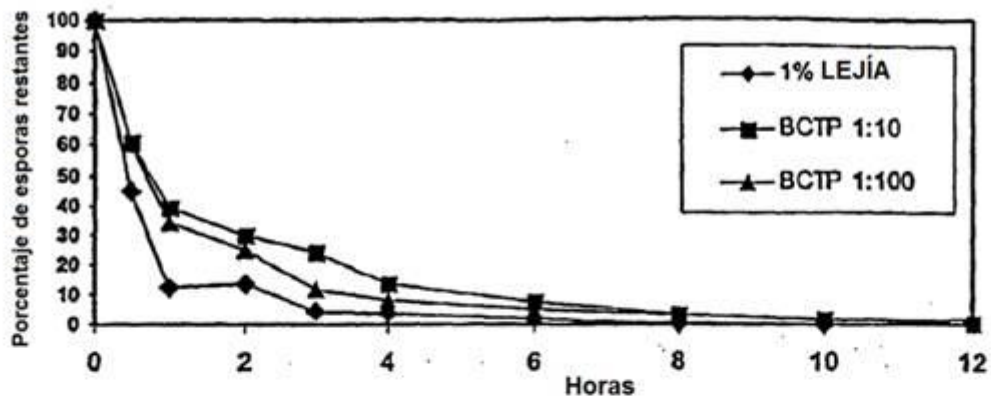


FIG. 4

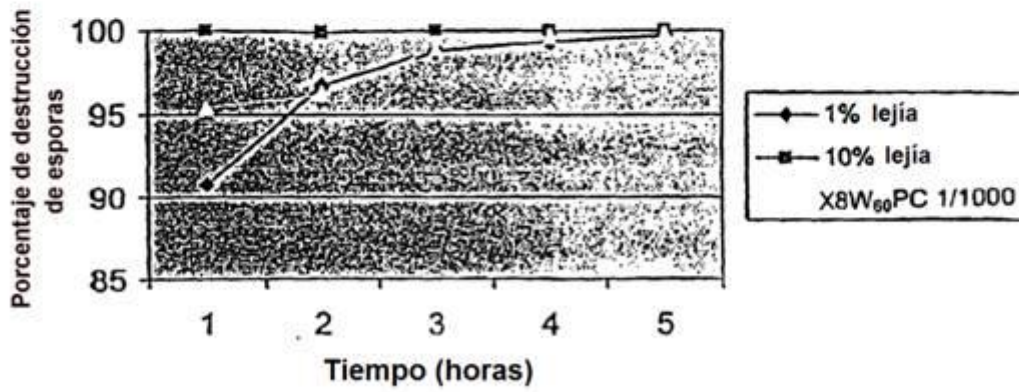


FIG. 5

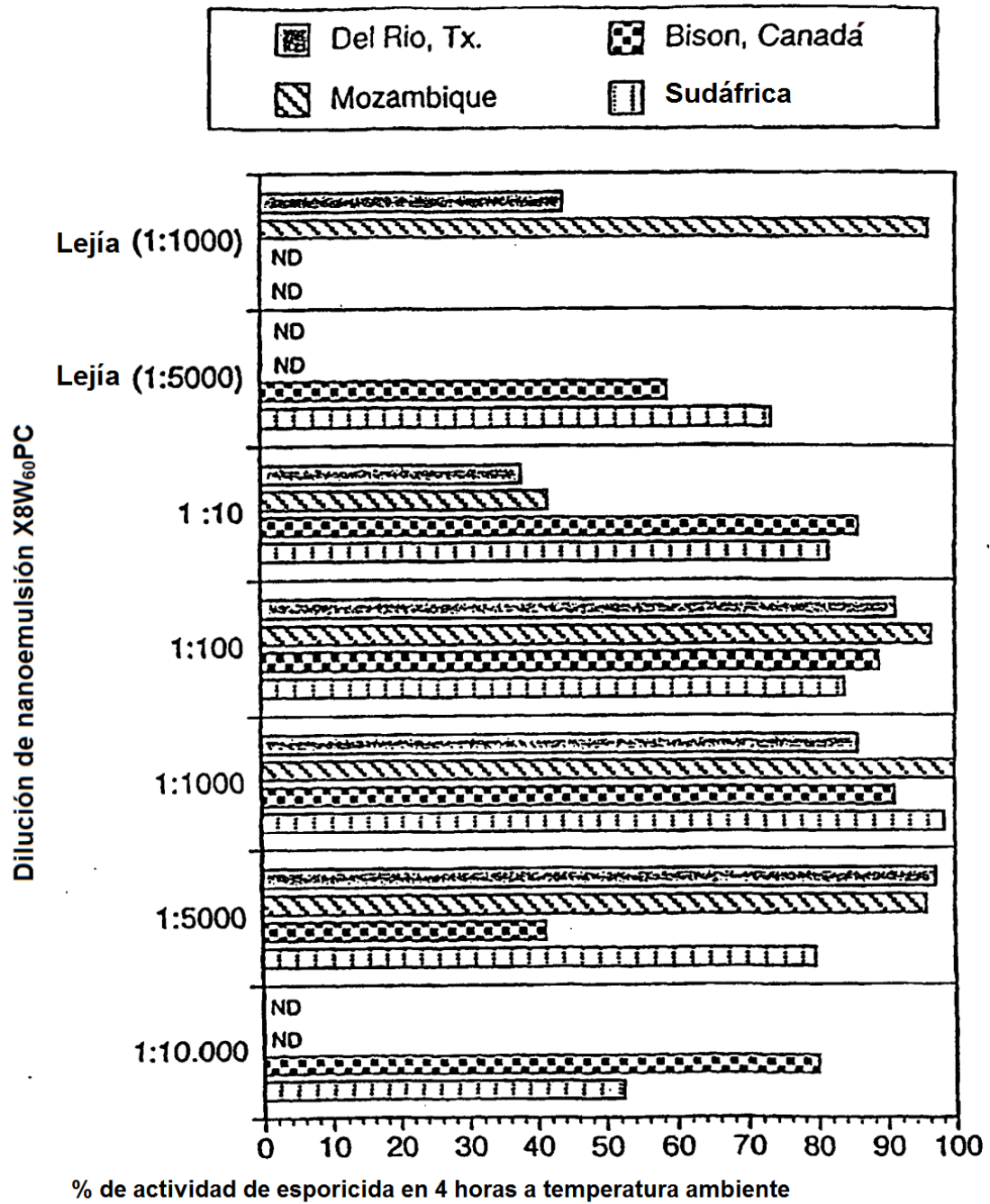


FIG. 6

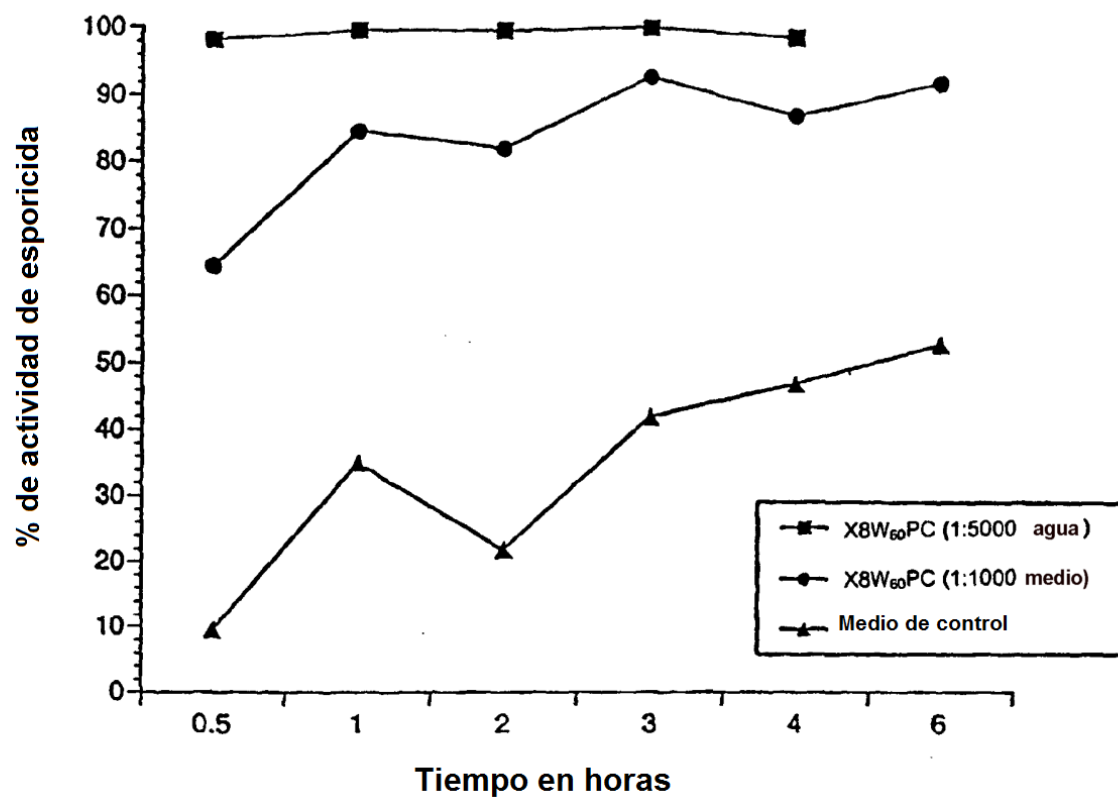
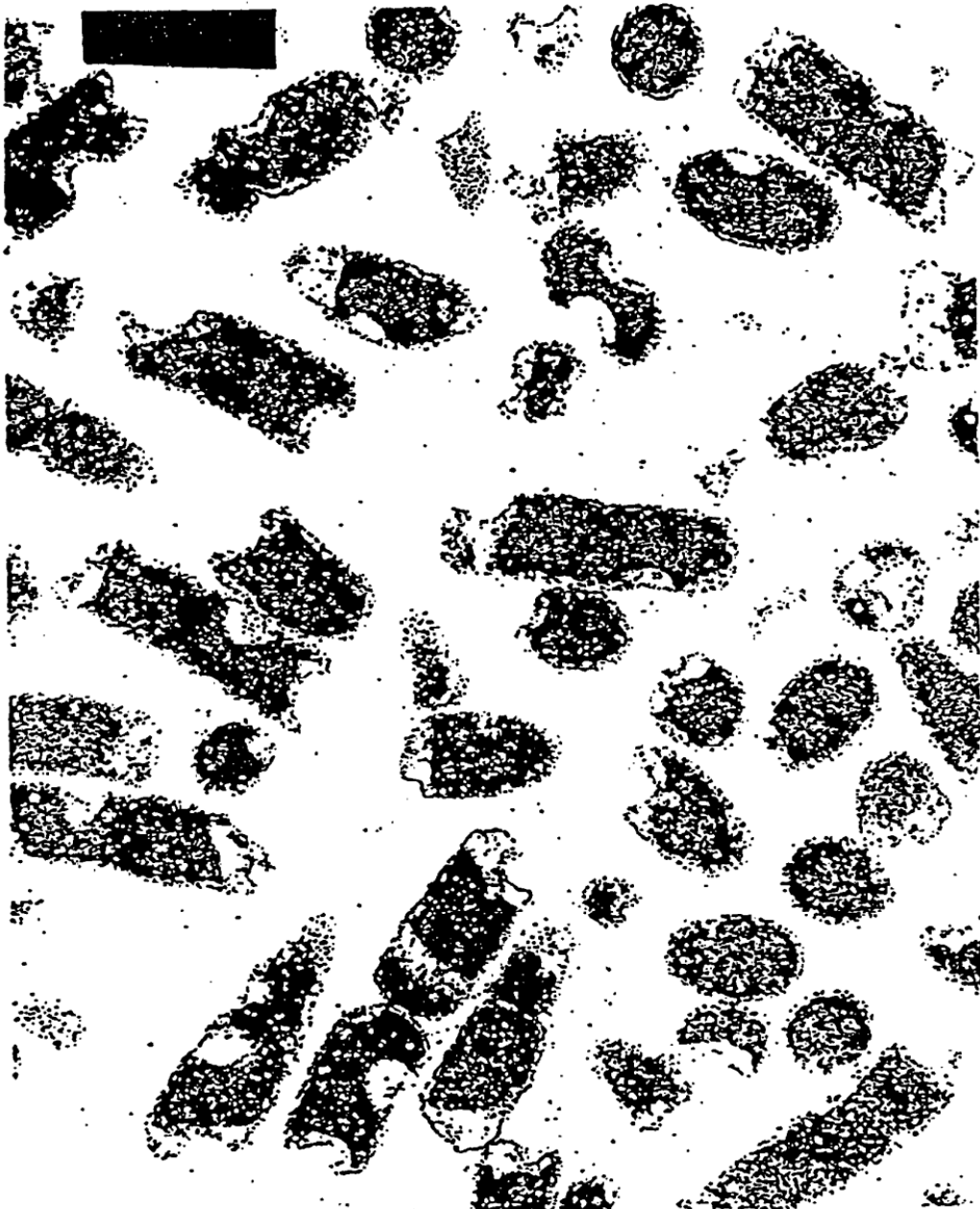


FIG. 7



**FIG. 8**



FIG. 9

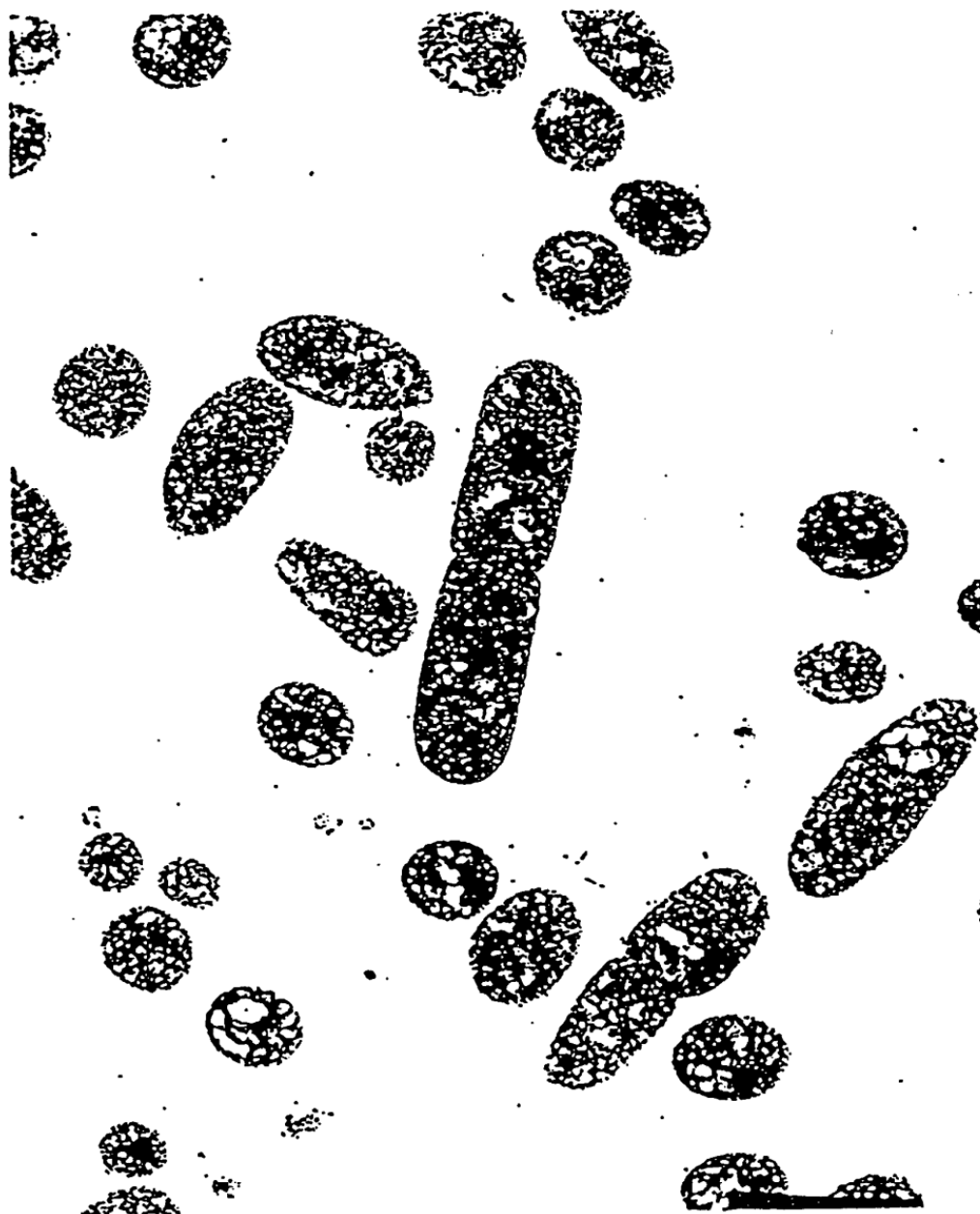


FIG. 10



FIG. 11



FIG. 12





FIG. 13

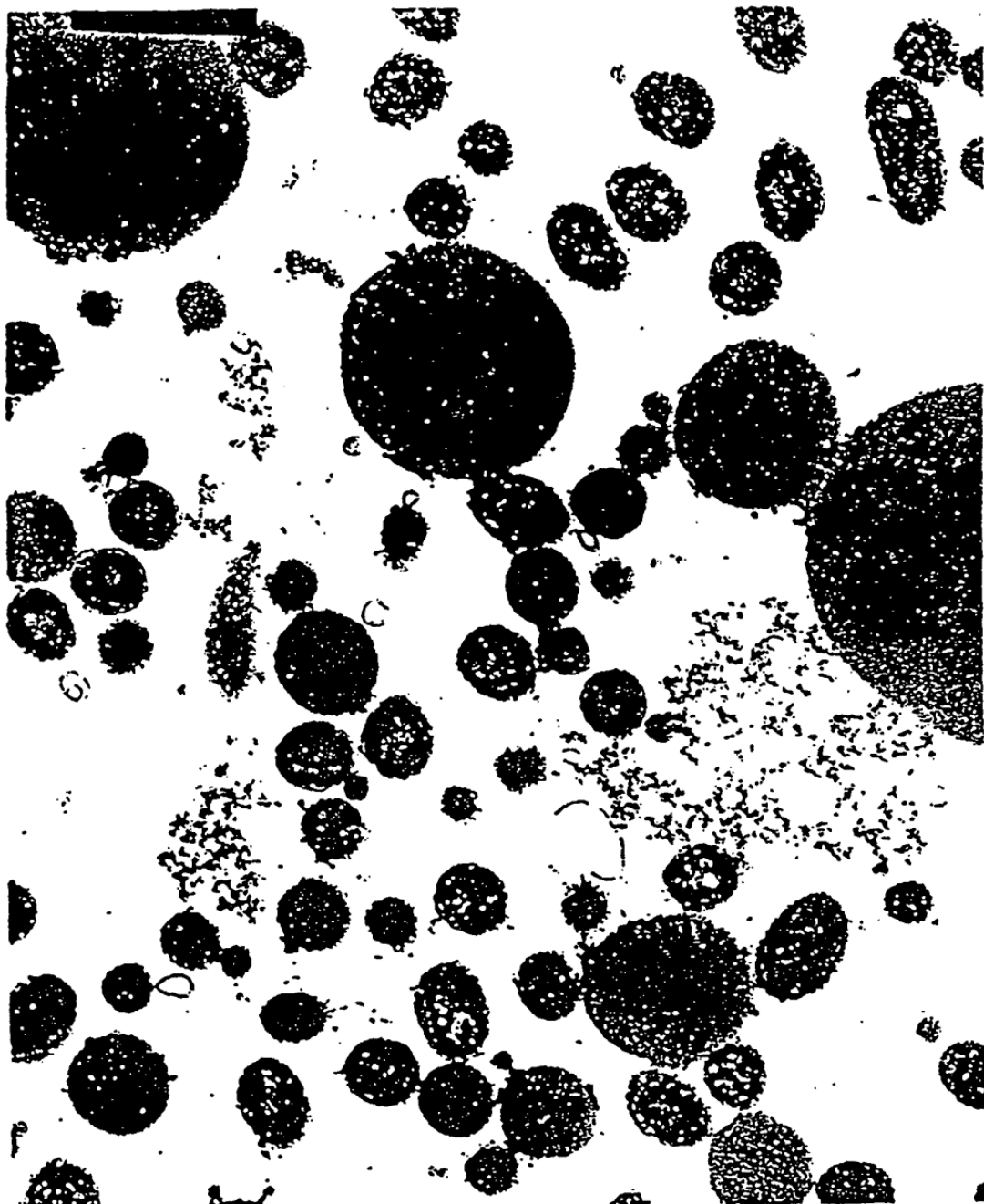


FIG. 14

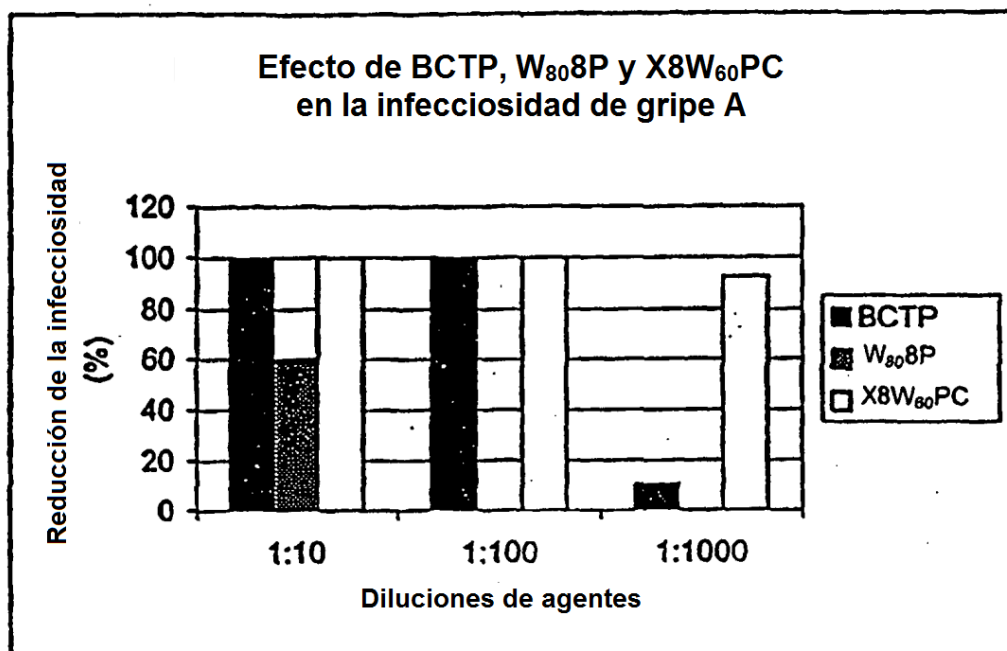


FIG. 15

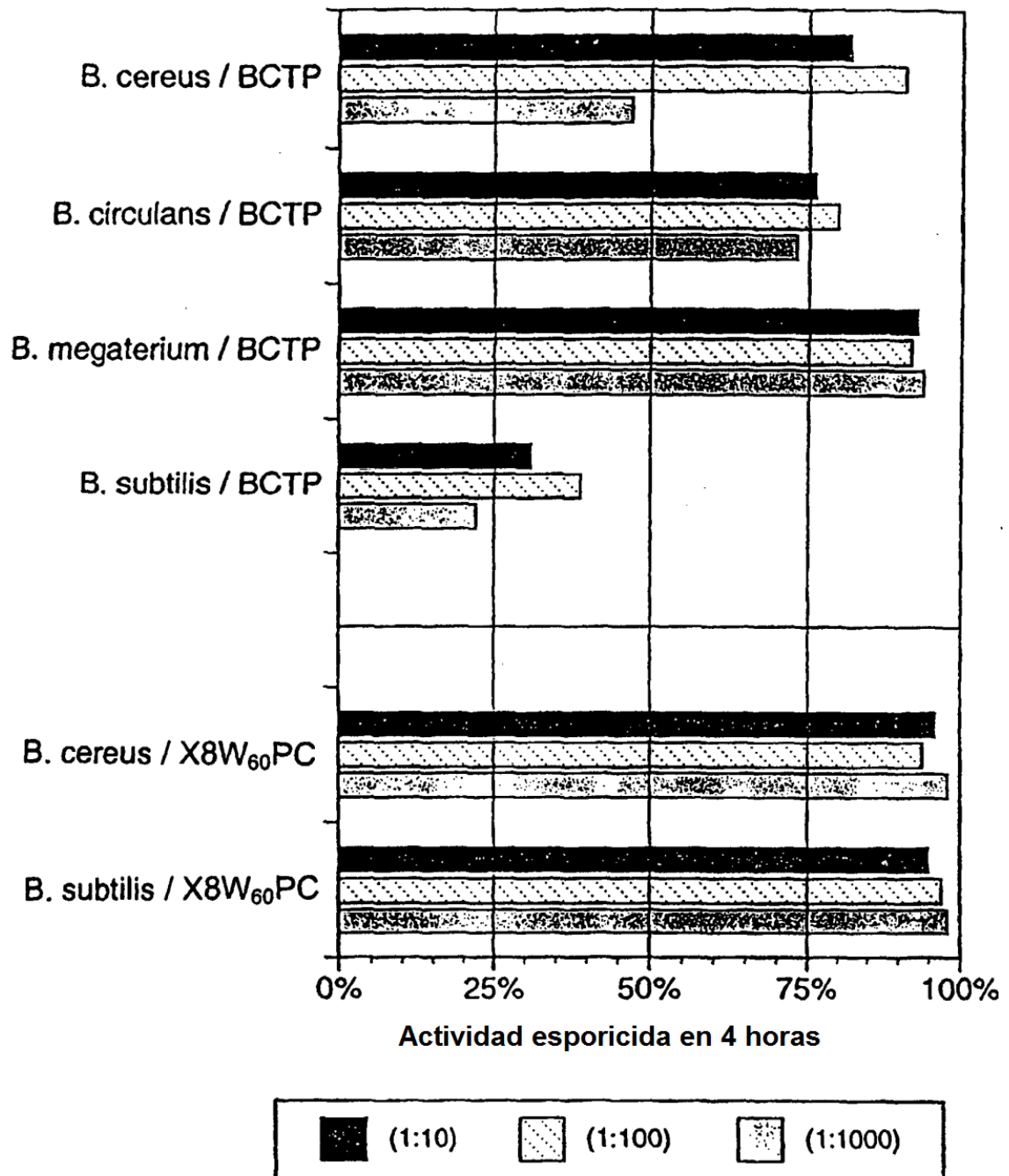


FIG. 16

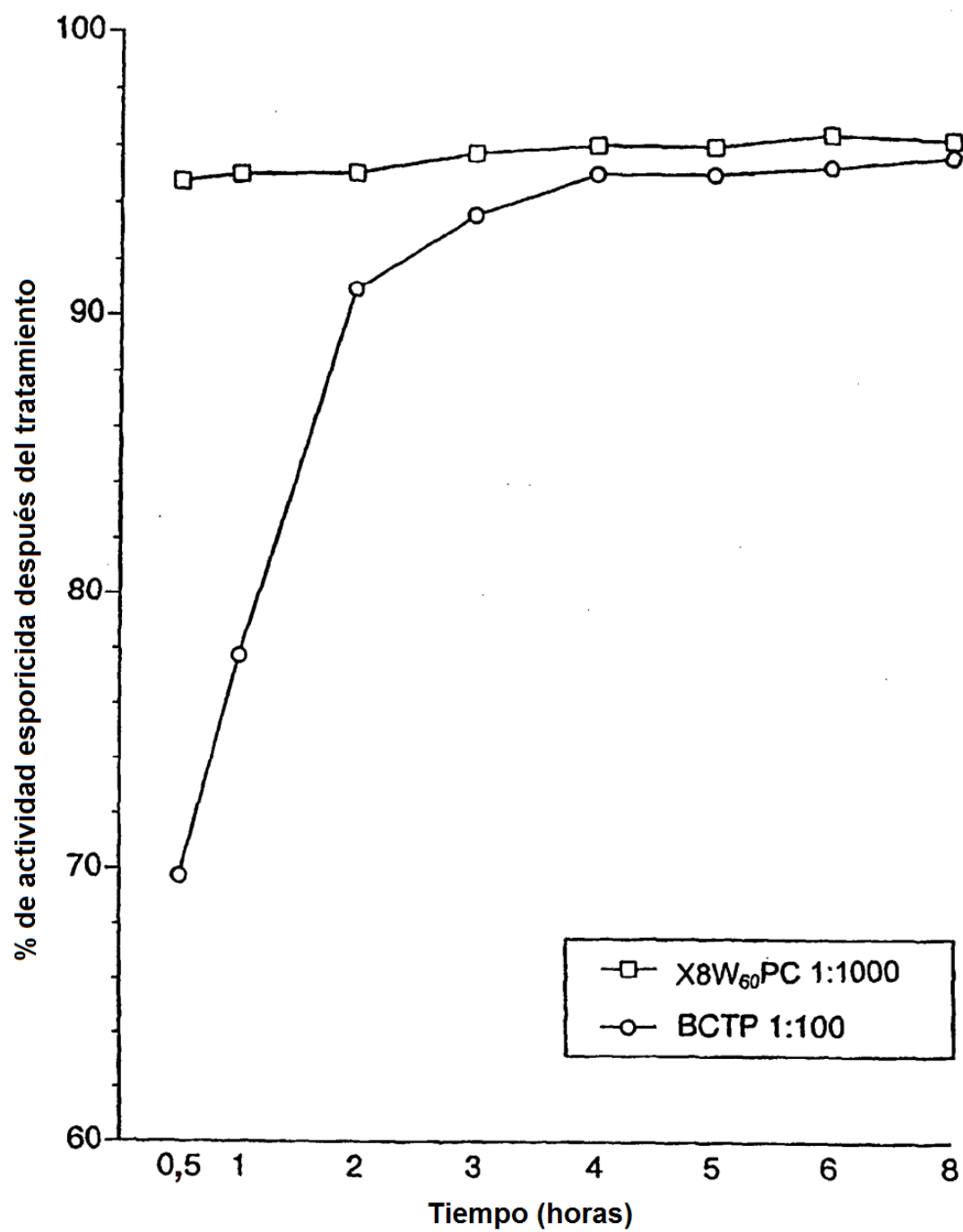


FIG. 17

Pre-tratamiento

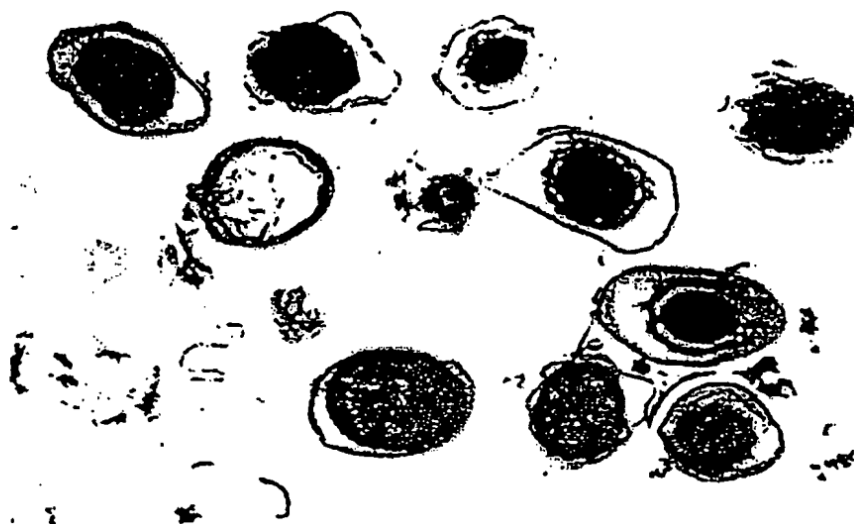


FIG. 18A

Post-tratamiento



FIG. 18B

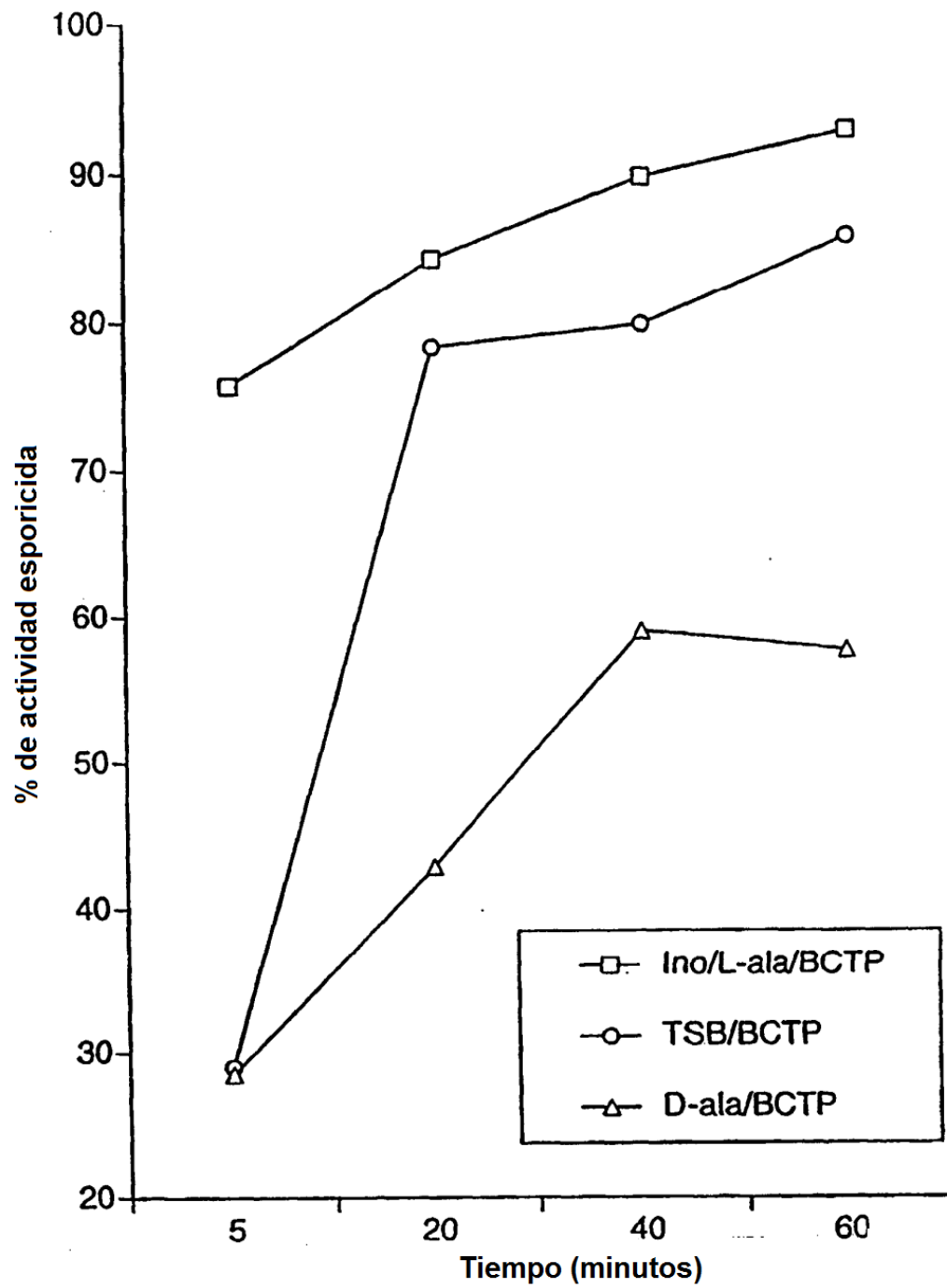


FIG. 19



Figura 20 A - F



FIG. 20A



FIG. 20B

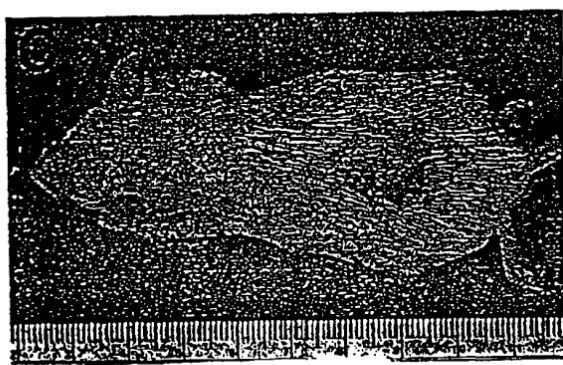


FIG. 20C

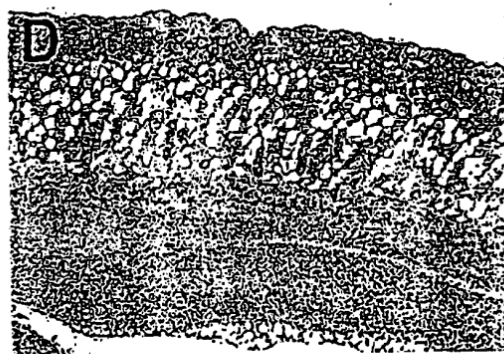


FIG. 20D

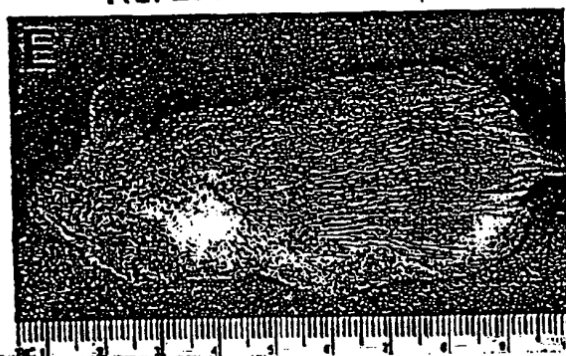


FIG. 20E



FIG. 20F



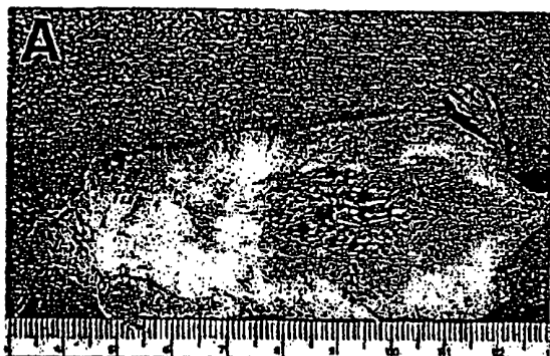


FIG. 21A



FIG. 21B

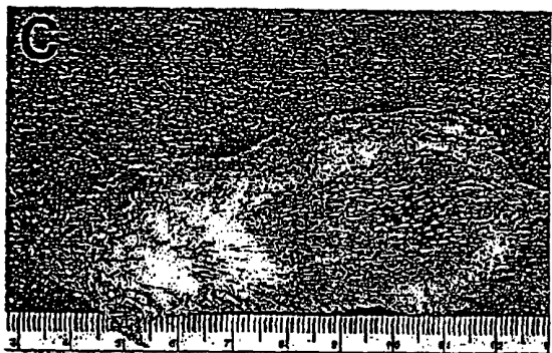


FIG. 21C

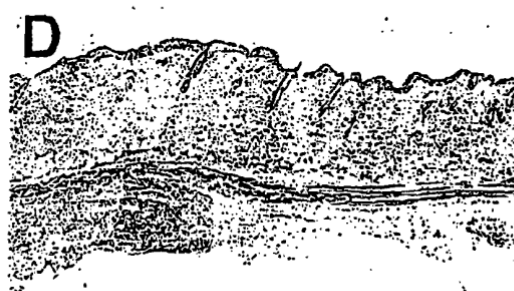


FIG. 21D

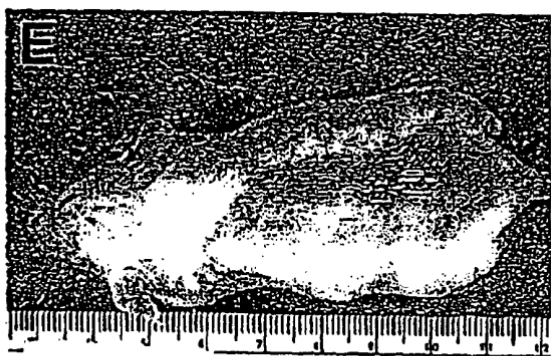


FIG. 21E



FIG. 21F

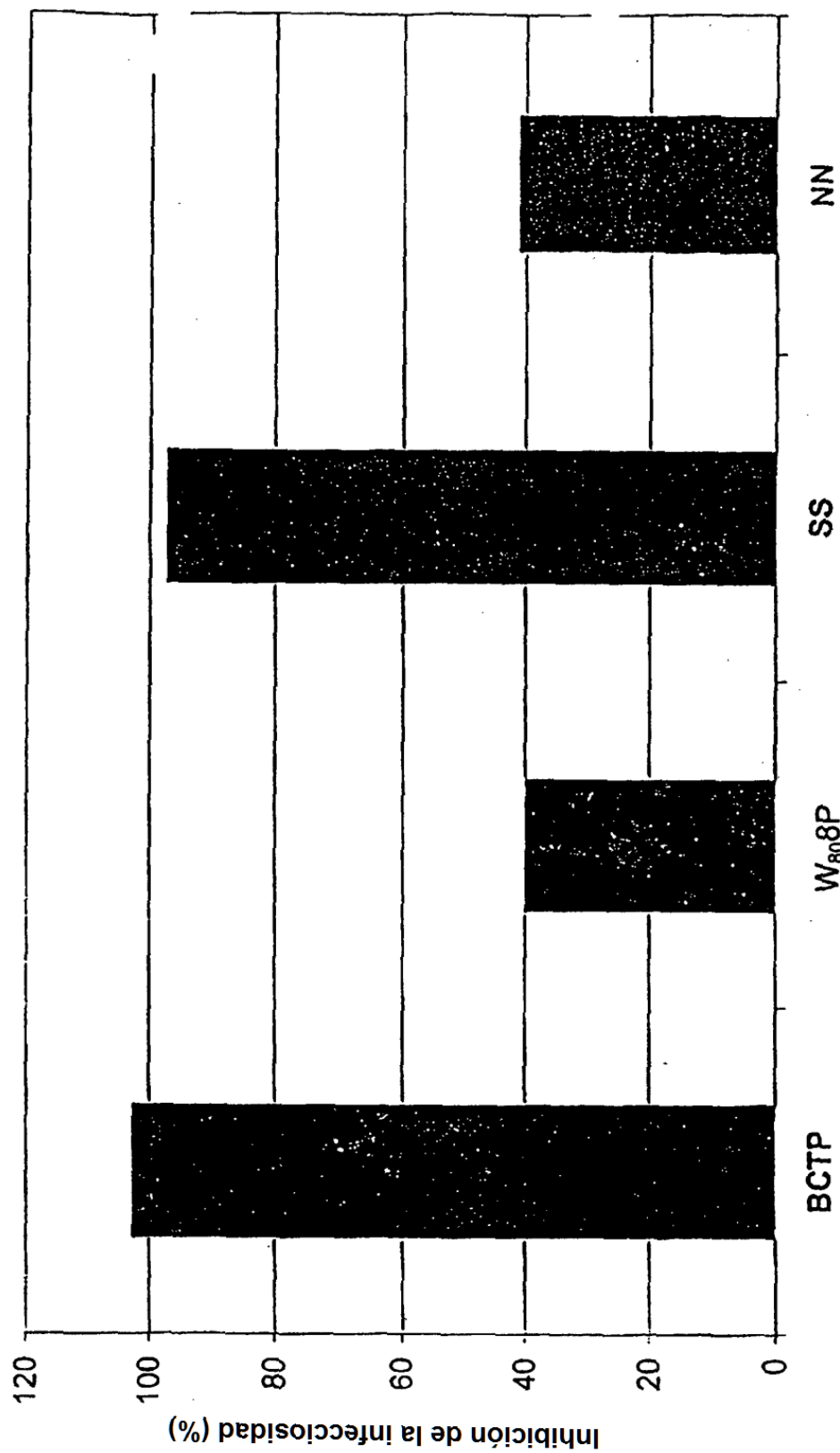


FIG. 22A

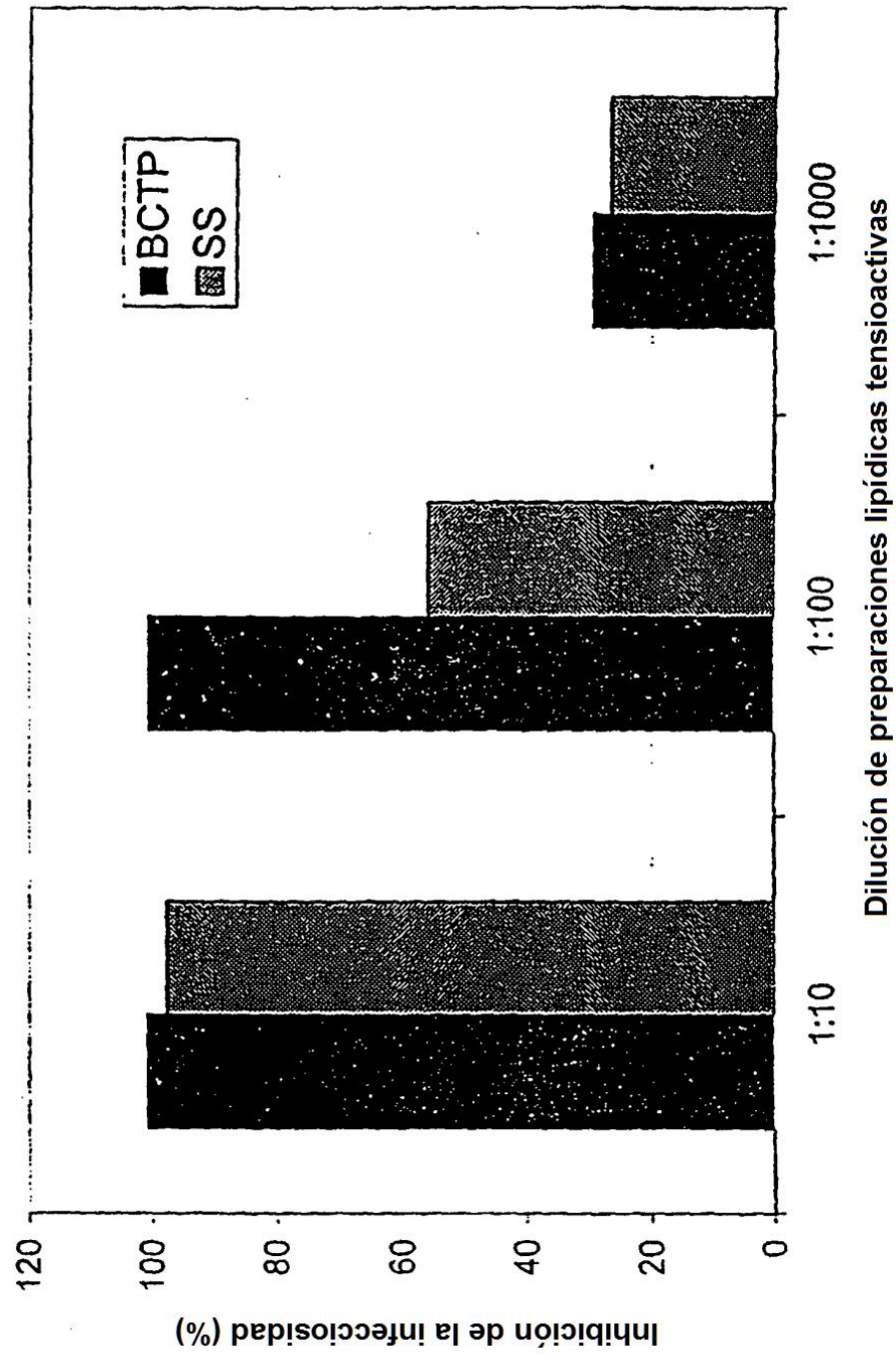
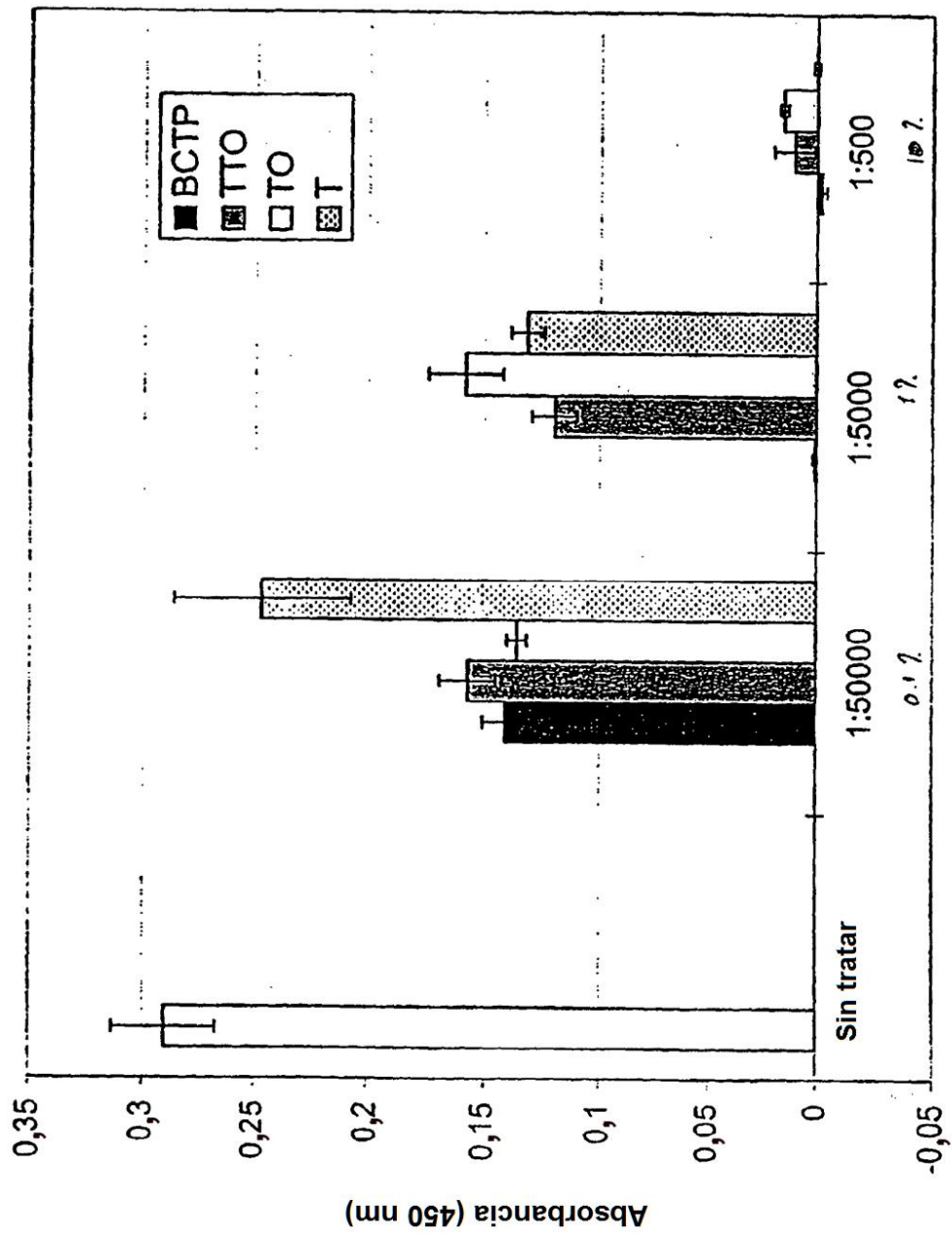


FIG. 22B



Dilución de triton X-100

FIG. 23

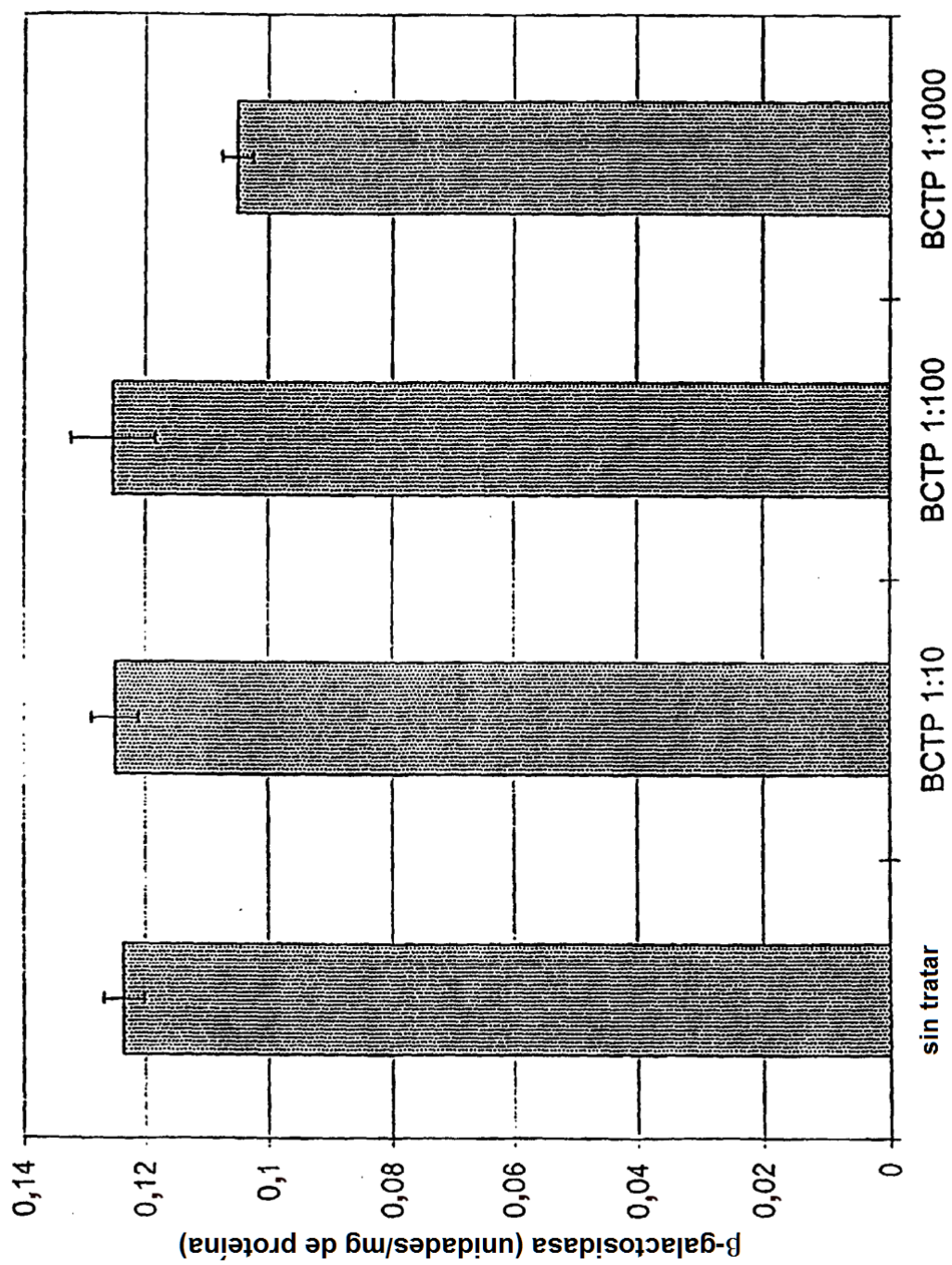


FIG. 24

FIG. 25A



FIG. 25B



A.

B.

C.

FIG. 25C



D.

FIG. 25D



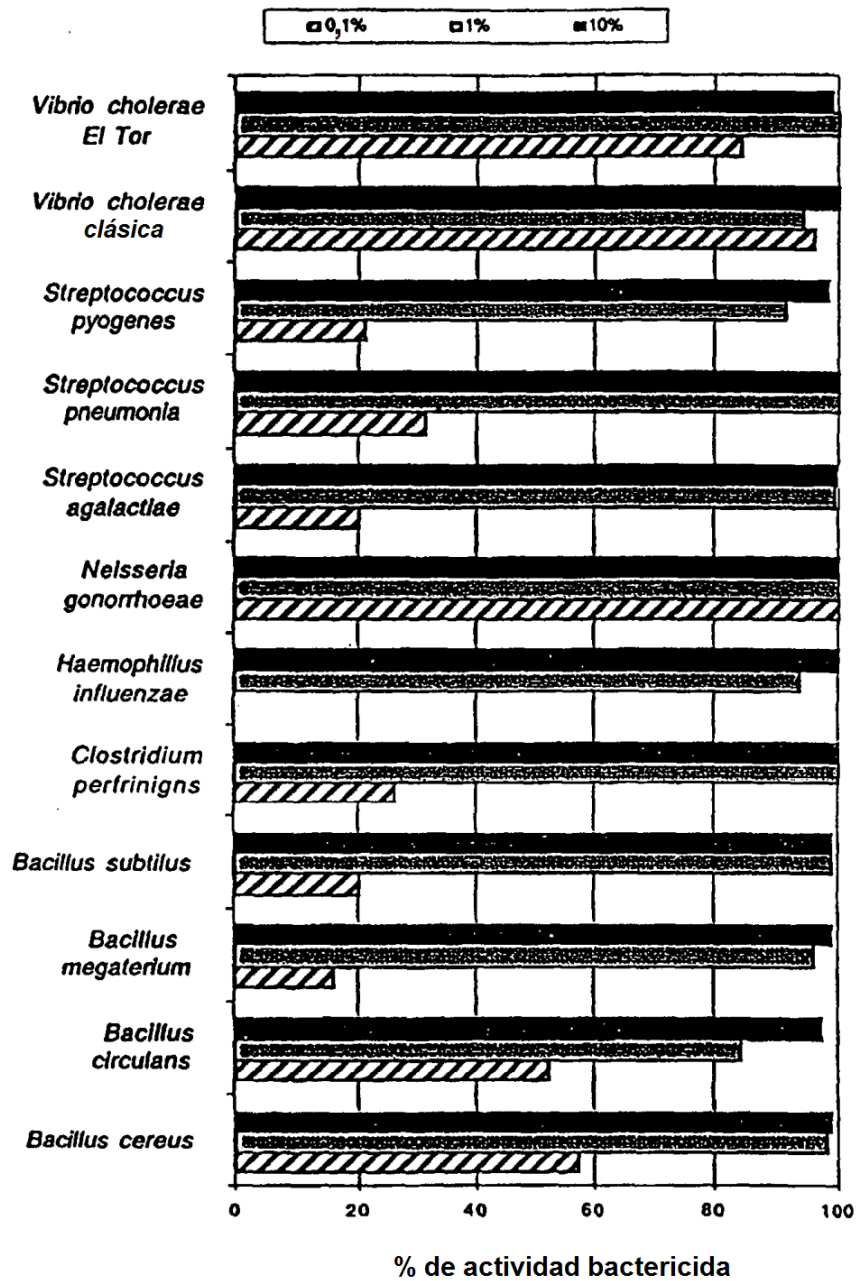


FIG. 26



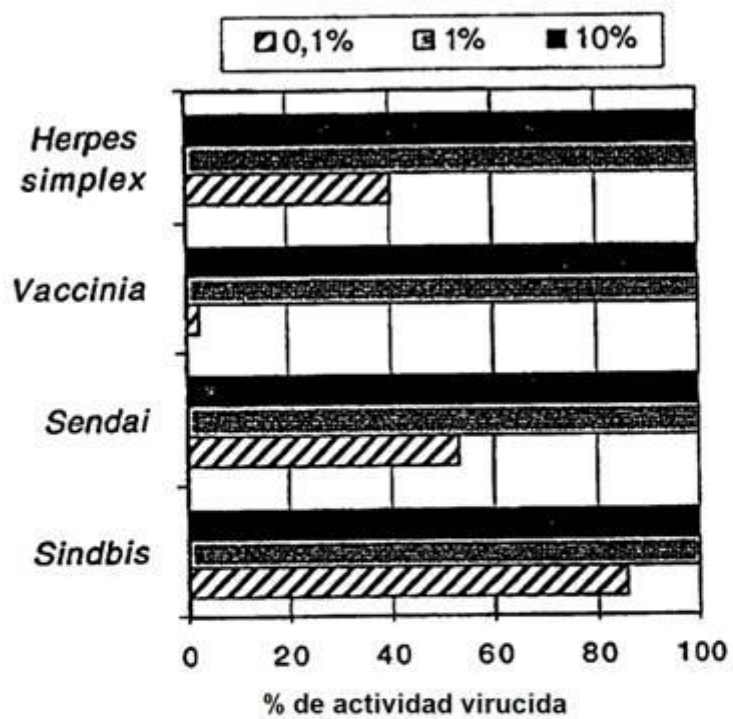


FIG. 27



MICROBIO	
Bacterias	<p><i>Bacillus</i> (incluyendo <i>B. cereus</i>, <i>B. anthracis</i>, <i>B. circulans</i>, <i>B. subtilis</i> y <i>B. megaterium</i>);</p> <p><i>Clostridium</i> (Incluyendo <i>C. botulinum</i>, <i>C. tetani</i> y <i>C. perfringens</i>);</p> <p><i>E. coli</i>;</p> <p><i>Haemophilus</i> (incluyendo <i>H. influenzae</i>);</p> <p><i>Listeria monocytogenes</i>;</p> <p><i>Neisseria</i> (incluyendo <i>N. gonorrhoeae</i>);</p> <p><i>Proteus</i> (incluyendo <i>P. mirabilis</i>);</p> <p><i>Pseudomonas</i> (incluyendo <i>P. aeruginosa</i>);</p> <p><i>Shigella</i> (incluyendo <i>S. dysenteriae</i>);</p> <p><i>Salmonella</i> (incluyendo <i>S. typhimurium</i>);</p> <p><i>Staphylococcus</i> (incluyendo <i>S. aureus</i>)</p> <p><i>Streptococcus</i> (incluyendo <i>S. agalactiae</i>, <i>S. pneumonia</i>, <i>S. pyogenes</i>);</p> <p><i>Vibrio</i> (incluyendo <i>V. cholerae</i> clasica y Eltor); y</p> <p><i>Yersinia</i> (incluyendo <i>Y. enterocolitica</i> y <i>Y. pseudotuberculosis</i>); y</p>
Virus con envoltura	<p>Gripe (incluyendo A, B y C);</p> <p>Herpes (incluyendo <i>H. simplex</i>);</p> <p>Sendai;</p> <p>Sindbis; y</p> <p>Pox virus (incluyendo vaccinia)</p>
Hongos	<p><i>Candida</i> (incluyendo <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>);</p> <p><u><i>Trichophyton</i> (incluyendo <i>T. rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i>);</u></p> <p><u><i>Microsporum gyseum</i>;</u></p> <p><u><i>Byssoschlymus fulva</i></u></p>

FIG. 28

Fórmulas de emulsión		Resultado
ATB-X100		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos
8%	Triton X-100	
8%	Tributil Fosfato	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
19%	DiH2O	
ATB-T60		Ligeramente menos eficaz que ATB-X100;  Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos
5%	Tween 60	
8%	Tributil Fosfato	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
22%	DiH2O	
ATB-XT160		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos
0,71%	Tween 60	

8%	Triton X-100	
8%	Tributil Fosfato	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
18,29%	DiH2O	
ATB-X		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos;
5%	Triton X-100	
5%	Tributil Fosfato	
40%	Aceite de soja	
1%	CPC	
49%	DiH2O	

**FIG. 29**

ATB-X1001		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos
8%	Triton X-100	
8%	Tributil Fosfato	
50%	Aceite de soja	
1%	CPC	
33%	DiH2O	
ATB-X1002		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos; más irritante que ATB-X100.
8%	Triton X-100	
8%	Tributil Fosfato	
50%	Aceite de soja	
2%	CPC	
32%	DiH2O	
ATB-2		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos
0.1%	Aceite de menta	
8%	Triton X-100	
8%	Tributil Fosfato	

64%	Aceite de soja	
2%	CPC	
17,9%	DiH2O	
ATB-CPB		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas
0.1%	Aceite de menta	
8%	Triton X-100	
8%	Tributil Fosfato	
64%	Aceite de soja	
1%	CPB	
18,9%	DiH2O	
ATB-1/2		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos, demuestra que la dilución no presenta eficacia de ATB-X100
0,05%	Aceite de menta	
4%	Triton X-100	
4%	Tributil Fosfato	
32%	Aceite de soja	
0,5%	CPC	
59,45%	DiH2O	

ATB-T3		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos
3%	Tiloxapol	
8%	Tributil Fosfato	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
0,1%	Aceite de menta	
23,9%	DiH2O	
ATB-T3EpH7.1		
3%	Tiloxapol	Eficaz contra todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y esporas
8%	Etanol	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
0,1%	Aceite de menta	
23,8%	DiH2O	
0,1%	10 N NaOH	
ATB-T22		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos; estable a pesar de la cantidad menor de detergente

2%	Triton X-100	
2%	Tiloxapol	
8%	Tributil Fosfato	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
0,1%	Aceite de menta	
22,9%	DiH <sub>2</sub> O	
ATB-1X		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y esporas bacterianas
8%	Triton X-100	
8%	Tributil Fosfato	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
0.1%	Aceite de menta	
5 mM	Inosina	
5 mM	L-Alanina	
10 mM	Cloruro de amonio	
1 mM	Fosfato sódico	
13 mM	Cloruro sódico	
18,9%	DiH <sub>2</sub> O	

ATB-T22/GE		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, Bacterias Gram negativas y esporas bacterianas
2%	Triton X-100	
2%	Tiloxapol	
8%	Tributil Fosfato	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
0,1%	Aceite de menta	
5 mM	Inosina	
5 mM	L-Alanina	
10 mM	Cloruro de amonio	
1 mM	Fosfato sódico	
13 mM	Cloruro sódico	
22,9%	DiH <sub>2</sub> O	
90% ATB-T22/GE		Eficaz contra virus con envoltura, bacterias Gram negativas, todas las bacterias Gram positivas y esporas bacterianas; suficientemente líquido para pulverizar
1,8%	Triton X-100	
1,8%	Tiloxapol	
7,2%	Tributil Fosfato	
57,6%	Aceite de soja	
0,9%	CPC	
0,09%	Aceite de menta	
5 mM	Inosina	



5 mM	L-Alanina	
10 mM	Cloruro de amonio	
1 mM	Fosfato sódico	
13 mM	Cloruro sódico	
30,61%	DiH2O	
ATB-T22E		Eficaz contra virus con envoltura, todas las bacterias Gram positivas, todas las bacterias Gram negativas y hongos; Seguridad aumentada para captación oral
2%	Triton X-100	
2%	Tiloxapol	
8%	Etanol (Prueba 200)	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
0,1%	Aceite de menta	
22.9%	DiH2O	

90% ATB-T22E/GE		Eficaz contra virus con
1,8%	Triton X-100	
1,8%	Tiloxapol	
7,2%	Etanol (200 Proof)	
57,6%	Aceite de soja	
0,9%	CPC	
0,09%	Aceite de menta	
5 mM	Inosina	
5 mM	L-Alanina	
10 mM	Cloruro de amonio	
1 mM	Fosfato sódico	
13 mM	Cloruro sódico	
30,61%	DiH2O	
3%	Tiloxapol	
8%	Etanol	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
0,1%	Aceite de menta	
23,9%	DiH2O	
ATB-X100E		
8%	Triton X-100	
8%	Etanol	
64%	Aceite de soja	
1%	CPC	
19%	DiH2O	
ATB_Tween 20 E		Eficaz contra todas las
5%	Tween 20	
1%	CPC	
64%	Aceite de soja	
8%	Etanol	
22%	DiH2O	

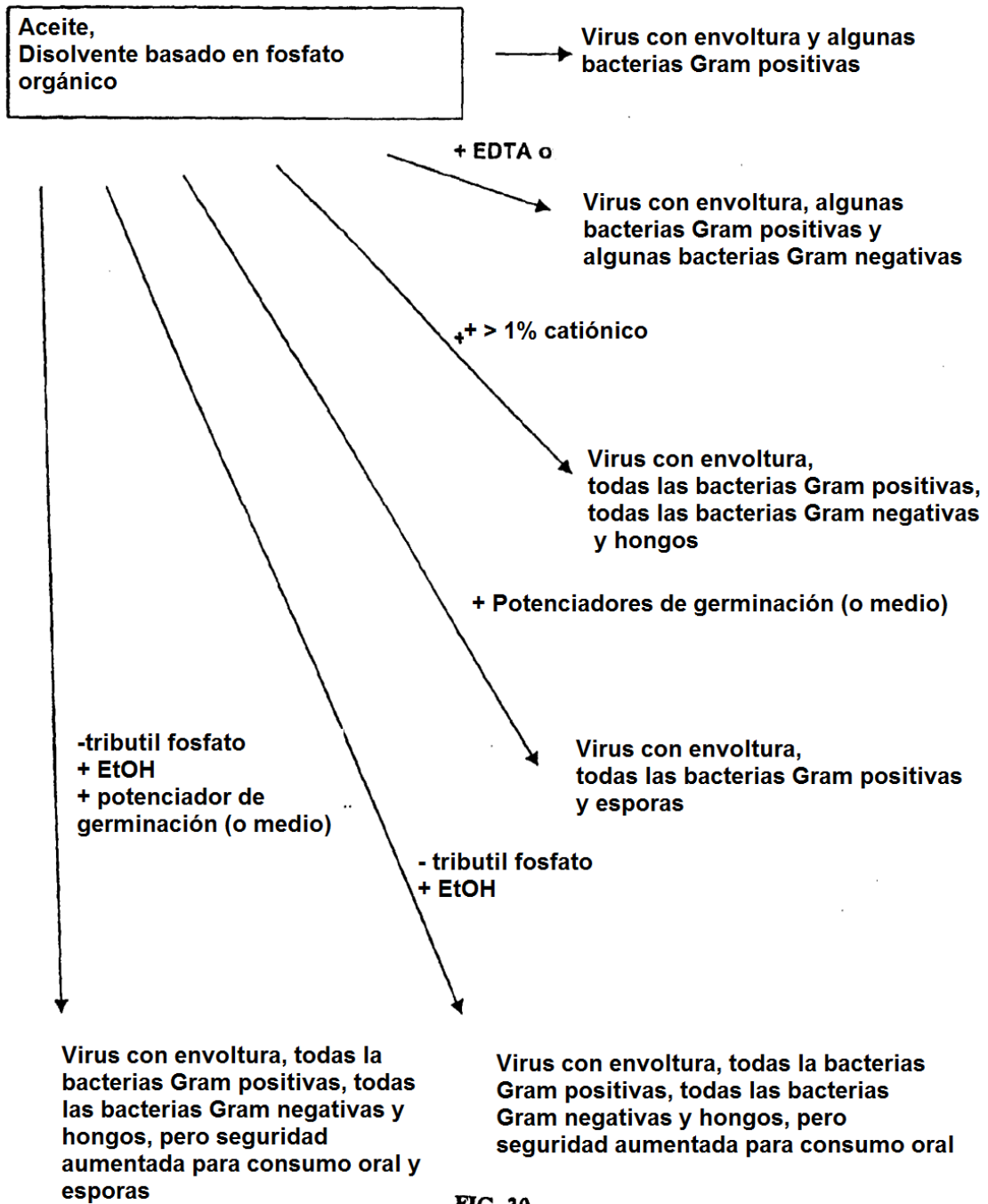


FIG. 30

FIGURA 31A

Reducción logarítmica de *E. coli* por diversas emulsiones

(Rotor, 15 min en el medio)

<u>Emulsión</u>	<u>10%</u>	<u>1%</u>	<u>0,10%</u>
50% X8PC	5,67	2,09	0
D2P	0,17	0	0
EC	5,81	5,81	4,42
GC10	6,02	6,02	6,02
P <sub>5</sub> C*	5,49	5,49	2,39
S <sub>80</sub> 8GL5	0	0	0
S8GL1B1	0	0	0
S8P	0,2	0,18	0,067
W <sub>20</sub> 10EA5*	0	0	0
W <sub>20</sub> 10ECH <sub>3</sub> *	0	0	0
W <sub>20</sub> 10EQ <sub>100</sub> X	0	0	0
W <sub>20</sub> 10EQ <sub>10</sub> X	0	0	0
W <sub>20</sub> 5EC	6,22	6,22	5,48
W <sub>60</sub> PC	5,81	5,81	2,62
W <sub>80</sub> 5EC	6,13	6,13	3,97
X2Y2C*	5,64	5,64	2,37
X2Y2EC	5,61	5,61	5,61
X2Y2P <sub>4</sub> C	5,93	5,93	4
X2Y2PC	5,67	5,67	5,67
X4Y4E	0	0	0
X8E	0	0	0
X8P BC	5,93	4,41	0
X8P CPB	5,59	5,59	2,8
X8P CPB	4,26	0,35	0
X8P CTAB	4,04	0,16	0
X8P Ácido tánico	3,84	0	0
X8PC	5,59	5,59	1,79
X8PC2	5,59	5,59	4,42
X8W <sub>60</sub> PC	5,58	5,58	1,05
Y3C	5,48	5,48	3,54
Y3E	0,25	0,19	0,05
Y3EC	6,13	6,13	6,13
Y3EVc5	0	0	0
Y3PC	5,31	5,31	5,31
Y8EC	5,81	5,81	4,62
Y8EC S	0,08	0,08	0,04

**FIGURA 31B****Reducción logarítmica de esporas de *B. globigii* por diversas emulsiones****(Rotor, 4 horas en potenciadores de germinación)**

<b><u>Emulsión</u></b>	<b><u>10%</u></b>	<b><u>1%</u></b>	<b><u>0,10%</u></b>
50% X8PC	2,21	2,6	2,46
D2P	0,94	1,28	1,75
S8P	0,53	0,94	1,27
W <sub>80</sub> 4Y4E	1,01	1,09	1,5
W <sub>80</sub> 4Y4EC	1,84	2,46	2,62
W <sub>80</sub> 5E	0,73	1,12	1,94
W <sub>80</sub> 5EC	1,8	2,31	2,6
X2E	2,4	2,27	0,5
X2E	2,44	1,15	0,86
X2Y2C	2,63	2,37	4,22
X2Y2E	1,88	1,24	1,08
X2Y2EC	2,55	2,83	3,13
X2Y2EC	1,94	2,19	2,6
X2Y2P <sub>4</sub> C	2,78	2,71	3,44
X2Y2PC	2,93	2,72	4,11
X2Y2PC	2,67	2,57	3,73
X2Y2PC	2,8	2,71	3,95
X2Y6E	2,2	1,73	0,97
X3E	2,49	2,23	1,14
X4E	2,43	2,38	2,44
X4E	2,49	2,25	0,95
X4Y4E	2,61	1,89	1,31
X5E	2,44	2,51	0,41
X5P <sub>5</sub> C	2,39	2,42	2,62
X6E	2,44	2,64	0,92
X6Y2E	2,7	2,62	1,72
X8E	2,19	2,28	0,47
X8E	2,42	2,55	0,92
X8EO	1,26	1,32	0,96
X8PC	2,6	2,73	2,79
X8PC2	2,41	2,47	2,72
Y2PC*	1,37	1,57	3,2
Y3PC	2,32	2,57	3,8
Y3PC	2,33	2,44	3,31
Y8E	0,17	0,3	0,59
Y8E	0,49	0,59	0,6
Y8EO	1,02	0,56	0,7
Y8EC	2,01	2,39	2,56
Y8P	0,89	0,57	0,64

**FIGURA 31C**

**Reducción logarítmica de INF A ufp/ml tratado con series de nanoemulsiones como se mide por el ensayo de reducción de placas (incubación de 30 minutos)**

Logaritmos de reducción				
Compuesto	1:10	1:100	1:1000	
X2Y2E	0	0	0	
X4Y4E	0	0	0	
X6Y2E	0	0	0	
X2Y6E	1,93	0	0	
S608GL5	0	0	0	
Y8E	0	0	0	
Y3E	0	0	0	
Y8ES	0	0	0	S= ácido sórbico
Y8	0	0	0	
X2E	2,08	1,38	0	
X3E	2,6	0	0	
X4E	3,16	1,61	0	
X5E	3,16	1,61	0	
X6E	3,42	3,42	3,42	
X8E	3,86	3,86	0	
X8E (aceite no purificado)	3,86	3,21	0	
X8G	2,74	2,74	0	
X8B	3,82	2,36	0	B= Bencil Benzoato
X8EO	3,86	3,42	0	O= Aceite de oliva
D2P	3,97	3,97	0,97	
D2G	3,82	3,82	0,00	
S3Y3G STS5	2,26	0	0,00	S = SDS
S8GL1B1	3,82	3,82	0,74	S = SDS
S8G	4,1	4,1	0,00	S = SDS
S8P	3,97	3,97	2,71	S = SDS
W <sub>80</sub> 5E	0	0	0	
W <sub>80</sub> 4Y4E	0	0	0	
W <sub>80</sub> 8	0	0	0	
W <sub>20</sub> 5E	0	0	0	
W <sub>80</sub> 4Y4EC	3	3	2	
W <sub>80</sub> 5EC	3	3	3	
W <sub>20</sub> 5EC	3	3	3,3	
X2Y2EC	3	3	2	
X2Y2PC	3	3	3	
X8PC	4,98	4,98	4,98	
X8GC	4,68	4,68	4,68	
X8EC	4,1	4,1	1,97	
Y8EC	3	3	2	
Y3EC	3	3	2	
Y3EC	3	3	2,12	
Y3PC	3	3	2,63	
EC	3	3	3	
GC	4,14	4,14	4,14	
ATB-EDTA	3	3	1,98	
Y2X2SPC	1,10	1,10	0	

Tratamiento de *S. typhimurium* con W<sub>205</sub>EC que contiene EDTA 0,1%  
(baño de agua a 40 °C, 15 minutos, diluciones en agua del grifo carga biológica del 10%)

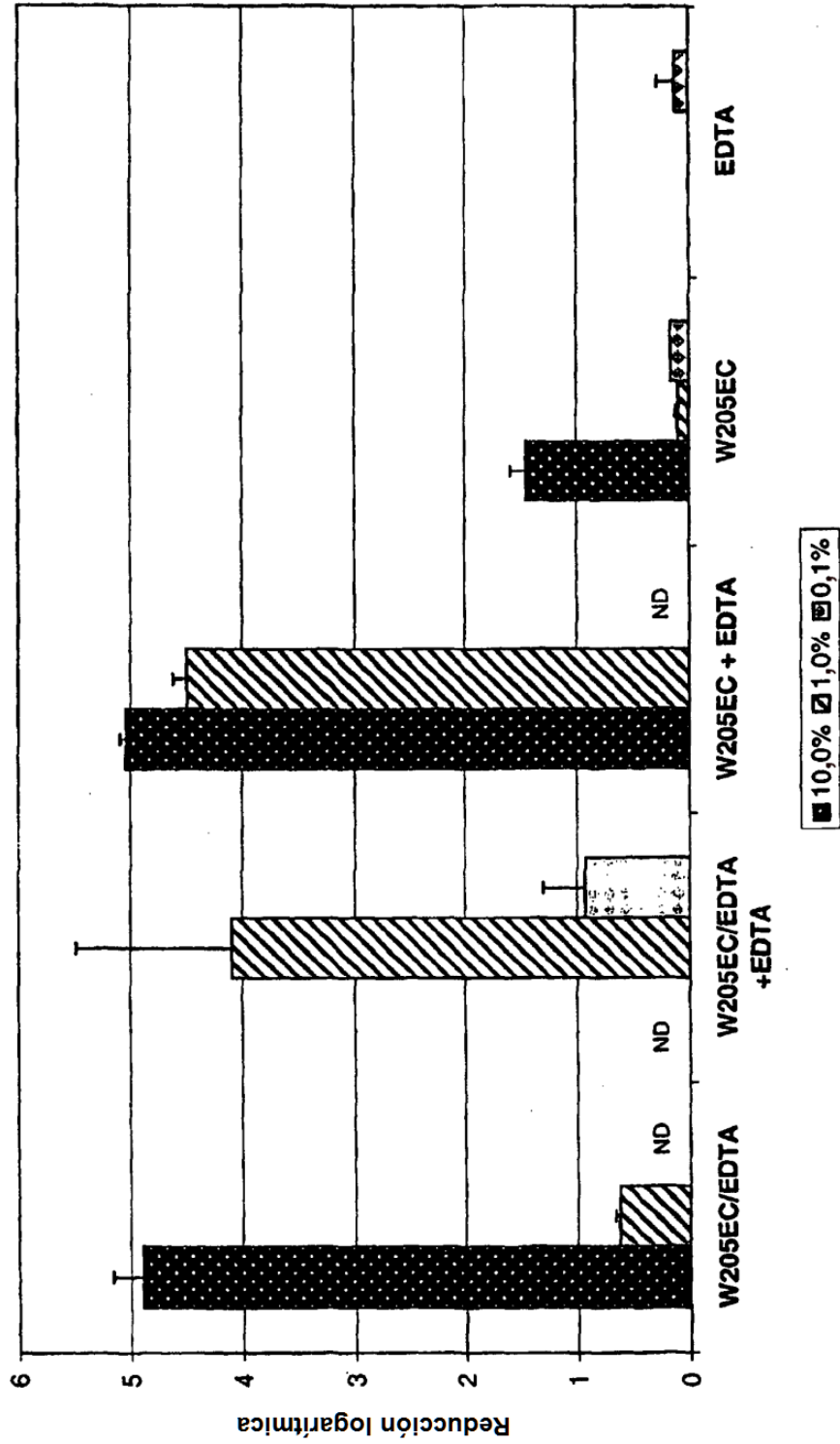


FIGURA 32

Tratamiento de *S. typhimurium* con W<sub>205</sub>EC que contiene EDTA 0,1%  
(baño de agua a 50 °C diluciones en agua del grifo, carga biológica del 10% )

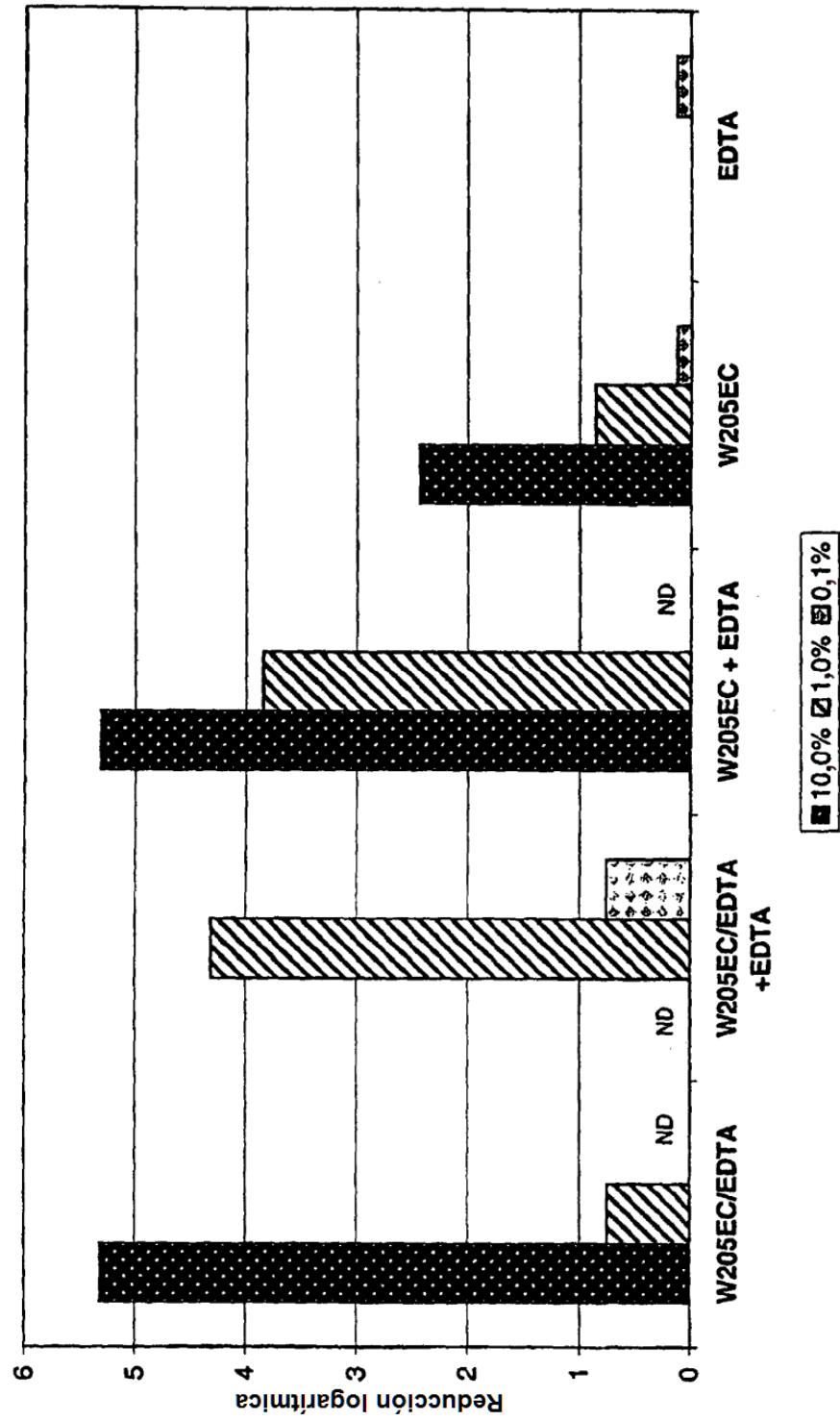
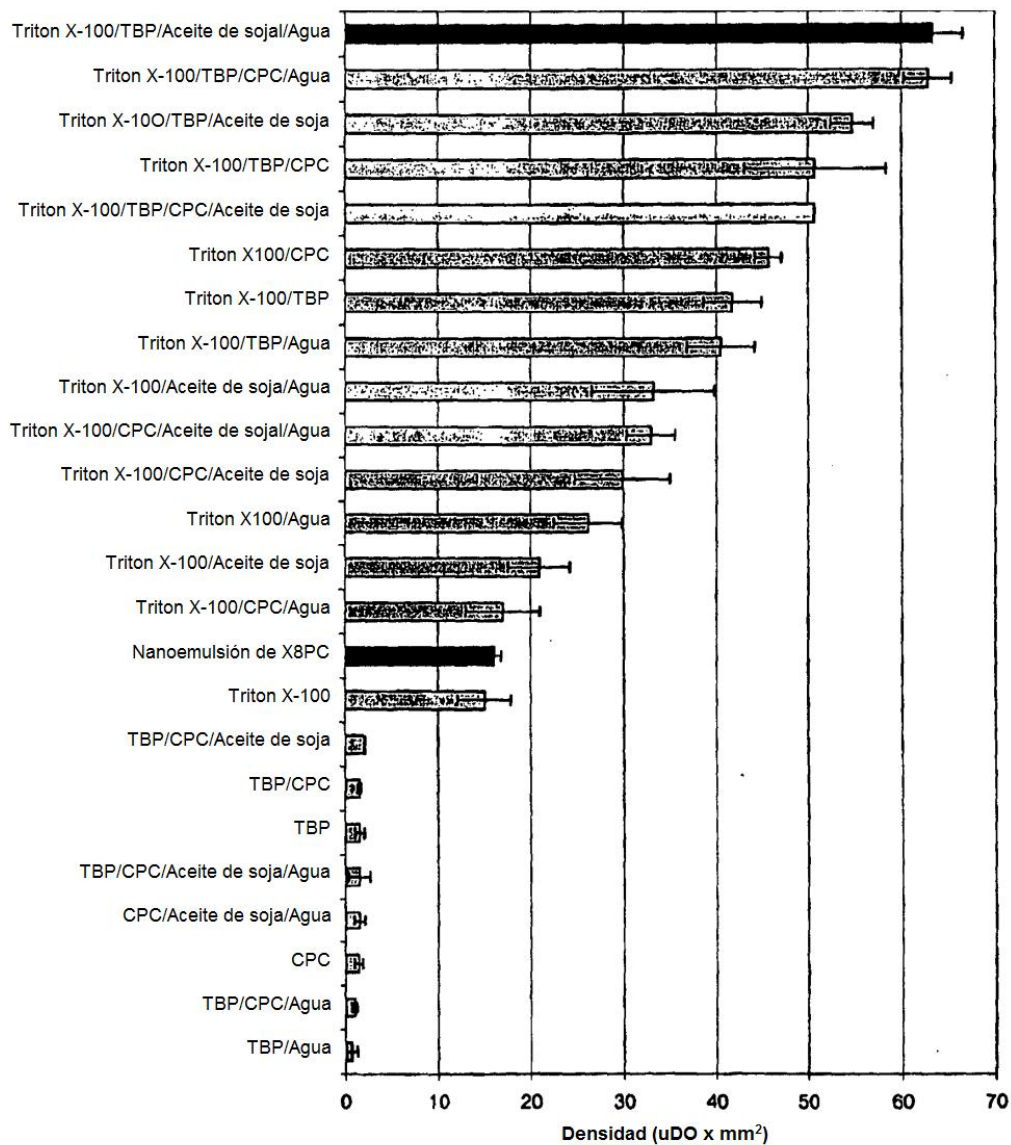


FIGURA 33



FIGURA 34

**Efecto lítico de X8PC y sus ingredientes en glóbulos rojos de oveja como se ensaya en placas de agar sangre**



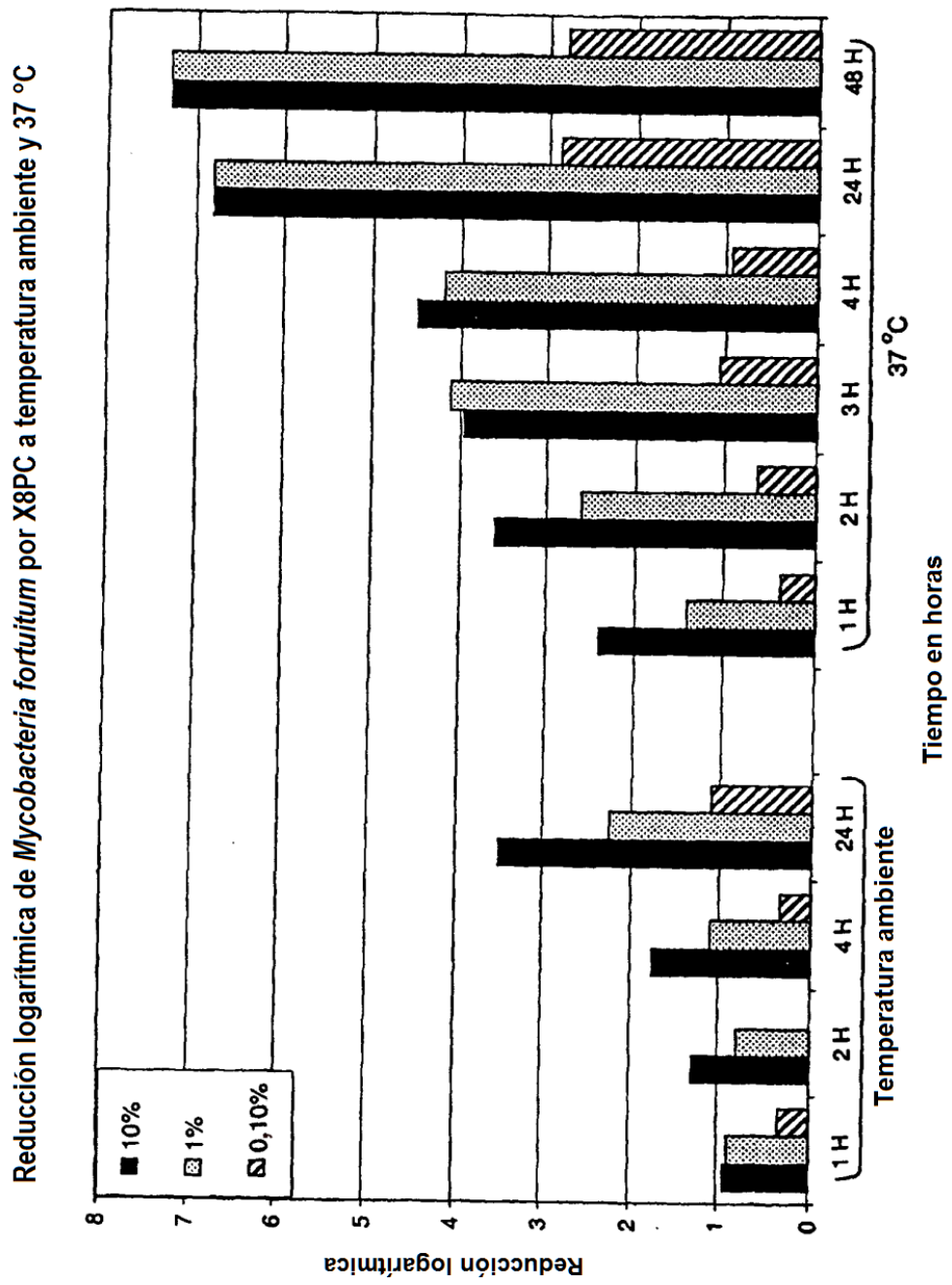


FIGURA 35

**FIGURA 36****dH<sub>2</sub>O**

Tipo de tratamiento	Recuento pretratamiento por metro cuadrado	Recuento post-tratamiento por metro cuadrado	Escorrentía (5 minutos)
W <sub>20</sub> 5EC 50 °C	18,77 X 10 <sup>7</sup>	0	0
W <sub>20</sub> SEC TA	26,83 X 10 <sup>7</sup>	0	6X10 <sup>5</sup>
H <sub>2</sub> O 50 °C	26,53 X 10 <sup>7</sup>	0	demasiado numeroso para contar
H <sub>2</sub> O TA	3,83 X 10 <sup>8</sup>	0	demasiado numeroso para contar

**Agua destilada**

Tipo de tratamiento	Recuento pretratamiento por metro cuadrado	Recuento post-tratamiento por metro cuadrado	Escorrentía (5 minutos)
W <sub>20</sub> 5EC 50 °C	9,67 X 10 <sup>6</sup>	0	0
W <sub>20</sub> SEC 40 °C	5,67 X 10 <sup>8</sup>	11,53 X 10 <sup>5</sup>	1,8 X 10 <sup>5</sup>
H <sub>2</sub> O 50 °C	7,1 X 10 <sup>7</sup>	0	1,5 X 10 <sup>8</sup>
H <sub>2</sub> O 40 °C	4,33 X 10 <sup>8</sup>	7,67 X 10 <sup>5</sup>	6,7 X 10 <sup>7</sup>

**Agua del grifo**

Tipo de tratamiento	Recuento pretratamiento por metro cuadrado	Recuento post-tratamiento por metro cuadrado	Escorrentía (5 minutos)
W <sub>20</sub> 5EC 50 °C	4,67 X 10 <sup>8</sup>	0	3X10 <sup>5</sup>
W <sub>20</sub> SEC 40 °C	18,83 X 10 <sup>7</sup>	0	6X10 <sup>5</sup>
W <sub>20</sub> SET TA	6,33 X 10 <sup>8</sup>	19,2 X 10 <sup>4</sup>	1,26 X 10 <sup>6</sup>
H <sub>2</sub> O 50 °C	5,83 X 10 <sup>8</sup>	0	4,68 X 10 <sup>7</sup>
H <sub>2</sub> O 40 °C	21,17 X 10 <sup>7</sup>	0	2,2 X 10 <sup>8</sup>
H <sub>2</sub> O TA	9,13 X 10 <sup>6</sup>	13,33 X 10 <sup>5</sup>	1,5 X 10 <sup>8</sup>