

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 893**

51 Int. Cl.:

A01P 1/00 (2006.01)

A01N 37/02 (2006.01)

A01N 25/08 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2014 PCT/US2014/045297**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15003082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2014 E 14820471 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3017054**

54 Título: **Formulaciones de compuestos orgánicos volátiles que tienen actividad antimicrobiana**

30 Prioridad:

02.07.2013 US 201361842362 P
06.03.2014 US 201461948902 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2020

73 Titular/es:

ECOPLANET ENVIRONMENTAL LLC (100.0%)
23 Bearcat Loop
Belgrade, MT 59714, US

72 Inventor/es:

STROBEL, GARY, A. y
BLATT, BRYAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 769 893 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

Formulaciones de compuestos orgánicos volátiles que tienen actividad antimicrobiana

Antecedentes de la invención

5 La importancia de eliminar a diario millones de kilos de excrementos humanos y animales de manera segura para evitar la miríada de problemas sanitarios asociados con dichos residuos no debe subestimarse. En realidad, solo una fracción de esta enorme cantidad de material se trata de modo seguro, mientras que el resto no se trata y constituye una amenaza para la salud humana y animal. Por ejemplo, se sabe que el complejo de bacterias y otros agentes que provocan enfermedades gastrointestinales es la principal causa individual de mortalidad a nivel mundial. También se sabe que estos tipos de enfermedades afectan principalmente a bebés y niños, así como al ganado. Se calcula que, a lo largo de los siguientes diez años, al menos veinte millones de personas morirán como resultado de unas instalaciones de saneamiento malas o inadecuadas.

10 Una de las razones para esto es que aproximadamente 2.400 millones de personas viven en áreas sin instalaciones de saneamiento adecuadas. Casi 4000 niños mueren a diario como consecuencia de trastornos tales como la diarrea. Además, las personas que sufren enfermedades que se contagian a través del agua ocupan aproximadamente la mitad de las camas hospitalarias en el mundo. En varios países asiáticos, están muriendo el doble de personas como consecuencia de enfermedades relacionadas con la diarrea que como consecuencia del sida. Fundamentalmente, las malas condiciones de saneamiento surgen o están relacionadas con la incapacidad de los hogares, las comunidades y, en algunos casos, de países enteros para tratar y eliminar de manera adecuada los residuos humanos y animal, que portan y estimulan el crecimiento de microorganismos que provocan enfermedades.

15 Sin duda, los efectos no deseados de los microorganismos en entornos industriales son numerosos. Por ejemplo, son necesarios medios más seguros y eficaces para tratar superficies cubiertas de microbios en entornos médicos u hospitalarios. Son necesarios medios más seguros y eficaces para tratar cultivos agrícolas para el crecimiento de microbios no deseados. Además, se necesita urgentemente un medio para reducir los olores no deseados producidos durante la descomposición de la materia fecal en operaciones de granjas industriales.

20 Existe una necesidad urgente por reemplazar a los antibióticos por otros tipos de compuestos que también muestren actividad antimicrobiana. El uso continuado de la mayoría de los antibióticos que se emplean habitualmente para animales y para la agricultura ha provocado la aparición de resistencia adquirida en poblaciones microbianas, en especial en microbios que son capaces de ser patógenos. Cada año, al menos 23.000 personas en EE. UU. mueren debido a infecciones provocadas por bacterias resistentes a fármacos, y el número está creciendo.

25 Por tanto, en la técnica son necesarias composiciones antimicrobianas adecuadas para reducir los microorganismos y los efectos del crecimiento microbiano en una amplia gama de entornos industriales, así como fórmulas y métodos para el tratamiento de los residuos humanos y animales. La presente invención puede satisfacer esta necesidad. El documento US2010272690 describe antimicrobianos que combinan el ácido propiónico con ésteres.

Breve resumen de la invención

35 La presente invención se refiere a una formulación química que tiene actividad antimicrobiana que comprende ácido propanoico y al menos un éster. Dicho al menos un éster son hexanoatos de isoamilo. En otra realización, la formulación incluye además al menos un vehículo seleccionado del grupo que consiste en bentonita, zeolita y perlita. En otra realización, la proporción de ácido propanoico:ácido isobutírico:hexanoatos de isoamilo es de 3,5:3,5:2 en v/v/v. En otra realización, la proporción de ácido propanoico, ácido isobutírico y hexanoatos de isoamilo es de 7 partes de los dos ácidos y 2 partes de butirato de isoamilo. En otra realización, la formulación incluye además al menos un endofito. En otra realización, el endofito pertenece al género *Fusarium*.

40 En otra realización, la presente invención se refiere a una formulación química que consiste fundamentalmente en ácido propanoico, ácido isobutírico, hexanoatos de isoamilo y un vehículo seleccionado del grupo que consiste en bentonita, zeolita y perlita.

45 En la presente también se describe una formulación química que comprende ácido propanoico y al menos un componente de éster (ácido) de 6-12 carbonos, en la que la formulación química presenta una proporción de ácido propanoico:componente de éster de 7:2 en v/v. Dicho al menos un éster pueden ser hexanoatos de isoamilo. En otra realización, la formulación incluye además al menos un suplemento nutricional y al menos una sal. En otra realización, la formulación comprende glucosa, proteína del suero, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de sodio. En otra realización, la formulación comprende glucosa, glicina, cloruro de potasio, cloruro de sodio y acetato de magnesio. En otra realización, la formulación comprende glucosa, glicina, cloruro de potasio, cloruro de sodio, acetato de magnesio y fosfato de monopotasio. En otra realización, la formulación incluye además al menos un vehículo. En otra realización, la formulación consiste fundamentalmente en ácido propanoico y hexanoatos de isoamilo en una proporción de ácido propanoico:hexanoatos de isoamilo de 7:2 en v/v. En otra realización, la formulación incluye además al menos un endofito. En otra realización, el endofito pertenece al género *Fusarium*.

En otra realización, la presente invención se refiere a una formulación para su uso en el tratamiento de un animal que padece una enfermedad o un trastorno asociado con una infección microbiana, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de una composición que comprende ácido propanoico y hexanoatos de isoamilo. En la presente también se describe una composición que comprende ácido propanoico y al menos un componente de éster (ácido) de 6-12 carbonos, en la que la formulación química presenta una proporción de ácido propanoico:componente de éster de 7:2 en v/v.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de las realizaciones de la invención se entenderá mejor cuando se considere junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran las realizaciones que se prefieren en la presente. Sin embargo, debe entenderse que la invención no se limita a las disposiciones y los instrumentos concretos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

La figura 1 ilustra un bioensayo en placa para determinar la bioactividad de diversos ésteres cuando se combinan con una mezcla 1:1 de los dos ácidos orgánicos según la tabla 2. Los organismos de ensayo fueron los siguientes: *Cercospora* (oscuro, inferior izquierda) y después, siguiendo las manecillas del reloj, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia* y *Aspergillus*. Las estrías son *Saccharomyces* (inferior más a la derecha) y después *Candida*, *E. coli* y *Bacillus* (inferior izquierda). A = placa control, y B = placa con el sistema 1 después de una incubación durante 30 h.

La figura 2 ilustra los efectos del sistema 1 sobre el crecimiento de bacterias procedentes de residuos humanos. Se extendieron aproximadamente 5 mg de residuos humanos frescos sobre la superficie de una placa Petri con agar de dextrosa y patata. Después se retiraron tacos del centro y se colocó bentonita en el pocillo, aproximadamente 0,5 g. La bentonita en el centro no contiene los ingredientes del sistema 1 sobre ella (centro), pero el pocillo más a la derecha sí tiene el sistema 1 a una proporción de 1 ml del sistema 1 por 10 g de bentonita. Las placas se incubaron durante 48 h a 22 °C y después se fotografiaron. No se observó crecimiento bacteriano detectable en la placa tratada con el sistema 1, pero las placas control presentaban muchas colonias bacterianas.

La figura 3 ilustra los efectos del sistema 2 sobre el crecimiento de bacterias procedentes de residuos humanos. Se extendieron aproximadamente 5 mg de residuos humanos frescos sobre la superficie de una placa Petri con agar de dextrosa y patata. Se retiraron tacos del centro y se colocó bentonita en el pocillo, aproximadamente 0,5 g. La bentonita en el centro no contiene los ingredientes del sistema 1 sobre ella (centro), pero el pocillo más a la derecha sí tiene el sistema 1 a una proporción de 1 ml del sistema 1 por 10 g de bentonita. Las placas se incubaron durante 48 h a 22 °C y después se fotografiaron. No se observó crecimiento bacteriano detectable en la placa tratada con el sistema 2.

La figura 4 ilustra dos cajas de arena higiénica para gatos con materia fecal de gato, cada una procedente de 5 gatos diferentes, aproximadamente 140 g. La caja a la derecha ha sido tratada con el sistema 1 sobre bentonita con 0,5 ml/100 g de bentonita. Después de 5 días, las lecturas de amoníaco fueron de 14 ppm en el control (izquierda) y de 0 ppm en la caja a la derecha tratada. El olor global se redujo significativamente en la caja tratada.

La figura 5 ilustra el tratamiento de aproximadamente 140 g de residuos humanos en presencia de orina con *Fusarium subglutinans* 06-1 en presencia del sistema 2 (1 ml sobre 10 g de zeolita). Después de 3 semanas se había producido un crecimiento sustancial del *F. subglutinans* (micelio blanco en el recipiente a la derecha). El nivel de amoníaco fue de 71,4 en el control a la izquierda, y de 12,1 en el recipiente tratado a la derecha. No apareció crecimiento fúngico ni degradación de los residuos en el control (izquierda).

La figura 6 ilustra el crecimiento progresivo de *Fusarium* spp sobre pequeñas porciones de residuos humanos, aproximadamente 100 mg (peso fresco), a lo largo de muchos días. Se comparó el crecimiento de los *Fusarium* spp. recién aislados y caracterizados con P2-24 (*Fusarium culmorum*). Los nuevos *Fusarium* spp., en especial E06-1 y E06-5, crecen con más rapidez sobre los residuos. El crecimiento se midió a partir de la extensión de micelio que se extiende desde el taco de agar colocado en la pequeña porción de residuo.

La figura 7 ilustra un cultivo de seis días de *Fusarium subglutinans* E06-1 (arriba), el hongo preferido para ser usado en el tratamiento de residuos humanos y animales en combinación con el sistema 2. También se muestra una vista con microscopio óptico de las esporas y las hifas de *F. subglutinans* (abajo). Las esporas son ligeramente curvas y tienen un tamaño de 9,8-12 × 2,5 μ.

La figura 8 muestra que *Fusarium subglutinans* (E06-8) crece profusamente sobre residuos humanos (centro) en presencia del sistema 2 con bentonita como vehículo. Nótese la inhibición del crecimiento bacteriano en la parte izquierda y centro de la placa de cultivo, influido por los vapores del sistema 2 que emanan de las partículas de bentonita en la parte izquierda de la placa que permiten el crecimiento fúngico. Se añadieron 0,5 g de bentonita tratada, aproximadamente 100 mg de residuos humanos y la placa se incubó durante 12 días. Véase la figura 6 para mediciones de crecimiento comparativas.

La figura 9 muestra las actividades biológicas de diversas mezclas de ensayo frente a un panel de microbios de ensayo. Se colocó un taco con cada organismo en la periferia de la placa de PDA. En el pocillo central se colocó la

disolución de ensayo en una copa de plástico. También se preparó una placa control (A). Después de 30 h se comparó el crecimiento de los organismos de ensayo con el control y se calculó el porcentaje de inhibición. La placa (B) contenía la mezcla de ensayo. Las mediciones se realizaron 30 h después de preparar la placa.

- 5 La figura 10 muestra la reducción de la contaminación microbiana de maíz fragmentado por 1 h de tratamiento con diversas concentraciones de la disolución S-3. Unas concentraciones mayores que 0,5% redujeron totalmente la contaminación bacteriana, tal como puede observarse por la falta de colonias bacterianas en los tratamientos de 0,5% y 1,0% (arriba). En este último se observó una contaminación fúngica mínima; nótese las dos colonias fúngicas en cada una de las placas a la derecha. La incubación se realizó durante dos días a temperatura ambiente y después se fotografió.
- 10 La figura 11 muestra el uso de bentonita con diversos tratamientos de fórmulas (S) a lo largo de 3 días para matar a *E. coli* en residuos humanos (estría en el medio de la placa), al mismo tiempo que permiten el crecimiento de *Fusarium* (parte de arriba de la placa) que, por lo demás, descomponen y consumen la materia sólida en los residuos humanos.
- 15 La figura 12 muestra la eficacia de la fórmula S-3 para tratar la materia fecal de pollos, obtenida extendiendo en primer lugar una suspensión sobre placas de PDA y después añadiendo 0,5 g de zeolita tratada con 3 ml por 453,6 gr (1 libra) de S-3. La foto se tomó después de 3 días de incubación a temperatura ambiente. Puede observarse que la placa que contiene la zeolita S-3 está prácticamente exenta de contaminación bacteriana.
- 20 La figura 13 muestra recipientes de plástico con tapa de sellado por presión de 929,03 cm² (1 pie cuadrado) rellenas un tratamiento para la arena higiénica más bentonita no tratada en las proporciones indicadas en las instrucciones del envase para comparar la eficacia de las fórmulas (S).
- La figura 14 muestra los niveles promedio de amoníaco tomados a lo largo de intervalos de 5 minutos cada 24 horas (A). Los niveles máximos de amoníaco muestran una tendencia similar, mostrando la arena higiénica tratada con S-1 unos niveles de producción de amoníaco significativamente reducidos (B). La figura 14B también muestra los niveles máximos de amoníaco tomados de ensayos a intervalos de 5 minutos cada 24 horas.
- 25 La figura 15 muestra la actividad microbiológica de S-1 frente a una muestra control. Las figuras 15A y 15B indican que el control de bentonita (figura 15A) presenta grandes cantidades de colonias bacterianas que crecen por toda la placa, incluyendo las áreas cercanas al pocillo que contiene la arena higiénica. Por contraste, el tratamiento de S-1 (4 ml de S3 por 453,6 gr (1 libra) de vehículo, figura 15B) presentaba una inexistencia prácticamente total de colonias bacterianas alrededor del pocillo de la placa.
- 30 La figura 16 muestra recipientes de plástico con tapa de sellado por presión de 929,03 cm² (1 pie cuadrado) rellenas de virutas de pino y el tratamiento deseado del lecho higiénico en las proporciones indicadas en las instrucciones del envase. Para estos ensayos, se ensayó S-1 aplicado a la tasa de 15 ml por 453,6 gr (1 libra) de zeolita y un control de zeolita no tratada.
- 35 La figura 17A muestra los niveles promedio de amoníaco tomados a lo largo de intervalos de 5 minutos cada 24 horas. Los niveles máximos de amoníaco muestran una tendencia similar, mostrando un lecho higiénico tratado con lecho higiénico de corral los niveles de producción de amoníaco más bajos (figura 17B). La figura 17B muestra los niveles máximos de amoníaco tomados de ensayos a intervalos de 5 minutos cada 24 horas.
- 40 La figura 18 muestra un recipiente de plástico con tapa de sellado por presión de 929,03 cm² (1 pie cuadrado) rellenas de virutas de pino (un lecho higiénico usado habitualmente para animales grandes) y el tratamiento deseado del lecho higiénico, en las proporciones indicadas en las instrucciones del envase. Para estos ensayos, se ensayó un tratamiento con S-1 y un control de zeolita no tratada.
- 45 La figura 19 muestra los niveles promedio de amoníaco tomados a lo largo de intervalos de 5 minutos cada 24 horas (19A). Los niveles máximos de amoníaco muestran una tendencia similar, mostrando un lecho higiénico tratado con S-1 los niveles de producción de amoníaco más bajos (19B). La figura 19B muestra los niveles máximos de amoníaco tomados de ensayos a intervalos de 5 minutos cada 24 horas.
- La figura 20 muestra un ternero con diarrea neonatal antes de cualquier tratamiento con la disolución S-X (figura 20A), y después de dos rondas de tratamiento con la disolución S-X (figura 20B).
- La figura 21 muestra un ternero con diarrea neonatal antes de cualquier tratamiento con la disolución S-X (figura 21A), y 24 horas después del tratamiento con la disolución S-X (figura 21B).
- 50 La figura 22 es una imagen que muestra las condiciones de las vacas lecheras en la vaquería 1.
- La figura 23 muestra la diarrea neonatal de color amarillo cremoso típica del ternero 919 (figura 23A), y el ternero 919 totalmente recuperado después del tratamiento con la disolución S-X (figura 23B).
- La figura 24 muestra el ternero 166 de la grana 9 que sufrió diarrea neonatal en el invierno de 2014 (figura 24A), y

un día después del tratamiento con la disolución S-X (figura 24B), en el que el animal se recuperó y disminuyó la diarrea amarilla.

La figura 25 muestra a una oveja que padece mastitis (figura 25A) y la administración de la fórmula S-3 al animal a través de una jeringa (figura 25B).

- 5 La figura 26 muestra frambuesas tratadas con bentonita control en el pocillo del centro (figura 26A) y frambuesas tratadas con la mezcla 1:10 de S-3 (figura 26B) y conservadas durante 1 semana a temperatura ambiente. Las frambuesas tratadas con S-3 fueron comestibles y no se habían descompuesto.

- 10 La figura 27, que comprende las figuras 27A-27B, muestra tierra tratada con *P. ultimum* o S-3. La figura 27A es una fotografía de tierra tratada con *P. ultimum* solo con semillas de remolacha roja. Se observó que solo germinaron una o dos semillas. La figura 27B es una fotografía de tierra tratada con S-3 sobre bentonita en presencia de *P. ultimum* y semillas de remolacha roja. Se observó que germinaron muchas semillas.

- 15 La figura 28, que comprende las figuras 28A-28D, muestra imágenes de placas de agar-agua para ensayar S-3 con semillas de remolacha roja. La figura 28A es una imagen de una placa de agar con semillas de remolacha roja, bentonita, S-3 (1 parte por 10 g de bentonita), y *P. ultimum*. Se descubrió que S-3 controla el crecimiento de *P. ultimum*. La figura 28B es una imagen de una placa de agar con semillas de remolacha roja y *P. ultimum*. La figura 28C es una imagen de una placa de agar solo con semillas de remolacha roja. La figura 28D es una imagen de una placa de agar que demuestra que S-3 no es perjudicial para las semillas de remolacha roja.

Descripción detallada

- 20 Tal como se emplean en la presente, cada uno de los siguientes términos y expresiones tienen el significado asociado con ellos en esta sección.

Los artículos “un” y “una” se emplean en la presente para indicar uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. Como ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

“S-1”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquiera y a todas las formulaciones del sistema 1.

“S-2”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquiera y a todas las formulaciones del sistema 2.

- 25 “S-3”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquiera y a todas las formulaciones del sistema 3.

“S-4”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquiera y a todas las formulaciones del sistema 4.

“S-5”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquiera y a todas las formulaciones del sistema 5.

“S-X”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquiera y a todas las formulaciones del sistema X, que pueden incluir en su interior incluir uno o más de los sistemas 1-5.

- 30 Tal como se emplea en la presente, el término “CLOE” se refiere a una formulación que comprende S-1 o S-5.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “lecho higiénico de corral” se refiere a una formulación que comprende S-1 o S-5.

- 35 Tal como se emplea en la presente, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de al menos una composición de la invención con otros componentes químicos, tales como vehículos, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes suspensores, agentes espesantes y/o excipientes. La composición farmacéutica facilita la administración de la composición a un organismo. En la técnica existen múltiples técnicas para la administración de una composición que incluyen, pero no se limitan a la administración intravenosa, oral, en aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar y tópica.

- 40 Tal como se emplea en la presente, la expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material, tal como un vehículo o un diluyente, que no aboga la actividad biológica o las propiedades de la composición y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interacción de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

- 45 Tal como se emplea en la presente, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, un estabilizante, un agente dispersante, un agente suspensor, un diluyente, un excipiente, un agente espesante, un disolvente o un material encapsulante, implicado en el transporte de una composición útil en la invención al paciente, de modo que pueda realizar su función prevista. Generalmente, estas construcciones son transportadas desde un órgano o una porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, incluyendo la composición útil en la invención, y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden actuar como vehículos farmacéuticamente
- 50

aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; agentes tensioactivos; ácido algínico; agua apirógena; disolución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. Tal como se emplea en la presente, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" también incluye cualquiera y todos los revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes de retraso de la absorción y similares, que son compatibles con la actividad de la composición útil en la invención y que son fisiológicamente aceptables para el paciente. También pueden incorporarse composiciones activas suplementarias a las composiciones. El "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede incluir también una sal farmacéuticamente aceptable de la composición útil en la invención. Otros ingredientes que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas usadas en la práctica de la invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, Pa.).

Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo describe específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6, describe específicamente los subintervalos, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como los números individuales dentro de este intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3, 6 y cualquier incremento entero y parcial entre ellos. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

La presente invención se refiere al descubrimiento de fórmulas químicas eficaces y útiles que, por sí solas o en combinación con ciertos hongos endofíticos, tales como *Fusarium* spp, poseen una potente actividad antimicrobiana y pueden ser particularmente adecuadas para una diversidad de usos, tales como para reducir el crecimiento microbiano en instrumentos o superficies de instalaciones médicas, reducir el crecimiento microbiano sobre superficies de plantas agrícolas, o para descontaminar, degradar y desodorizar residuos humanos y animales. Por ejemplo, las fórmulas de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de residuos en cualquier localización, tales como en letrinas, cajas de arena higiénica para gatos, establos de animales, graneros, instalaciones para criar pollos, establos para cerdos, lugares para mascotas en los hogares, zoológicos y muchas otras localizaciones.

En una realización preferida, la combinación apropiada de fórmulas inofensivas que contienen ingredientes que están en la lista de FDA-GRAS y un hongo apropiado, tal como un hongo endofítico de *Fusarium* spp, tal como *F. subglutinans*, se coloca en un recipiente, tal como una bolsa de plástico biodegradable. En la bolsa también está contenida una cantidad apropiada de un polímero absorbente de orina que es compatible con el hongo endofítico *Fusarium subglutinans*. Esta combinación de agentes representa un proceso de tratamiento seguro, rápido y nuevo para reciclar los ingredientes que se encuentran en residuos humanos y animales. La presencia de estos dos ingredientes en la bolsa mata con eficacia muchas de las bacterias perjudiciales en los residuos humanos y, al mismo tiempo, comienza el proceso de reciclaje de los constituyentes orgánicos de los residuos para producir de nuevo un aditivo inofensivo para el suelo.

La presente invención puede emplearse en conexión con dichos aditivos en emergencias nacionales, maniobras militares, actividades relacionadas con la Marina, desastres naturales, actividades deportivas al aire libre (cámping, senderismo, piragüismo, caza, ciclismo, etc.) y otras actividades en las que los residuos humanos deben eliminarse de manera adecuada y segura. También se refiere al desarrollo de instalaciones mucho más seguras para todo tipo de ganado e incluso para mascotas domésticas. Como ejemplo, en fechas recientes se ha advertido que la eliminación adecuada y segura de los residuos humanos es un problema importante para la gestión apropiada de áreas salvajes en el mundo. La estética, así como los problemas de salud, son los principales problemas a los que se enfrentan los gestores de estas áreas. Por consiguiente, la presente invención puede ser adecuada para superficies humanas y animales, superficies de plantas, superficies industriales, herramientas mecánicas y muchos otros usos.

En una realización de la presente invención, las formulaciones del sistema 1 (S-1), sistema 2 (S-2), sistema 3 (S-3), sistema 4 (S-4) y/o sistema 5 (S-5), y opcionalmente el uso de bentonita, zeolita o perlita como vehículo (dependiendo de la aplicación), se combinan en el recipiente, y los procesos de destrucción de bacterias y/o degradación de residuos comienzan inmediatamente. En otra realización, la presente invención puede usarse en lechos higiénicos para animales y tratamientos de establos, en los que la mezcla química (con el vehículo) puede aplicarse directamente a las áreas que alojan a los animales, provocando la destrucción casi inmediata de las bacterias que provocan olores perjudiciales, tales como amoníaco. En otra realización, la presente invención puede aplicarse a una superficie, tal como una superficie de una planta agrícola, una superficie de una instalación médica, una herramienta médica o industrial, o similares, para eliminar o reducir de otro modo el recuento microbiano sobre la superficie tratada.

Los antibióticos son compuestos que matan o inhiben el crecimiento de bacterias. Una idea errónea frecuente es que los antibióticos son eficaces contra otros microorganismos, tales como hongos y virus, cuando, de hecho, para estos fines son necesarios compuestos antifúngicos y antivíricos. Los antibióticos actúan interfiriendo con etapas clave en el metabolismo y el crecimiento de bacterias, y a grandes rasgos pueden agruparse en dos categorías principales, bactericidas y bacteriostáticos, dependiendo de que maten a las bacterias o simplemente inhiban su crecimiento, respectivamente. Los antibióticos en general son seguros para su uso en seres humanos, porque las etapas a las que se dirigen son exclusivas de ciertos tipos de bacterias o son eficaces contra bacterias a concentraciones muy bajas consideradas seguras para los seres humanos. Otras clases de compuestos químicos, tales como ciertos alcoholes, ácidos y peróxidos, pueden tener un poder inhibitor y/o destructor amplio, porque afectan a elementos fundamentales de la bioquímica comunes a muchas formas de vida. Estos tipos de compuestos se clasifican como antisépticos, esterilizantes, desinfectantes e higienizantes y conservantes dependiendo de sus efectos específicos sobre la vida microbiana, los modos de aplicación eficaz y la toxicidad para los seres humanos. Los sistemas de la presente invención, tales como S1, son mezclas que consisten principalmente en ésteres y ácidos orgánicos de cadena corta, de modo más notable ácido propanoico y hexanoato de isoamilo. Ninguna de estas moléculas se clasifica como antibiótico, pero ambas poseen propiedades antimicrobianas y pueden ser bactericidas o bacteriostáticas dependiendo de la concentración y de la longitud de tiempo de aplicación.

Los sistemas de la presente invención no actúan a través de los mismos mecanismos que los antibióticos. Mientras que los antibióticos se dirigen a etapas muy específicas, a menudo mediante el reconocimiento de motivos estructurales muy específicos, los sistemas de la presente invención matan a las bacterias e inhiben su crecimiento afectando a propiedades bioquímicas fundamentales necesarias para sostener la vida. Además, los componentes de los sistemas de la presente invención actúan de modo sinérgico, de modo que el efecto de la mezcla global es mayor que la suma de sus partes. El mecanismo del efecto sinérgico observado con estos sistemas no se comprende, pero otras mezclas de ácido/éster muestran el mismo tipo de efecto combinado exagerado.

Un componente principal de los sistemas de la presente invención, el ácido propanoico, es un ácido orgánico de cadena corta con un uso establecido como conservante en las industrias alimentaria y agrícola. La mayoría de los organismos, incluyendo los seres humanos y muchas especies bacterianas, poseen vías metabólicas que facilitan el uso del ácido propanoico como nutriente y, de hecho, un grupo de bacterias incluso puede producir la molécula. Así, a bajas concentraciones, el ácido propanoico es fundamentalmente inofensivo para casi todos los organismos, pero a concentraciones mayores no puede degradarse con la suficiente rapidez y empieza a acumularse dentro de la célula. A medida que su concentración dentro de la célula aumenta, también lo hace la acidez de la célula. Cuando la acidez dentro de la célula es demasiado elevada, las enzimas no pueden actuar de modo adecuado, el ADN y otras moléculas biológicas se destruyen y la célula muere. Estudios recientes han indicado que aunque los efectos sobre la acidez intracelular son un mecanismo antimicrobiano principal de los ácidos orgánicos débiles, no son en absoluto el único mecanismo. A medida que los ácidos se disocian y liberan protones dentro de la célula, van adquiriendo carga negativa. Unas altas concentraciones de moléculas con carga negativa dentro de la célula presentan un conjunto de efectos perjudiciales sobre la osmolaridad, el almacenamiento de nutrientes y el metabolismo.

A concentraciones menores, los ácidos pueden ser inhibidores, pero no letales. Se producen aumentos en la acidez cuando un ácido se disocia y libera un protón. Cuando la acidez dentro de una célula aumenta demasiado, la célula puede exportar protones hacia el exterior en un intento de mantener los niveles apropiados de pH. Aunque es eficaz, esta estrategia requiere el consumo de una gran cantidad de energía y puede producirse sin letalidad solo a bajas concentraciones de ácidos. Debido a que los organismos más pequeños son más sensibles a cantidades pequeñas de ácido propanoico, una concentración que es inofensiva para los seres humanos puede ser letal o inhibitoria para las bacterias. El ácido propanoico no es el único ácido orgánico en S1, pero puede presumirse que los efectos antimicrobianos de otros ácidos orgánicos de tamaño similar surgen fundamentalmente a partir del mismo mecanismo.

El mecanismo antimicrobiano de los ésteres sigue siendo en gran medida desconocido. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, una posible pista surge de la observación de que, para un conjunto concreto de ésteres, los que son capaces de incorporarse con más eficacia en la membrana celular bacteriana tienden a tener mayores propiedades antimicrobianas. La incorporación de cualquier molécula a la membrana celular cambia las propiedades químicas y físicas de la membrana, lo cual conduce a cambios en la captación de nutrientes, exportación de residuos, generación de energía y otros procesos celulares fundamentales. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, esta observación ha conducido a sugerir que la incorporación de ciertos ésteres en la membrana celular cambia sus propiedades químicas y físicas de una manera que es perjudicial para el organismo. La alteración de la membrana celular también es un mecanismo mediante el cual se cree que actúan los ácidos orgánicos de cadena más larga.

A medida que los antibióticos empezaron a aplicarse a escala masiva durante el siglo XX, el problema de la resistencia a los antibióticos surgió como una importante cuestión clínica. En el siglo XXI, como consecuencia de que la resistencia a los antibióticos se ha hecho más visible y extendida, la expresión ha penetrado en la conciencia pública y finalmente ha sido reconocido como el inmenso problema que es. En una población bacteriana expuesta a antibióticos, la resistencia existe en un número muy pequeño de individuos o inicialmente emerge debido a

mutaciones naturales y después se selecciona, porque los individuos resistentes al antibiótico tienen una ventaja de supervivencia frente a individuos no resistentes. La resistencia a los antibióticos se extiende mediante transmisión vertical desde una célula resistente a su progenie, y mediante transmisión horizontal (transferencia directa de genes de resistencia desde una célula resistente a una célula no resistente). De esta manera, la resistencia se extiende con rapidez y el mayor uso de antibióticos constituye una presión selectiva que aumenta la ventaja de supervivencia de la resistencia a los antibióticos.

Las bacterias pueden adquirir resistencia a un antibiótico concreto a través de cuatro mecanismos principales: produciendo enzimas que inactivan el antibiótico, alterando la estructura de la diana de modo que el antibiótico ya no puede unirse, volviendo a trazar vías metabólicas para evitar las etapas inhibidas por el antibiótico, y desarrollando bombas de eflujo que bombean el antibiótico hacia el exterior de la célula. Cada mecanismo tiene una base genética y, por tanto, puede transferirse desde la célula que inicialmente desarrolla la resistencia a células no resistentes. En algunos casos, una célula bacteriana puede adquirir resistencia a varios tipos diferentes de antibióticos. Así es como surgen las denominadas "superbacterias" y, a medida que aumenta el uso de antibióticos en las industrias agrícola, veterinaria y médica, también aumentará la prevalencia de cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos. Además, se han identificado combinaciones de moléculas orgánicas pequeñas, tales como ácidos y ésteres, que actúan de una manera sinérgica para producir casi el mismo efecto antimicrobiano que los antibióticos. Las moléculas orgánicas que poseen estas propiedades pueden denominarse "sinergistas".

Los mecanismos de los antibióticos, así como la resistencia a estos, pueden resumirse mediante una palabra: especificidad. Los antibióticos actúan dirigiéndose a características estructurales, enzimas y macromoléculas específicas. De modo similar, la resistencia a los antibióticos aparece cuando las bacterias desarrollan una bomba de eflujo específica para un antibiótico concreto o alteran una característica estructural, una enzima o una macromolécula concreta. Si los antibióticos son específicos, los componentes de los sistemas de la presente invención son generales. Los ésteres y ácidos orgánicos carecen de dianas específicas, y por el contrario producen sus efectos antimicrobianos cambiando el entorno bioquímico de las células bacterianas. Son eficaces frente a una gama mucho más amplia de organismos e interfieren con múltiples procesos celulares.

Los ácidos orgánicos son abundantes en la naturaleza. Cualquier célula bacteriana concreta se expondrá invariablemente a los ácidos orgánicos en algún momento de su vida y, como resultado, muchas especies bacterianas poseen mecanismos genéticos innatos que, tras su inducción, les ayudan a afrontar los estreses que les provoca la exposición natural a ácidos orgánicos. Quizá el que ha sido mejor estudiado es la respuesta de tolerancia a ácidos de *Salmonella*. Fundamentalmente, cuando una célula de *Salmonella* se expone a una concentración de ácidos alta, pero subletal, esta induce la expresión de una serie de genes de modo que la siguiente vez que se expone a condiciones ácidas, sus probabilidades de supervivencia son mucho mayores. Esto ha sido demostrado de modo experimental mediante la inoculación de un medio ácido a células de *Salmonella* previamente expuestas y no expuestas. En casi todos los casos, las células previamente expuestas tienen una tolerancia mucho mayor al ácido. *E. coli* también posee una respuesta de tolerancia a ácidos muy estudiada y parece probable que este mecanismo esté presente en muchas otras especies bacterianas. En el caso de especies patógenas, tales como *E. coli* y *Salmonella*, existe una gran preocupación de que la inducción de la respuesta de tolerancia a ácidos por medio de la exposición a concentraciones subletales de conservantes alimentarios de ácidos orgánicos pueda aumentar la virulencia bacteriana, porque es más probable que las bacterias sobrevivan a la exposición a los fluidos gástricos ácidos durante la digestión.

No obstante, existe una diferencia importante entre la resistencia a antibióticos y la resistencia a ácidos orgánicos. Muchos de los genes para la resistencia a antibióticos se encuentran en elementos genéticos móviles conocidos como plásmidos, que son transferidos con facilidad entre células bacterianas y especies bacterianas. De esta manera, es un proceso relativamente simple que cualquier célula bacteriana concreta adquiera resistencia a numerosos antibióticos. Por otra parte, los mecanismos de resistencia a ácidos, tales como la respuesta de tolerancia a ácidos, son codificados por el ADN cromosómico. Este tipo de información genética solo puede transferirse a las células de la progenie y, por tanto, la aparición repentina de "superbacterias", tal como ha sido observada con las cepas bacterianas de resistencia a múltiples fármacos, no se produce. Además, aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, es posible que los efectos sinérgicos observados cuando se usa un ácido orgánico junto con ésteres orgánicos puedan anular algunos mecanismos de resistencia a los ácidos.

En una realización, para identificar un microbio que podría crecer sobre residuos humanos y animales y provocar su degradación, fue fundamental formular una nueva mezcla antibiótica que matase el contenido microbiano de los residuos, que normalmente actúa para descomponer la urea en amoníaco y ácido úrico. El amoníaco es letal para la mayoría de los hongos que, por lo demás, degradan los constituyentes sólidos de los residuos. En este descubrimiento, resultó crucial el hecho conocido de que el ácido propanoico tiene actividades antibacterianas, pero solo al nivel inhibitorio, y esto también es cierto para el ácido isobutírico. Así, estos dos compuestos fueron los ingredientes de partida para la nueva y eficaz mezcla antibiótica. Era necesario un ingrediente adicional para otorgar letalidad microbiana a la mezcla. Después, de una manera completamente inesperada, se descubrió que la adición de ciertos ésteres a estos ácidos orgánicos pequeños les otorga unas actividades antimicrobianas significativamente potenciadas.

Los microorganismos que viven en las selvas del planeta, para sobrevivir han debido de producir mecanismos bioquímicos para enfrentarse a competidores potenciales. A este respecto, han desarrollado la capacidad de producir moléculas que son antimicrobianas y compuestos que inhiben y destruyen otros microbios. Debido a que la humanidad está buscando nuevos antibióticos, los investigadores visitan las selvas a la búsqueda de nuevos microbios y los agentes que estos producen para inhibir y destruir a los otros competidores microbianos. Ciertos microbios de las selvas han proporcionado importantes pistas químicas sobre cuáles serían los compuestos elegidos para los sistemas 1-4.

Formulaciones

En la presente se describe una formulación química que comprende al menos un ácido orgánico, tal como ácido propanoico, ácido isobutírico, o ácido butírico. En una realización, la formulación química tiene actividad antibacteriana cuando se aplica a residuos humanos o animales. En la presente se indica que el ácido orgánico que se usa puede contener de 2-5 átomos de carbono, y que cada ácido usado puede variar del 0% al 80% de la mezcla bioactiva. En una realización preferida, el ácido orgánico es ácido propanoico. También se describe en la presente una formulación química que consiste fundamentalmente en un ácido orgánico, tal como ácido propanoico, ácido isobutírico, o ácido butírico. También se describe en la presente una formulación química que consiste fundamentalmente en ácido propanoico. También se describe en la presente una formulación química que comprende dos ácidos orgánicos. También se describe en la presente una formulación química en la que los dos ácidos orgánicos son ácido propanoico y ácido isobutírico. También se describe en la presente una formulación química que comprende una combinación de dos ácidos orgánicos y al menos un éster. También se describe en la presente una formulación química que comprende ácido propanoico, ácido isobutírico y al menos un éster. También se indica en la presente que los dos ácidos orgánicos son ácido propanoico y ácido isobutírico, y que dicho al menos un éster es butirato de isoamilo. En otra realización de la presente invención, los dos ácidos orgánicos son ácido propanoico y ácido isobutírico, y que dicho al menos un éster son hexanoatos de isoamilo. También se describe en la presente una formulación química en la que los dos ácidos orgánicos son ácido propanoico, y dicho al menos un éster es acetato de isoamilo.

En la presente se describe una formulación química que puede comprender además al menos un éster. En la presente también se indica que dicho al menos un éster puede ser cualquier éster listado en la tabla 1 o en otro punto en la presente. En ciertas realizaciones, el éster puede tener de 3 a 10 átomos de carbono, y cualquier éster o una combinación de ésteres puede representar al menos 20% de la mezcla. En una realización, el éster es éster isoamílico. En la presente también se describen formulaciones químicas que, como alternativa, pueden formularse usando una familia completa de ésteres isoamílicos de diversos componentes ácidos que varían de C-6 (hexanoato) a C-12 (laurato), así como diversos ésteres (ácidos) aromáticos del alcohol isoamílico, tales como cinamato, benzoato y fenilacetato. El éster son hexanoatos de isoamilo. Tal como se en la presente, el término "hexanoatos" puede significar un único tipo de hexanoato o puede incluir una mezcla de la forma ácida de los hexanoatos, incluyendo las formas ramificadas. En la presente también se describe una composición química en la que el éster es formiato de isoamilo. En la presente también se describe una composición química en la que el éster es acetato de isoamilo. En la presente también se describe una composición química en la que el éster se selecciona del grupo que consiste en acetato de alilo, acetato de *n*-decilo, acetato de isoamilo y acetato de fenitilo. En la presente también se describe una composición química en la que el éster es aldehído de fresa (3-metil-3-fenil-oxirana-2-carboxilato de etilo, un éster orgánico). En la presente también se describe una composición química en la que dicho al menos un éster puede ser cualquier componente de éster (ácido) de un solo carbono. En la presente también se describe una composición química en la que dicho al menos un éster es formiato de isoamilo. En la presente también se describe una composición química en la que pueden añadirse otros compuestos como el componente de éster de las formulaciones. Por ejemplo, el éster octanoato del alcohol isoamílico es activo y también el éster laurato. Por consiguiente, en la presente se describen formulaciones que pueden incluir el uso del espectro completo de componentes de 6-12 carbonos (ácidos) de los ésteres isoamílicos. En la presente también se describe una composición química en la que el éster es el éster octanoato del alcohol isoamílico. En presente también se describe una composición química en la que el éster es el éster laurato del alcohol isoamílico. En la presente también se describe una composición química en la que también pueden usarse componentes de benceno, tales como el éster benzoato, y los ésteres cinamato y salicilato. En la presente también se describe una formulación química, en la que la formulación química comprende ácido propanoico y al menos un componente de éster (ácido) de 6-12 carbonos.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención pueden incluir mezclas de al menos un ácido orgánico y al menos un éster en cualquier proporción. En una realización, la proporción de dicho al menos un ácido orgánico a dicho al menos un éster es de 6-7 a 2-3. En realizaciones preferidas, la proporción de dicho al menos un ácido orgánico a dicho al menos un éster es de 7:2. En otras realizaciones, las fórmulas de la presente invención pueden incluir mezclas de dos ácidos orgánicos y al menos un éster en cualquier proporción. En una realización, la proporción de un primer ácido orgánico:un segundo ácido orgánico:al menos un éster es de 3,5:3,5:2 en v/v/v. En otra realización, la mezcla de un primer ácido orgánico:un segundo ácido orgánico:al menos un éster es de 7 partes de los dos ácidos y 2 partes del éster seleccionado. En una realización, la formulación química comprende ácido propanoico y al menos un componente de éster (ácido) de 6-12 carbonos, en la que la formulación química presenta

una proporción de ácido propanoico:componente de éster de 7:2 en v/v.

Tal como se contempla en la presente, la presente invención puede incluir una formulación que comprende ácido propanoico y hexanoatos de isoamilo más la adición de al menos un hongo endofítico. La presente invención no se limita a ningún hongo concreto, aunque se prefiere un hongo endofítico, y se prefiere aún más un hongo del género *Fusarium*. El más preferido es el hongo endofítico de la especie *Fusarium subglutinans*. En otra realización, el hongo endofítico es un hongo del género *Gloeosporium*. Tal como se contempla en la presente, el hongo puede incorporarse en cualquier formulación a través de cebada inoculada u otro vehículo adecuado para un hongo, tal como entienden los expertos en la técnica. En la presente también se describe una formulación química que comprende dos ácidos orgánicos y al menos un éster y al menos un hongo, en la que los dos ácidos orgánicos y dicho al menos un éster matan o reducen el crecimiento de bacterias en los residuos humanos o animales, y dicho al menos un hongo aumenta la velocidad de descomposición de los residuos humanos o animales. En otra realización, la formulación comprende ácido propanoico, ácido isobutírico, al menos un éster y al menos un hongo. En ciertas realizaciones, la formulación puede comprender además cineol, valenceno, sales o cualquier otro aditivo, excipiente u otro componente deseado para producir una formulación que tenga la característica deseada.

En algunas realizaciones, suplementar un cultivo fúngico con compuestos adicionales puede potenciar sus propiedades inhibitoras fúngicas hasta un grado mayor que cualquiera de los agentes producidos por el hongo o el compuesto por sí solos. Esta actividad se considera sinergia. Por tanto, la presente invención también proporciona formulaciones químicas que comprenden al menos un hongo y al menos un sinergistano. Tal como se emplea en la presente, el término "sinergistano" se refiere a cualquier compuesto químico que, cuando se administra en combinación con otro compuesto, muestra una actividad inhibitora microbiana mayor que la actividad observada cuando cada compuesto se administra por sí solo. En un ejemplo no limitante, cuando un sinergistano se combina con un cultivo fúngico, las fases gaseosas combinadas del hongo y el sinergistano muestran mayor actividad antimicrobiana que cualquiera de las fases gaseosas del hongo o del sinergistano por sí solas.

En ciertas realizaciones, las formulaciones químicas de la presente invención pueden usarse en combinación con vehículos, tales como zeolita o bentonita, como un tratamiento de arena higiénica para gatos, un tratamiento de lecho higiénico para establos de caballos, establos de ganado vacuno, establos de ovejas o de lechos higiénicos para animales pequeños. En estas realizaciones, la presente invención inhibe los microbios que viven en la materia fecal, tales como *E. coli*, y descomponen la urea en la orina para liberar amoníaco. En otra realización, las formulaciones químicas de la presente invención pueden añadirse a un vehículo, tal como, pero sin limitarse a bentonita, zeolita, perlita u otros vehículos con una base de sílice, en cantidades que son eficaces para matar a las bacterias y reducir los olores perjudiciales y nocivos.

En ciertas realizaciones, la presente invención puede mezclarse con una espuma u otra disolución dispersante y emplearse como pulverizado antimicrobiano o para superficies que están contaminadas por bacterias u otros microbios, tal como para el tratamiento de superficies en hospitales, áreas de preparación de comida domésticas, áreas contaminadas para el procesamiento de alimentos, incluyendo todos los procesadores de alimentos industriales, frutas, carnes y otros, en los que la contaminación bacteriana habitualmente es un problema.

En ciertas realizaciones, una composición de la presente invención comprende al menos una formulación química o fórmula de la presente invención. En una realización, las composiciones de la invención se formulan usando uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una fórmula de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cremophor, o cualquier otro tensioactivo biológico, tal como entienden los expertos en la técnica. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es cremophor.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención, y preferiblemente S-3, pueden usarse con un vehículo (zeolita o bentonita o talco) para tratar áreas de tierra que van a recibir pronto semillas o trasplantes juveniles para reducir o eliminar infecciones que provocan la caída de la plántula.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención pueden mezclarse con detergentes para ser usadas como agente de descontaminación bacteriana y de restregado de alfombras para residuos animales, residuos humano u otra biosuciedad de superficies de alfombras.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención pueden administrarse como un pulverizado para descontaminar frutas, verduras, cereales y otros productos agrícolas durante la plantación, durante el crecimiento, durante la recolección y/o durante el transporte.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención pueden aplicarse o formularse, sumergirse o integrarse de otro modo en pañales para bebés, vendas u otros dispositivos en los que se desea una descontaminación bacteriana.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención pueden formularse además con un detergente para actuar como jabón para la descontaminación de la piel humana y animal.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención además pueden formularse, sumergirse o integrarse de otro modo en cera para velas para la descontaminación de un área a través de sus vapores cuando se enciende.

5 En particular, las formulaciones químicas de la presente invención muestran una actividad antibiótica notable contra bacterias asociadas con residuos humanos y animales. Estas mezclas pueden trasladarse específicamente a su respectivo sitio diana a través de vehículos inertes, tales como, pero sin limitarse a bentonita, zeolita, perlita u otros vehículos con una base de sílice. En este caso, la localización específica para el uso del vehículo y la combinación antibiótica puede incluir, por ejemplo y sin limitación, localizaciones de lechos higiénicos de todos los animales domésticos y relacionados con zoos y animales usados como mascotas domésticas. La mezcla puede aplicarse a los establos, los lechos higiénicos y los lugares en que viven los animales para reducir la carga de bacterias y gases perjudiciales.

10 Debe apreciarse que las formulaciones de la presente invención pueden incluir cualquier sal, excipiente, aditivo nutricional o suplemento adicionales, y similares, de modo que la formulación final sea adecuada para la aplicación tópica, la ingestión, la inhalación o cualquier otra forma de administración deseada.

Sistema 1

15 En la presente se describe una formulación química que puede comprender dos ácidos orgánicos y al menos un éster. Por ejemplo, en una realización, la formulación incluye ácido propanoico:ácido isobutírico:butirato de isoamilo. En una realización, la proporción de ácido propanoico:ácido isobutírico:butirato de isoamilo es de 3,5:3,5:2 en v/v/v. En otra realización, la mezcla de ácido propanoico:ácido isobutírico:butirato de isoamilo es de aproximadamente 7 partes de los dos ácidos y 2 partes del éster seleccionado. Se apreciará que la formulación química del sistema 1 no se limita a ninguna proporción concreta de dichos componentes químicos. En otra realización, la formulación química del sistema 1 consiste en solo dos ácidos orgánicos y un solo éster. En esta realización, la formulación consiste en ácido propanoico:ácido isobutírico:butirato de isoamilo a las proporciones descritas anteriormente. En ciertas realizaciones, la formulación puede comprender además cineol, valenceno, sales o cualquier otro aditivo, excipiente u otro componente deseado para producir una formulación que tenga la característica deseada.

20

25 En otra realización, la formulación química del sistema 1 puede añadirse a un vehículo, tal como, pero sin limitarse a bentonita, zeolita, perlita u otros vehículos con una base de sílice, en cantidades que son eficaces para matar bacterias y reducir olores perjudiciales y nocivos. Esta tasa es habitualmente de 1 ml del sistema 1 a 224 g del vehículo en v/p o en otras proporciones apropiadas que sean eficaces, sin limitación.

Sistema 2

30 En la presente se describe cualquier formulación química del sistema 1 más la adición de al menos un hongo endofítico. Tal como se demuestra en la presente, el hongo endofítico del grupo de *F. subglutinans* y otros están particularmente adaptados para crecer en residuos humanos y degradarlos. Además, el hongo solo es capaz de crecer en la combinación de residuos líquidos y sólidos cuando se aplica otra mezcla antimicrobiana, tal como el sistema 1, y esta mezcla permite un máximo de crecimiento fúngico, al mismo tiempo que mata las bacterias y otros microbios. En una realización, el hongo es *Fusarium subglutinans*. En una realización, el hongo se incorpora en el sistema 2 a través de cebada inoculada. En ciertas realizaciones, la formulación puede comprender además cineol, valenceno, sales o cualquier otro aditivo, excipiente u otro componente deseado para producir una formulación que tenga la característica deseada.

40 En una realización, el sistema 2 incluye la formulación química del sistema 1, tal como ácido propanoico:ácido isobutírico:butirato de isoamilo en la proporción de 3,5:3,5:2 en v/v/v, o 7 partes de los dos ácidos y 2 partes del éster, que después se añade a una tasa de 1/10 en v/p de la mezcla al peso seco de la sustancia vehículo, tal como bentonita, perlita o zeolita, etc. Se apreciará que la formulación química del sistema 2 no se limita a ninguna proporción concreta de dichos componentes químicos. También se añade cebada inoculada con *Fusarium subglutinans*. Esta mezcla después se añade en forma de 10 g a cada recipiente, tal como una bolsa de plástico, usado para tratar y eliminar residuos humanos. Permite el crecimiento rápido de *Fusarium subglutinans*, por contraste con el sistema 1 por sí solo, que no lo consigue. También pueden añadirse otros elementos a la bolsa, que incluyen polímeros absorbentes de líquidos en cantidades apropiadas, tal como entenderán los expertos en la técnica.

Sistema 3

50 Tal como se contempla en la presente, la formulación química de la presente invención puede comprender al menos un ácido orgánico y al menos un éster. Dicho al menos un ácido orgánico es ácido propanoico. Dicho al menos un éster es hexanoato de isoamilo o una mezcla de hexanoatos de isoamilo. En una realización preferida, dicho al menos un éster son hexanoatos de isoamilo. En una realización, la formulación química comprende ácido propanoico y hexanoatos de isoamilo. En ciertas realizaciones, la formulación puede comprender además cineol, valenceno, sales o cualquier otro aditivo, excipiente u otro componente deseado para producir una formulación que tenga la característica deseada.

55

En una realización, la proporción de ácido propanoico:hexanoatos de isoamilo es de aproximadamente 7:2 en v/v. Se apreciará que la formulación química del sistema 3 no se limita a ninguna proporción concreta de dichos componentes químicos. En otra realización, la formulación química del sistema 3 consiste en un único componente de ácido orgánico y un único componente de éster. En otra realización, la formulación química del sistema 3 consiste en un único componente de ácido orgánico y una mezcla de hexanoatos de isoamilo. En esta realización, la formulación consiste en ácido propanoico:hexanoatos de isoamilo a las proporciones descritas anteriormente. En otra realización, la formulación química consiste fundamentalmente en ácido propanoico y hexanoatos de isoamilo en una proporción de ácido propanoico:hexanoatos de isoamilo de aproximadamente 7:2 en v/v.

En otra realización, la formulación química del sistema 3 puede añadirse a un vehículo, tal como, pero sin limitarse a bentonita, zeolita, perlita u otros vehículos con una base de sílice, en cantidades que son eficaces para matar bacterias y reducir olores perjudiciales y nocivos.

Esta tasa habitualmente está entre 1,0 y 1,5 ml del sistema 3 a 224 g del vehículo en v/p o en otras proporciones apropiadas que sean eficaces, sin limitación, tales como entre 0,1 y 5 ml del sistema 3 a 224 g del vehículo en v/p, o entre 0,5 y 2 ml del sistema 3 a 224 g del vehículo en v/p.

Sistema 4

En la presente se describe una formulación química que puede comprender al menos un ácido orgánico y al menos un éster. En una realización preferida, dicho al menos un ácido es ácido propanoico. En una realización, dicho al menos un éster es formiato de isoamilo. En otra realización, dicho al menos un éster puede ser cualquier componente de éster (ácido) de un solo carbono. En una realización, la formulación química comprende ácido propanoico y formiato de isoamilo. En ciertas realizaciones, la formulación puede comprender además cineol, valenceno, sales o cualquier otro aditivo, excipiente u otro componente deseado para producir una formulación que tenga la característica deseada.

En una realización, la proporción de ácido propanoico:formiato de isoamilo es de 7:2 en v/v. Se apreciará que la formulación química del sistema 4 no se limita a ninguna proporción concreta de dichos componentes químicos. En otra realización, la formulación química del sistema 4 consiste en un único componente de ácido orgánico y un único componente de éster. En esta realización, la formulación consiste en ácido propanoico:formiato de isoamilo a las proporciones descritas anteriormente. En una realización, la formulación química consiste fundamentalmente en ácido propanoico y formiato de isoamilo en una proporción de ácido propanoico:formiato de isoamilo de 7:2 en v/v.

Tal como se contempla en la presente, la presente invención puede incluir cualquier formulación química del sistema 4 más la adición de al menos un hongo endofítico. Tal como se demuestra en la presente, los hongos endofíticos del grupo de *F. subglutinans* y otros están particularmente adaptados para crecer en residuos humanos y degradarlos. Además, el hongo solo es capaz de crecer en la combinación de residuos líquidos y sólidos cuando se aplica otra mezcla antimicrobiana, tal como el sistema 4, y esta mezcla permite un máximo de crecimiento fúngico, al mismo tiempo que mata las bacterias y otros microbios. En una realización, el hongo es *Fusarium subglutinans*. En otra realización, la presente invención incluye una formulación química que comprende una mezcla 7:2 de ácido propanoico y formiato de isoamilo, y opcionalmente con la adición de un *Fusarium subglutinans*. En esta realización, la mezcla de ácido propanoico/formiato de isoamilo es adecuada para matar microorganismos seleccionados sin matar a los *Fusarium* spp., lo cual puede potenciar aún más el reciclaje de un producto de los residuos a los cuales se aplica la formulación. En una realización, el hongo se incorpora en el sistema 4 a través de cebada inoculada.

En una realización, el sistema 4 incluye ácido propanoico:formiato de isoamilo a la proporción de 7:2 en v/v, que después se añade a una tasa de 1/10 en v/p de la mezcla al peso seco de la sustancia vehículo, tal como bentonita, perlita o zeolita, etc. También puede añadirse cebada inoculada con *Fusarium subglutinans*. Esta mezcla después se añade a un recipiente, tal como una bolsa de plástico, usado para tratar y eliminar residuos humanos. Permite el crecimiento rápido de *Fusarium subglutinans*. También pueden añadirse otros elementos a la bolsa, que incluyen polímeros absorbentes de líquidos en cantidades apropiadas, tal como entenderán los expertos en la técnica.

Sistema 5

Por ejemplo, en una realización, la formulación incluye ácido propanoico:ácido isobutírico:hexanoatos de isoamilo. En una realización, la proporción de ácido propanoico:ácido isobutírico:hexanoatos de isoamilo es de 3,5:3,5:2 en v/v/v. En otra realización, la mezcla de ácido propanoico:ácido isobutírico:hexanoatos de isoamilo es de aproximadamente 7 partes de los dos ácidos y 2 partes del éster seleccionado. Se apreciará que la formulación química del sistema 5 no se limita a ninguna proporción concreta de dichos componentes químicos. En otra realización, la formulación química del sistema 5 consiste en solo dos ácidos orgánicos y un solo éster. En esta realización, la formulación consiste en ácido propanoico:ácido isobutírico:hexanoatos de isoamilo a las proporciones descritas anteriormente. En ciertas realizaciones, la formulación puede comprender además cineol, valenceno, sales o cualquier otro aditivo, excipiente u otro componente deseado para producir una formulación que tenga la característica deseada.

En otra realización, la formulación química del sistema 5 puede añadirse a un vehículo, tal como, pero sin limitarse a bentonita, zeolita, perlita u otros vehículos con una base de sílice, en cantidades que son eficaces para matar bacterias y reducir olores perjudiciales y nocivos.

Sistema X

5 Tal como se contempla en la presente, la presente invención puede incluir cualquier formulación química de los sistemas 3 o 5 en combinación con al menos uno de una sal, excipiente, aditivo nutricional o suplemento. En una realización preferida, la formulación química es el sistema 3. Tal como se demuestra en la presente, una formulación química que comprende el sistema 3, al menos un suplemento nutricional y al menos una sal es útil para tratar enfermedades y trastornos asociados con una infección microbiana. Los ejemplos de suplementos nutricionales incluyen, pero no se limitan a azúcares, tales como glucosa, sacarosa o fructosa, aminoácidos, tales como glicina, y fuentes de proteínas, tales como proteína del suero. Puede usarse cualquier fuente de proteína, tal como entenderán los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de sales incluyen cloruro de potasio, cloruro de sodio, sulfato de magnesio, fosfato de monopotasio, sulfato de potasio y acetato de magnesio. Las sales son útiles en las formulaciones de la invención, puesto que potencian el equilibrio de electrolitos en un sujeto. En las composiciones de la invención puede usarse cualquier cantidad de sal. Se prefiere que la cantidad de sal sea mayor que 0%. La presencia del sistema 3 inhibe y mata a las bacterias patógenas. En una realización, el sistema X incluye la formulación química del sistema 3, glucosa, proteína del suero, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de sodio. En otra realización, el sistema X incluye la formulación química del sistema 3, glucosa, glicina, cloruro de potasio, cloruro de sodio y acetato de magnesio. En otra realización, el sistema X incluye la formulación química del sistema 3, glucosa, glicina, cloruro de potasio, cloruro de sodio, acetato de magnesio y fosfato de monopotasio. Se apreciará que la formulación química del sistema X no se limita a ninguna proporción concreta de dichos componentes químicos. En una realización, la cantidad del ácido orgánico es de aproximadamente 100% y la cantidad del éster es del 0%. En otra realización, la cantidad del ácido orgánico es de aproximadamente 99% y la cantidad del éster es de aproximadamente 1%. En otra realización, la cantidad del ácido orgánico es de aproximadamente 1% y la cantidad del éster es de aproximadamente 99%.

En ciertas realizaciones, el sistema X se formula usando uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cremophor, o cualquier otro tensioactivo biológico, tal como entienden los expertos en la técnica. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es cremophor. En una realización, el sistema X incluye la formulación química del sistema 3 y cremophor.

En la presente se indica que los sistemas 2 y 4 pueden usarse con o sin un vehículo para tratar residuos animales (que incluyen residuos humanos) en presencia de *Fusarium subglutinans*. En estas realizaciones, la presente invención inhibe y mata a las bacterias, y al mismo tiempo permite el crecimiento de *F. subglutinans* que, en último término, descompondrá o provocará la descomposición del material sólido en los residuos humanos.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención se emplean para fumigar semillas que están contaminadas por un microorganismo.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención se administran como una fórmula gaseosa sin agua ni cualquier vehículo adicional.

Métodos

40 La descontaminación de residuos humanos es solo uno de los problemas asociados con el proceso del tratamiento de residuos. Otro problema que trata la presente invención es la necesidad de comenzar inmediatamente el proceso de degradación del material orgánico en los residuos sólidos y líquidos. La biología y la bioquímica que aparecen cuando se combinan residuos sólidos y líquidos son complejas. La urea en la orina es atacada inmediatamente por la enzima ureasa que se encuentra en la mayoría de los microbios asociados con los residuos sólidos, con la producción concomitante de amoníaco gaseoso. El propio gas es perjudicial y produce un olor espantoso. También es letal para la mayoría de los hongos, puesto que provoca un aumento en el pH. Así, si se desea provocar la degradación de residuos, es fundamental detener la producción de amoníaco, lo cual es deseable para el crecimiento de hongos y para la remediación del amoníaco en el entorno. Cada uno de los sistemas 1-4 provoca la muerte y la inhibición del crecimiento bacteriano y la posterior producción de amoníaco, y los sistemas 2 y 4 también permiten el crecimiento correcto de *Fusarium subglutinans*, que después degrada los residuos. Por tanto, los sistemas 1 y 3 son particularmente adecuados para tratar lechos higiénicos de animales, residuos, etc., con la reducción del amoníaco.

El descubrimiento del microorganismo apropiado que consiguiese la descomposición rápida de residuos humanos y animales comenzó con la consideración de que los microbios que viven dentro de las plantas (es decir, los endofitos) serían un punto de partida apropiado para comenzar la búsqueda. Los endofitos son los primeros microbios implicados en la degradación de una planta cuando esta muere de causas naturales o como consecuencia de daños ambientales. Contienen un conjunto de enzimas que degradan la celulosa, la lignina y las hemicelulosas que se encuentran en materiales vegetales. Estos son los mismos materiales orgánicos complejos que se encuentran en los

residuos sólidos humanos; por tanto, para abordar el problema del cual trata la presente solicitud, concretamente, la degradación de residuos humanos y animales, se localizó a una serie de microbios endofíticos y se ensayaron para su capacidad para crecer en residuos sólidos y líquidos humanos. Para que un microbio degrade los residuos debe ser insensible al amoníaco que es producido, o el amoníaco debe eliminarse de la ecuación. Por tanto, usando los sistemas 2 y/o 4, que permiten el crecimiento de *Fusarium* spp. y la eliminación de la producción de amoníaco, es posible diseñar un medio útil y lógico para tratar residuos líquidos y sólidos.

En un aspecto, la presente invención incluye un método para tratar residuos humanos o animales. En una realización, el método comprende poner en contacto residuos humanos o animales con una composición de la presente invención, en el que la composición mata o reduce el crecimiento de bacterias en los residuos humanos o animales. En una realización, la composición comprende una formulación química de la presente invención. En una realización, la formulación química comprende además al menos un hongo. En otra realización, dicho al menos un hongo aumenta la velocidad de descomposición de los residuos humanos o animales.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para eliminar o reducir el crecimiento microbiano en un sitio de tratamiento. En una realización, el método comprende poner en contacto el sitio de tratamiento con una composición de la presente invención, en el que la composición mata o reduce el crecimiento de bacterias en los residuos humanos o animales. En una realización, la composición comprende una formulación química de la presente invención. En una realización, la formulación química comprende además al menos un hongo.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para eliminar o reducir la formación de olores en un sitio de tratamiento. En una realización, el método comprende poner en contacto el sitio de tratamiento con una composición de la presente invención, en el que la composición elimina o reduce la formación de olores en los residuos humanos o animales.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para eliminar o reducir la cantidad de amoníaco en un sitio de tratamiento. En una realización, el método comprende poner en contacto el sitio de tratamiento con una composición de la presente invención, en el que la composición elimina o reduce la cantidad de amoníaco en los residuos humanos o animales.

En otro aspecto, la presente invención incluye un método para fumigar semillas que están contaminadas por un microorganismo. En una realización, el método comprende poner en contacto las semillas con una composición de la presente invención, en el que la composición reduce o elimina el crecimiento microbiano sobre las semillas, y en algunas realizaciones, reduce o elimina el crecimiento microbiano sobre las semillas sin alterar significativamente la germinación.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención pueden usarse en áreas hospitalarias para tratar residuos humanos en combinación con un vehículo que se colocará en cuñas para detener la contaminación del área con bacterias fecales. En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención pueden usarse como antiséptico para tratar cortes y heridas e infecciones superficiales en animales y seres humanos. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para tratar infecciones intestinales bacterianas y víricas en seres humanos y animales. Se advertirá que todos los ingredientes de los sistemas 1-4 están listados en GRAS y, por tanto, son seguros. En particular, un ser humano ha consumido 10 ml de S-3 sin experimentar efectos adversos. Las composiciones y las formulaciones de la presente invención también pueden usarse para tratar o desinfectar las superficies de objetos inanimados o no vivos, o para pulverizar o aplicar por vía tópica a todo tipo de plantas, tales como frutas agrícolas, verduras, cereales y similares, o para ser aplicadas por vía tópica, ser ingeridas o inhaladas por cualquier tipo de animal, tal como ganado o seres humanos.

En un aspecto, la presente invención incluye un método para conservar una fruta. En una realización, el método comprende administrar a la fruta una cantidad eficaz de una composición de la presente invención. En una realización, la fruta es una frambuesa o una uva.

En ciertas realizaciones, las fórmulas de la presente invención, y preferiblemente S-3, pueden usarse para desinfectar el maíz que se emplea para la fermentación para producir alcohol.

La mastitis es una infección de los tejidos de la ubre de una vaca. Casi cualquier organismo bacteriano o micótico que puede invadir de modo oportunista un tejido y provocar una infección puede provocar mastitis. Representa uno de los problemas más importantes en la producción lechera. La mayoría de las infecciones de mastitis son provocadas por diversas especies de estreptococos, estafilococos y bacilos gram-negativos, en especial organismos que fermentan la lactosa de origen entérico, denominados habitualmente coliformes, y estos incluyen organismos tales como *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Desde un punto de vista epidemiológico, la fuente de la infección puede considerarse contagiosa o ambiental, y las vacas están en peligro constante de infectarse con estos agentes.

Excepto por *Mycoplasma* spp, que pueden extenderse de una vaca a otra a través de una transmisión en aerosol e invaden la ubre después de una bacteremia, los patógenos contagiosos se extienden durante el ordeño a través de las manos de los ordeñadores o el revestimiento de la unidad de ordeño. Las principales especies bacterianas que utilizan este modo de transmisión incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, y *Corynebacterium*

bovis. La mayoría de las otras especies son invasores oportunistas proceden del entorno de la vaca, aunque algún otro estreptococo y estafilococo también puede tener un componente contagioso.

Las infecciones intramamarias a menudo se describen como mastitis subclínica o clínica. La mastitis subclínica es la presencia de una infección sin señales aparentes de inflamación local o implicación sistémica. Aunque pueden aparecer episodios transitorios de leche anómala o inflamación de la ubre, estas infecciones son, en su mayor parte, asintomáticas, y si la infección persiste durante al menos 2 meses, se denominan crónicas. Tras establecerse, muchas de estas infecciones persisten durante la lactancia completa o la vida de la vaca. La detección se realiza de la mejor forma mediante el examen de la leche para el recuento de células somáticas (predominantemente neutrófilos) usando el ensayo de la mastitis de California o métodos automáticos proporcionados por las organizaciones de mejora de los rebaños lecheros. Los recuentos de células somáticas se correlacionan positivamente con la presencia de una infección. Aunque es variable (en especial si se determina basándose en un único análisis), las vacas con un recuento de células somáticas de ≥ 280.000 células/ml (\geq una puntuación lineal de 5) tienen $>80\%$ de posibilidad de infectarse. De modo similar, cuanto mayor sea el recuento de células somáticas en el tanque de leche de un rebaño, mayor es la prevalencia de la infección en el rebaño. Los agentes patológicos deben identificarse mediante el cultivo bacteriano de la leche.

La mastitis clínica es una respuesta inflamatoria a la infección que provoca una leche visiblemente anómala (por ejemplo, color, coágulos de fibrina). A medida que aumenta el grado de la inflamación, también pueden resultar evidentes cambios en la ubre (hinchamiento, calor, dolor, enrojecimiento). Los casos clínicos que incluyen solo señales locales se denominan suaves o moderados. Si la respuesta inflamatoria incluye una implicación sistémica (fiebre, anorexia, choque), el caso se denomina grave. Si la aparición es muy rápida, como ocurre a menudo con los casos clínicos graves, se denomina un caso agudo de mastitis grave. Las vacas más gravemente afectadas tienden a tener más secreciones serosas en el lote afectado.

Aunque cualquier número de lotes pueden estar infectados simultáneamente en la mastitis subclínica, generalmente solo un lote cada vez presentará mastitis clínica. Sin embargo, no es raro que los episodios clínicos provocados por *Mycoplasma* afecten a múltiples lotes. También puede aparecer una mastitis gangrenosa, en particular cuando las infecciones crónicas subclínicas de *S. aureus* se convierten en graves en momentos de inmunosupresión (por ejemplo, durante el parto). Al igual que con la mastitis subclínica, el cultivo de muestras de leche recogida de los lotes afectados es el único método fiable para determinar la etiología de los casos clínicos.

Todos los rebaños lecheros contienen vacas con mastitis subclínica; sin embargo, la prevalencia de las vacas infectadas varía del 15-75%, y en los lotes del 5-40%. Muchos patógenos diferentes pueden establecer una infección crónica que solo a veces manifiesta señales clínicas de mastitis. El foco principal de la mayoría de los programas para la mastitis subclínica es reducir la prevalencia de los patógenos contagiosos *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, así como otros cocos gram-positivos, de forma más notable *Streptococcus dysgalactiae* (que también puede ser contagioso o un patógeno ambiental), *Streptococcus uberis*, enterococos, y numerosos otros estafilococos negativos a coagulasa, que incluyen *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, y *S. intermedius*.

Para los patógenos contagiosos, los terneros lactantes adultos son los que se encuentran en más riesgo de infección, cuando están lactando o durante el periodo seco. El depósito principal de infección es la glándula mamaria; la transmisión se produce durante el ordeño, y las manos del ordeñador o el equipo de ordeño actúan como fómites. Se ha indicado que las becerras primiparas se infectan con estafilococos y estreptococos antes de parir el ternero, aunque la prevalencia varía mucho entre rebaños y regiones geográficas. Se ha asociado a la dermatitis del pezón provocada por la mosca del cuerno, *Haematobia irritans*, que puede portar *S. aureus*, con un mayor riesgo de infección de las becerras, en especial en climas más cálidos.

Los tratamientos que se emplean habitualmente incluyen el uso de antibióticos, que plantean una amenaza para la leche obtenida del animal, puesto que los antibióticos se trasladan a la ubre. La leche no puede usarse durante al menos 3 días después de la administración del antibiótico. El uso de la inmunización no es posible, puesto que existe un gran número de patógenos potenciales implicados en la enfermedad de la mastitis. La recomendación general consiste en intensificar las prácticas higiénicas con la limpieza de la sala de ordeño y de las áreas frecuentadas por los animales. En la actualidad, ninguno de los tratamientos disponibles ha demostrado ser eficaz y seguro para tratar la mastitis.

En un aspecto, la presente invención incluye una formulación para tratar un animal que padece una enfermedad o un trastorno asociado con una infección microbiana. Estas enfermedades y trastornos pueden incluir, sin limitación, enfermedades diarreicas, tales como diarrea neonatal, intoxicación alimentaria o gripe estomacal, o infecciones intramamarias, tales como mastitis subclínica o clínica. También se apreciará que las formulas y las composiciones de la presente invención no se limitan al tratamiento de ningún tipo concreto de sujeto. Tal como se contempla en la presente, el sujeto puede ser cualquier animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente ganado, tal como ganado vacuno, ovejas o cerdos, o incluso un ser humano. En una realización, el animal es bovino, porcino u ovino. En otra realización, el animal es humano.

En otro aspecto, la presente invención incluye una formulación para tratar una vaca que padece diarrea neonatal.

En otro aspecto, la presente invención incluye una formulación para tratar un cerdo que padece diarrea neonatal.

En otro aspecto, la presente invención incluye una formulación para tratar una vaca que padece mastitis.

En otro aspecto, la presente invención incluye una formulación para tratar una oveja que padece mastitis.

- 5 En otro aspecto, la presente invención incluye una formulación para tratar un ser humano que padece una enfermedad diarreica. En una realización, la enfermedad diarreica es una intoxicación alimentaria o gripe estomacal.

Terapia de combinación

10 Las composiciones de la presente invención están previstas para ser útiles en combinación con uno o más compuestos adicionales. En unos ejemplos no limitantes, las composiciones de la invención pueden usarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos (o una de sus sales, solvatos o profármacos). Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos incluyen antibióticos, tales como Baytril, sulfonamidas, Nuflor, Tylan 40-50, Excede, Noromycin LA, Draxxin, y tetraciclina, vacunas, tales como Inforce 3, multivitaminas, probióticos, y absorbentes de toxinas, tales como Toxiban, u otros agentes terapéuticos, tales como Suprio.

15 En otra realización, las composiciones de la invención pueden usarse en combinación con un detergente. En una realización, el detergente actúa como un agente solubilizante para la composición, al mismo tiempo que elimina los restos cargados de bacterias no deseadas del área de la infección del sujeto y cualquier otra posible fuente de infección, tales como lechos higiénicos, herramientas o lugares en donde vive el sujeto. En un ejemplo no limitante, las composiciones de la presente invención son útiles para tratar la ubre, el lecho higiénico usado para alojar ganado, que es la fuente principal de patógenos ambientales, así como las herramientas usadas en el proceso de ordeño, que se han identificado como fuentes potenciales de infección, tales como disoluciones de inmersión para pezones, infusiones intramamarias, mangueras de agua usadas para la preparación de la ubre durante el ordeños, estanques de agua o revolcaderos, lesiones de la piel, traumatismos en la teta, y moscas. Los ejemplos no limitantes de detergentes incluyen Sucragel CF, Chemoxide CAW, BioSoft D40, Lathanol LAL, BioTerge AS-40, Nacconol 90G, y cocoato de potasio.

25 *Composiciones farmacéuticas y terapias*

La administración de una composición útil en la invención puede lograrse por medio de una serie de maneras diferentes, usando métodos conocidos en la técnica. Por tanto, los métodos terapéuticos y profilácticos de la invención incluyen el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones útiles en la invención para practicar los métodos de la invención. Las composiciones farmacéuticas útiles para practicar la invención pueden administrarse para trasladar una dosis de 1 ng/kg/día a 100 mg/kg/día.

Las cantidades relativas del ingrediente activo, el vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, el tamaño y la condición del sujeto tratado, y también dependerán de la vía mediante la cual se va a administrar la composición. Como ejemplo, la composición puede comprender entre 0,1% y 100% (en p/p) del ingrediente activo.

35 Aunque la descripción de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente se dirige principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a seres humanos, los expertos en la técnica entenderán que dichas composiciones son adecuadas en general para la administración de todo tipo de animales. La modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos para hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a diversos animales es bien entendida, y los farmacólogos veterinarios expertos pueden diseñar y realizar dicha modificación con la experimentación habitual, o sin ella. Los sujetos a los cuales se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a seres humanos y otros primates, mamíferos, que incluyen mamíferos importantes desde el punto de vista comercial, tales como primates no humanos, ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros.

45 Generalmente, las dosificaciones que pueden administrarse en un método de la invención a un animal, preferiblemente un ser humano, varían en cantidad de 0,5 µg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal del animal. Aunque la dosificación precisa administrada variará dependiendo de una serie de factores que incluyen, pero no se limitan al tipo de animal y el tipo de estado de enfermedad que se está tratando, la edad del animal y la vía de administración, la dosificación de la composición preferiblemente variará de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal del animal. Más preferiblemente, la dosificación variará de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 1 mg por kilogramo de peso corporal del animal.

55 Las composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos de la invención pueden prepararse, envasarse o comercializarse en composiciones adecuadas para la vía oral, parenteral, tópica, bucal, u otra vía de administración. Otras composiciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas, preparaciones liposómicas, eritrocitos resellados que contienen el ingrediente activo, y composiciones con una base inmunológica.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado en el futuro en la técnica de la farmacología. En general, estos métodos preparatorios incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable o uno o más ingredientes accesorios, y después, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto en una forma unitaria o de múltiples dosis deseada.

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o comercializarse a granel, como una única dosis unitaria o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Tal como se emplea en la presente, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo en general es igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un sujeto, o una fracción conveniente de dicha dosificación, tal como, por ejemplo, la mitad o una tercera parte de dicha dosificación.

En una realización, las composiciones de la invención se formulan usando uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que son útiles incluyen, pero no se limitan a glicerol, agua, disolución salina, etanol y otras disoluciones salinas farmacéuticamente aceptables, tales como fosfatos y sales de ácidos orgánicos. Se describen ejemplos de estos y otros vehículos farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (1991, Mack Publication Co., Nueva Jersey).

El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), sus mezclas adecuadas, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o polialcoholes, tales como manitol y sorbitol, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable no es DMSO por sí solo.

Las composiciones pueden emplearse en mezclas con excipientes convencionales, concretamente, sustancias orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la vía oral, parenteral, nasal, intravenosa, subcutánea, entérica o cualquier otro modo de administración adecuado conocido en la técnica. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulgentes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, agentes colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares. También pueden combinarse cuando se desee con otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes analgésicos.

Tal como se emplea en la presente, "ingredientes adicionales" incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes granulantes y disgregantes; agente ligantes; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables, tales como gelatina; disolventes y vehículos acuosos; disolventes y vehículos oleosos; agentes suspensores; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulgentes, demulcentes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agente emulgentes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Otros "ingredientes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Genaro, ed. (1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa).

La composición farmacéutica de la invención puede comprender un conservante desde aproximadamente 0,005% al 2,0% en peso total de la composición. El conservante se emplea para evitar la descomposición en el caso de exposición a los contaminantes en el entorno. Los ejemplos de conservantes útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a los seleccionados del grupo que consiste en alcohol bencílico, ácido sórbico, parabenos, imidurea y sus combinaciones. Un conservante particularmente preferido es una combinación de aproximadamente 0,5% al 2,0% de alcohol bencílico y del 0,05% al 0,5% de ácido sórbico.

La composición farmacéutica preferiblemente incluye un antioxidante y un agente quelante que inhibe la degradación de la formulación. Los antioxidantes preferidos para algunas formulaciones son BHT, BHA, alfa-tocoferol y ácido ascórbico en el intervalo preferido de aproximadamente 0,01% al 0,3%, y más preferiblemente BHT en el intervalo del 0,03% al 0,1% en peso de la composición. Preferiblemente, el agente quelante está presente en una cantidad del 0,01% al 0,5% en peso por peso total de la composición. Los agentes quelantes particularmente preferidos incluyen sales edetato (por ejemplo, edetato de disodio) y ácido cítrico en el intervalo de peso de aproximadamente 0,01% al 0,20%, y más preferiblemente en el intervalo del 0,02% al 0,10% en peso por peso total de la composición. El agente quelante es útil para quelar iones metálicos en la composición que pueden ser perjudiciales para la caducidad de la formulación. Aunque BHT y edetato de disodio son el antioxidante y el agente

quelante particularmente preferidos, respectivamente, para algunas formulaciones, pueden sustituirse por otros antioxidantes y agentes quelantes adecuados y equivalentes, tal como saben los expertos en la técnica.

5 Pueden prepararse suspensiones líquidas usando métodos convencionales para lograr la suspensión del ingrediente activo en un vehículo acuoso u oleoso. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua y disolución salina isotónica. Los vehículos oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo o coco, aceites vegetales fraccionados y aceites minerales, tales como parafina líquida. Las suspensiones líquidas pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a agentes suspensores, agentes dispersantes o humectantes, agentes emulgentes, demulcentes, conservantes, tampones, sales, aromas, agentes colorantes y agentes edulcorantes. Las suspensiones oleosas pueden comprender además un agente espesante. Los agentes suspensores incluyen, pero no se limitan a jarabe de sorbitol, grasas comestibles hidrogenadas, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, goma arábiga y derivados de celulosa, tales como carbometilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa. Los agentes dispersantes o humectantes conocidos incluyen, pero no se limitan a fosfatidas naturales, tales como lecitina, productos de la condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso, con un alcohol alifático de cadena larga, con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol, o con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, estearato de polioxietileno, monooleato de polioxietilensorbitol y monooleato de polietilensorbitano, respectivamente). Los agentes emulgentes conocidos incluyen, pero no se limitan a lecitina y goma arábiga. Los conservantes conocidos incluyen, pero no se limitan a metil-, etil-, o n-propil-para-hidroxibenzoatos, ácido ascórbico y ácido sórbico. Los agentes edulcorantes conocidos incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa y sacarina. Los agentes espesantes conocidos para suspensiones oleosas incluyen, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura, y alcohol cetílico.

25 Pueden prepararse disoluciones líquidas del ingrediente activo en disolventes acuosos u oleosos sustancialmente de la misma manera que las suspensiones líquidas, y la diferencia principal es que el ingrediente se disuelve, en lugar de suspenderse, en el disolvente. Tal como se emplea en la presente, un líquido "oleoso" es un líquido que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que muestra un carácter menos polar que el agua. Las disoluciones líquidas de la composición farmacéutica de la invención pueden comprender cada uno de los componentes descritos con respecto a las suspensiones líquidas, entendiendo que los agentes suspensores no ayudarán necesariamente a la disolución del ingrediente activo en el disolvente. Los disolventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y disolución salina isotónica. Los disolventes oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo o coco, aceites vegetales fraccionados y aceites minerales, tales como parafina líquida.

35 Pueden prepararse formulaciones en polvo y granulares de la preparación farmacéutica de la invención usando métodos conocidos. Estas formulaciones pueden administrarse directamente a un sujeto, pueden usarse, por ejemplo, para formar comprimidos, para rellenar cápsulas o para preparar una suspensión acuosa u oleosa mediante la adición de un vehículo acuoso u oleoso. Cada una de estas formulaciones pueden comprender además uno o más de un agente dispersante o humectante, un agente suspensor y un conservante. También pueden incluirse otros excipientes, tales como cargas y agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes, en estas formulaciones.

40 Una composición farmacéutica de la invención también puede prepararse, envasarse o comercializarse en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral, tal como parafina líquida, o una combinación de estos. Estas composiciones también pueden comprender uno o más agentes emulgentes, tales como gomas naturales, tales como goma arábiga o goma de tragacanto, fosfatidas naturales, tales como soja o fosfatida de lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de combinaciones de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitano, y productos de la condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilensorbitano. Estas emulsiones también pueden contener ingredientes adicionales que incluyen, por ejemplo, agentes edulcorantes o aromatizantes.

50 Los métodos para impregnar o revestir un material con una composición química son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a métodos para depositar o unir una composición química sobre una superficie, métodos para incorporar una composición química en la estructura de un material durante la síntesis del material (concretamente, tal como con un material fisiológicamente degradable), y métodos para absorber una disolución o suspensión acuosa u oleosa en un material absorbente, con o sin un secado posterior.

55 Pueden prepararse formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición de la invención usando la tecnología convencional, además de la descripción indicada en otro punto en la presente. En algunos casos, las formas de dosificación usadas pueden proporcionarse como una liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos en su interior usando, por ejemplo, hidropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, revestimientos de múltiples capas, micropartículas, liposomas o microesferas, o una de sus combinaciones, para proporcionar el perfil de liberación deseado en diversas proporciones. Pueden seleccionarse con facilidad formulaciones de liberación controlada adecuadas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo las descritas en la presente, para su uso con las composiciones de la invención.

La liberación controlada de un ingrediente activo puede estimularse por medio de diversos inductores, por ejemplo, pH, temperatura, enzimas, agua u otras condiciones fisiológicas o compuestos. La expresión “componente de liberación controlada”, en el contexto de la presente invención, se define en la presente como un compuesto o compuestos que incluyen, pero no se limitan a polímeros, matrices poliméricas, geles, membranas permeables, liposomas, nanopartículas o microesferas, o una de sus combinaciones, que facilitan la liberación controlada del ingrediente activo.

Administración/dosificación

El régimen de administración puede afectar a lo que constituye una cantidad eficaz. Las formulaciones terapéuticas pueden administrarse al sujeto antes o después del diagnóstico de una enfermedad. Además, pueden administrarse varias dosis divididas, así como dosificaciones escalonadas, a diario o de modo secuencial, o la dosis puede infundirse continuamente o puede ser una inyección en embolada. Además, las dosificaciones de las formulaciones terapéuticas pueden aumentar o disminuir proporcionalmente, según indiquen las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

La administración de las composiciones de la presente invención a un sujeto, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, puede realizarse usando procedimientos conocidos, a unas dosificaciones y durante unos periodos de tiempo eficaces para prevenir o tratar una enfermedad. Una cantidad eficaz de la composición terapéutica necesaria para lograr un efecto terapéutico puede variar dependiendo de factores, tales como la actividad de la composición concreta empleada; el momento de la administración; la velocidad de excreción de la composición; la duración del tratamiento; otros fármacos, composiciones o materiales usados en combinación con la composición; el estado de la enfermedad o el trastorno, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica previa del sujeto que se está tratando y factores similares muy conocidos en la técnica médica. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas a diario, o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Un ejemplo no limitante de un intervalo de dosis eficaz para una composición terapéutica de la invención es entre aproximadamente 1 y 5.000 mg/kg de peso corporal/por día. Los expertos en la técnica serán capaces de estudiar los factores pertinentes y realizar la determinación con respecto a la cantidad eficaz de la composición terapéutica sin experimentos indebidos.

La composición puede administrarse a un animal con tanta frecuencia como varias veces diarias, o puede administrarse con menos frecuencia, tal como una vez diaria, una vez semanal, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad la frecuencia de la dosis y esta dependerá de una serie de factores, tales como, pero sin limitarse al tipo y la gravedad de la enfermedad que se está tratando, el tipo y la edad del animal, etc. Las composiciones de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado en el futuro en la técnica de la farmacología. En general, estos preparatorios incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo con un vehículo o uno o más ingredientes accesorios, y después, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto en una forma unitaria o de múltiples dosis deseada.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto, una composición y un modo de administración concretos, sin ser tóxicos para el sujeto.

Un doctor en medicina, por ejemplo, un médico o un veterinario, que sea experto en la técnica puede determinar con facilidad y recetar la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o el veterinario puede empezar la dosificación de las composiciones de la invención empleadas en la composición farmacéutica a unos niveles inferiores a los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado.

En realizaciones concretas, resulta especialmente ventajoso formular la composición en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Una forma de dosificación unitaria, tal como se emplea en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las formas de dosificación unitarias de la invención vienen dictadas y dependen directamente de (a) las características exclusivas de la composición terapéutica y el efecto terapéutico que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de formación de compuestos/de formulación de dicha composición terapéutica para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto.

En una realización, las composiciones de la invención se administran al sujeto en dosificaciones que varían de una a cinco veces diarias o más. En otra realización, las composiciones de la invención se administran al sujeto en intervalos de dosificaciones que incluyen, pero no se limitan a una vez diaria, cada dos días, cada tres días a una vez semanal, y una vez cada dos semanas. Para los expertos en la técnica será evidente que la frecuencia de administración de las diversas composiciones de combinación de la invención variará de un sujeto a otro

dependiendo de muchos factores que incluyen, pero no se limitan a la edad, la enfermedad o el trastorno que se va a tratar, el género, la salud global y otros factores. Por tanto, no debe considerarse que la invención se limite a ningún régimen de dosificación concreto, y la dosis y la composición precisas que se van a administrar a cualquier sujeto serán determinadas por el médico encargado tomado en cuenta todos los demás factores acerca del sujeto.

5 Las composiciones de la invención para la administración pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 950 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 850 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 75 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 250 mg, y cualquier incremento parcial o completo entre ellos.

En algunas realizaciones, la dosis de una composición de la invención es entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 2.500 mg. En algunas realizaciones, una dosis de una composición de la invención usada en las composiciones descritas en la presente es menor que aproximadamente 10.000 mg, o menor que aproximadamente 8.000 mg, o menor que aproximadamente 6.000 mg, o menor que aproximadamente 5.000 mg, o menor que aproximadamente 3.000 mg, o menor que aproximadamente 2.000 mg, o menor que aproximadamente 1.000 mg, o menor que aproximadamente 500 mg, o menor que aproximadamente 200 mg, o menor que aproximadamente 100 mg. De modo similar, en algunas realizaciones, una dosis de una segunda composición (es decir, un fármaco usado para tratar la misma enfermedad u otra que la tratada por las composiciones de la invención), tal como se describe en la presente, es menor que aproximadamente 1.000 mg, o menor que aproximadamente 800 mg, o menor que aproximadamente 600 mg, o menor que aproximadamente 500 mg, o menor que aproximadamente 400 mg, o menor que aproximadamente 300 mg, o menor que aproximadamente 200 mg, o menor que aproximadamente 100 mg, o menor que aproximadamente 50 mg, o menor que aproximadamente 40 mg, o menor que aproximadamente 30 mg, o menor que aproximadamente 25 mg, o menor que aproximadamente 20 mg, o menor que aproximadamente 15 mg, o menor que aproximadamente 10 mg, o menor que aproximadamente 5 mg, o menor que aproximadamente 2 mg, o menor que aproximadamente 1 mg, o menor que aproximadamente 0,5 mg, y cualquier incremento parcial o completo entre ellos.

En una realización, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica envasada que comprende un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención, por sí sola o en combinación con un segundo agente farmacéutico; e instrucciones para usar la composición para tratar, prevenir o reducir uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto.

Vías de administración

Las vías de administración de cualquiera de las composiciones de la invención incluyen la administración oral, nasal, rectal, parenteral, sublingual, transdérmica, transmucósica (por ejemplo, sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (por ejemplo, trans- y perivaginal), (intra)nasal, y (trans)rectal), intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, intratecal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intravenosa, intrabronquial, por inhalación y tópica.

Las composiciones y formas de dosificación adecuadas incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, píldoras, cápsulas de gelatina, trociscos, dispersiones, suspensiones, disoluciones, jarabes, gránulos, esferas, parches transdérmicos, geles, polvos, granza, magmas, pastillas para chupar, cremas, pastas, yesos, lociones, discos, supositorios, pulverizados líquidos para la administración nasal u oral, polvo seco o formulaciones en aerosol para la inhalación, composiciones y formulaciones para la administración intravesical y similares. Debe entenderse que las formulaciones y las composiciones que serán útiles en la presente invención no se limitan a las formulaciones y composiciones concretas que se describen en la presente.

45 Administración oral

Para la aplicación oral, son particularmente adecuados los comprimidos, grageas, líquidas, gotas, supositorios o cápsulas, comprimidos oblongos y cápsulas de gelatina. Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen, pero no se limitan a una formulación en polvo o granular, una suspensión acuosa u oleosa, una disolución acuosa u oleosa, una pasta, un gel, una pasta de dientes, un colutorio, un revestimiento, un enjuague oral, o una emulsión. Las composiciones previstas para un uso oral pueden prepararse según cualquier método conocido en la técnica, y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en excipientes farmacéuticamente inertes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes incluyen, por ejemplo, un diluyente inerte, tal como lactosa; agentes granulantes y disgregantes, tales como almidón de maíz; agentes ligantes, tales como almidón; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio.

Los comprimidos pueden estar no revestidos o pueden revestirse usando métodos conocidos para lograr la disgregación retrasada en el tracto gastrointestinal de un sujeto, proporcionando con ello una liberación y absorción sostenidas del ingrediente activo. Como ejemplo, puede usarse un material, tal como monoestearato de glicerilo o

diestearato de glicerilo, para revestir comprimidos. También como ejemplo, los comprimidos pueden revestirse usando los métodos descritos en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.256.108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar comprimidos de liberación controlada por ósmosis. Los comprimidos también pueden comprender un agente edulcorante, un agente aromatizante, un agente colorante, un conservante o cualquier combinación de estos para proporcionar una preparación de sabor agradable y farmacéuticamente atractiva.

Pueden prepararse cápsulas duras que comprenden el ingrediente activo usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Dichas cápsulas duras comprenden el ingrediente activo, y pueden comprender además otros ingredientes que incluyen, por ejemplo, un diluyente sólido inerte, tal como carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín.

Pueden prepararse cápsulas de gelatina blanda que comprenden el ingrediente activo usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Estas cápsulas blandas comprenden el ingrediente activo, que puede mezclarse con agua o un medio oleoso, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Para la administración oral, las composiciones de la invención pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes ligantes; cargas; lubricantes; disgregantes; o agentes humectantes. Si se desea, los comprimidos pueden revestirse usando métodos y materiales de revestimiento adecuados, tales como los sistemas de revestimiento de película OPADRY™ disponibles en Colorcon, West Point, Pa. (por ejemplo, OPADRY™ tipo OY, tipo OYC, tipo OY-P entérico orgánico, tipo OY-A entérico acuoso, tipo OY-PM y OPADRY™ White, 32K18400).

La preparación líquida para la administración oral puede estar en forma de disoluciones, jarabes o suspensiones. Las preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes suspensores (por ejemplo, jarabe de sorbitol, metilcelulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulgentes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos o alcohol etílico); y conservantes (por ejemplo, para-hidroxibenzoatos de metilo o propilo, o ácido sórbico). Las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la invención que son adecuadas para la administración oral pueden prepararse, envasarse y comercializarse en forma líquida o en forma de un producto seco previsto para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso.

Puede prepararse un comprimido que comprende el ingrediente activo, por ejemplo, prensando o moldeando el ingrediente activo, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Los comprimidos prensados pueden prepararse prensando, en un dispositivo adecuado, el ingrediente activo en forma fluida, tal como una preparación en polvo o granular, opcionalmente mezclado con uno o más de un ligante, un lubricante, un excipiente, un agente tensioactivo y un agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando, en un dispositivo adecuado, una mezcla del ingrediente activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos suficiente líquido para humedecer la mezcla. Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de comprimidos incluyen, pero no se limitan a diluyentes inertes, agentes granulantes y disgregantes, agentes ligantes y agentes lubricantes. Los agentes dispersantes conocidos incluyen, pero no se limitan a almidón de patata y almidón glicolato de sodio. Los agentes tensioactivos conocidos incluyen, pero no se limitan a laurilsulfato de sodio. Los diluyentes conocidos incluyen, pero no se limitan a carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, bifosfato de calcio, y fosfato de sodio. Los agentes granulantes y disgregantes conocidos incluyen, pero no se limitan a almidón de maíz y ácido alginico. Los agentes ligantes conocidos incluyen, pero no se limitan a gelatina, goma arábiga, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, e hidroxipropilmetilcelulosa. Los agentes lubricantes conocidos incluyen, pero no se limitan a estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice y talco.

Las técnicas de granulación son muy conocidas en la técnica farmacéutica para modificar polvos de partida u otros materiales en partículas de un ingrediente activo. Los polvos generalmente se mezclan con un material ligante para producir gránulos o aglomerados fluidos más grandes permanentes que se denominan una "granulación". Por ejemplo, los procesos de granulación "en húmedo" que emplean disolventes en general se caracterizan porque los polvos se combinan con un material ligante y se humedecen con agua o un disolvente orgánico bajo condiciones que provocan la formación de una masa granulada húmeda, de la cual debe evaporarse el disolvente.

La granulación en estado fundido en general consiste en el uso de materiales que son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente (es decir, que tienen un intervalo de punto de fusión o de ablandamiento relativamente bajo) para estimular la granulación de los materiales en polvo u otros materiales, fundamentalmente en ausencia de agua añadida u otros disolventes líquidos. Los sólidos de bajo punto de fusión, cuando se calientan hasta una temperatura en el intervalo del punto de fusión, se licúan para actuar como un ligante o medio de granulación. El sólido licuado se extiende sobre la superficie de los materiales en polvo con los que se pone en contacto y, tras enfriar, se forma una masa granulada sólida en la que los materiales iniciales están unidos entre sí. La granulación fundida resultante después puede trasladarse a una prensa para comprimidos o ser encapsulada para preparar la forma de dosificación oral. La granulación en estado fundido mejora la tasa de disolución y la biodisponibilidad de un agente activo (concretamente, un fármaco) formando una dispersión sólida o una disolución sólida.

La patente de EE. UU. n.º 5.169.645 describe gránulos que contienen cera directamente prensables que tienen mejores propiedades de flujo. Los gránulos se obtienen cuando las ceras se mezclan en la masa fundida con ciertos

aditivos para mejorar el flujo, seguido por el enfriamiento y la granulación de la mezcla. En ciertas realizaciones, solo la cera se funde en la combinación fundida de la cera o ceras y el aditivo o aditivos, y en otros casos, la cera o ceras y el aditivo o aditivos se funden.

- 5 La presente invención también incluye un comprimido de múltiples capas que comprende una capa que proporciona la liberación retrasada de una o más composiciones de la invención, y otra capa que proporciona la liberación inmediata de una medicación para el tratamiento de una enfermedad. Usando una mezcla de cera/polímero sensible al pH, puede obtenerse una composición insoluble gástrica en la que está atrapado el ingrediente activo, asegurando su liberación retrasada.

Administración parenteral

- 10 Tal como se emplea en la presente, la “administración parenteral” de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración que se caracteriza por una brecha física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la brecha en el tejido. Por tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a la administración de una composición farmacéutica mediante la inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la
15 composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluye, pero no se limita a la vía intraocular, intravítrea, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, mediante inyección intraesternal, intratumoral, y mediante técnicas de infusión dialítica del riñón.

- Las formulaciones de la composición farmacéutica adecuadas para la administración parenteral comprenden el ingrediente activo combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o disolución salina isotónica estéril. Estas formulaciones pueden prepararse, envasarse o comercializarse en una forma adecuada para la administración en embolada o para la administración continua. Puede prepararse, envasarse o comercializarse formulaciones inyectables en forma de dosificaciones unitarias, tales como en ampollas o recipientes de múltiples dosis que contienen un conservante. Las formulaciones para la administración parenteral incluyen, pero no se limitan a suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos oleosos u acuosos, pastas y formulaciones de liberación sostenida o biodegradables implantables. Estas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes
20 adicionales que incluyen, pero no se limitan a agentes suspensores, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una formulación para la administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en una forma seca (concretamente, en polvo o granular) para su reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua apirógena estéril) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

- 30 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma de una disolución o suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta disolución o suspensión puede formularse según la técnica conocida, y puede comprender, además del ingrediente activo, otros ingredientes, tales como los agentes dispersantes, los agentes humectantes o los agentes suspensores descritos en la presente. Estas formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butandiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a disolución de Ringer, disolución de cloruro de sodio isotónica y aceites no volátiles, tales como mono- o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones parenteralmente administrables que son útiles incluyen las formulaciones que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, en una preparación liposómica o como un componente de un sistema de polímeros biodegradables. Las composiciones para la liberación sostenida o la implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables, tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero muy poco soluble o una sal muy poco soluble.

Administración tópica

- Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o comercializarse en una formulación adecuada para la administración tópica. Existen varias ventajas en administrar composiciones, incluyendo fármacos u otros agentes terapéuticos, a la piel (administración dérmica de fármaco) o al interior del cuerpo a través de la piel (administración transdérmica de fármacos). La administración de una composición transdérmica ofrece una alternativa atractiva a las inyecciones y las medicaciones orales. La administración de una composición dérmica ofrece una manera eficaz de administrar una composición a la piel de un mamífero, y preferiblemente de un ser humano, sin que sea necesario romper o dañar la capa externa de la piel. En la presente invención, la
45 administración dérmica, en forma de una composición de acción dérmica de la invención, proporciona estas ventajas para el tratamiento de un trastorno, una afección o una enfermedad relacionada con la piel.

- Una serie de compuestos, incluyendo algunos fármacos, pueden penetrar por la piel de una manera eficaz y sencilla porque las moléculas son relativamente pequeñas y son potentes a unas dosis pequeñas de 0,1 mg a 15 mg/día (Kanikkannan *et al.*, 2000, *Curr. Med. Chem.*, 7:593-608). Muchos otros compuestos y fármacos pueden administrarse solo cuando se proporciona un sistema de potenciación adicional para “obligarlos” a atravesar la piel. Entre los métodos de transporte transdérmico de fármacos se encuentran la electroporación, la sonoforesis, la iontoforesis, los potenciadores de la permeación (ciclodextrinas), y los liposomas. Aunque los métodos mencionados anteriormente también se incluyen en la presente invención para la administración dérmica de las composiciones de la invención, los liposomas representan un método de administración dérmica preferido.

La composición de la invención puede consistir en el ingrediente activo por sí solo, en una forma adecuada para la administración a un sujeto, o la composición puede comprender al menos un ingrediente activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, uno o más ingredientes adicionales, o una de sus combinaciones. El ingrediente activo puede estar presente en la composición en forma de un éster o sal fisiológicamente aceptable, tal como en combinación con un catión o anión fisiológicamente aceptable, tal como se conoce en la técnica. También se entenderá que las composiciones de la invención incluyen composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de otros trastornos, afecciones y enfermedades asociadas con la piel.

En un aspecto, un vehículo de transporte dérmico de la invención es una composición que comprende al menos un primer compuesto que puede facilitar el transporte dérmico de al menos un segundo compuesto asociado o en proximidad física cercana con la composición que comprende el primer compuesto. Tal como entenderán los expertos en la técnica cuando lean la descripción indicada en la presente, dichos vehículos de transporte incluyen, pero no se limitan a liposomas, nanosomas, composiciones no liposómicas basadas en fosfolípidos (por ejemplo, cocleatos seleccionados), entre otros.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero no se limitan a preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, tales como cremas, ungüentos o pastas, y disoluciones o suspensiones. Las formulaciones que pueden administrarse por vía tópica pueden comprender, por ejemplo, de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 90% (en p/p) del ingrediente activo, aunque la concentración del ingrediente activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del ingrediente activo en el disolvente. Las formulaciones para la administración tópica pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente.

En un aspecto de la invención, un sistema de administración dérmica incluye un sistema de administración de liposomas, y no debe considerarse que la presente invención se limite a ningún sistema de administración de liposomas concreto. Basándose en la descripción indicada en la presente, los expertos en la técnica comprenderán el modo de identificar un sistema de administración de liposomas como útil en la presente invención.

La presente invención también incluye la mejora de la administración dérmica y transdérmica de un fármaco mediante el uso de potenciadores de la penetración (también denominados promotores de la absorción o acelerantes), que penetran en la piel para disminuir, de modo reversible, la resistencia de barrera. En la técnica se conocen muchos compuestos con actividad potenciadora de la penetración, que incluyen sulfóxidos (tales como dimetilsulfóxido, DMSO), azonas (por ejemplo laurocapramo), pirrolidonas (por ejemplo, 2-pirrolidona, 2P), alcoholes y alcanoles (etanol, o decanol), glicoles (por ejemplo, propilenglicol, PG, un excipiente habitual en formas de dosificación de aplicación tópica), tensioactivos (también son habituales en las formas de dosificación) y terpenos. Otros potenciadores incluyen ácido oleico, alcohol oleílico, etoxidiglicol, laurocapramo, ácidos alcanocarboxílicos, dimetilsulfóxido, lípidos polares, o N-metil-2-pirrolidona.

En realizaciones alternativas, la composición cosmética o farmacéutica tópicamente activa puede combinarse opcionalmente con otros ingredientes, tales como hidratantes, adyuvantes cosméticos, antioxidantes, agentes quelantes, tensioactivos, agentes formadores de espuma, acondicionadores, humectantes, agentes humectantes, agentes emulgentes, fragancias, viscosificantes, agentes tamponantes, conservantes, pantallas solares y similares. En otra realización, se incluye un potenciador de la permeación o de la penetración en la composición, que es eficaz para mejorar la penetración percutánea del ingrediente activo en el estrato córneo y a través de él, con respecto a una composición que carece del potenciador de la permeación. Los expertos en la técnica conocen diversos potenciadores de la permeación, que incluye ácido oleico, alcohol oleílico, etoxidiglicol, laurocapramo, ácidos alcanocarboxílicos, dimetilsulfóxido, lípidos polares, o N-metil-2-pirrolidona.

En otro aspecto, la composición puede comprender también un agente hidrotópico, que actúa para aumentar el desorden en la estructura del estrato córneo y, por tanto, permite un mayor transporte a través del estrato córneo. Los expertos en la técnica conocen diversos agentes hidrotópicos, tales como alcohol isopropílico, propilenglicol, o xilensulfonato de sodio. Las composiciones de esta invención también pueden contener cantidades activas de retinoides (es decir, compuestos que se unen a cualquier miembro de la familia de los receptores de retinoides), que incluyen, por ejemplo, tretinoína, retinol, ésteres de tretinoína y/o retinol y similares.

La composición de la invención puede comprender un conservante desde aproximadamente 0,005% al 2,0% en peso total de la composición. El conservante se usa para evitar la descomposición en el caso de un gel acuoso debida al uso repetido por parte del paciente cuando se expone a los contaminantes en el entorno como consecuencia, por ejemplo, la exposición al aire o a la piel del paciente, incluyendo el contacto con los dedos usados para aplicar una composición de la invención, tal como una crema o gel terapéutico. Los ejemplos de conservantes útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a los seleccionados del grupo que consiste en alcohol bencílico, ácido sórbico, parabenos, imidurea y sus combinaciones. Un conservante particularmente preferido es una combinación de aproximadamente 0,5% al 2,0% de alcohol bencílico y del 0,05% al 0,5% de ácido sórbico.

La composición preferiblemente incluye un antioxidante y un agente quelante que inhibe la degradación de la composición para su uso en la invención en la formulación en gel acuoso. Los antioxidantes preferidos para algunos compuestos son BHT, BHA, alfa-tocoferol y ácido ascórbico en el intervalo preferido de aproximadamente 0,01% al

5%, y BHT en el intervalo del 0,01% al 1% en peso por peso total de la composición. Preferiblemente, el agente quelante está presente en una cantidad del 0,01% al 0,5% en peso por peso total de la composición. Los agentes quelantes particularmente preferidos incluyen sales edetato (por ejemplo, edetato de disodio) y ácido cítrico en el intervalo de peso de aproximadamente 0,01% al 0,20%, y más preferiblemente en el intervalo del 0,02% al 0,10% en peso por peso total de la composición. El agente quelante es útil para quelar iones metálicos en la composición que pueden ser perjudiciales para la caducidad de la formulación. Aunque BHT y edetato de disodio son el antioxidante y el agente quelante particularmente preferidos, respectivamente, para algunos compuestos, pueden sustituirse por otros antioxidantes y agentes quelantes adecuados y equivalentes, tal como saben los expertos en la técnica.

Otros componentes pueden incluir, pero no se limitan a los componentes que incluyen agua, aceites (por ejemplo, aceite de olivo/PEG7), aceite de biovera, cera (por ejemplo, cera de jojoba), escualeno, miristato (por ejemplo, miristato de isopropilo), triglicéridos (por ejemplo, triglicérido caprílico), Solulan 98, manteca de cacao, manteca de rhea, alcohol (por ejemplo, alcohol behenílico), estearato (por ejemplo monoestearato de glicerilo), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), propilenglicol, SEPIGEL (Seppic, Inc., Fairfield, N.J.), silicona y derivados de silicona (por ejemplo, dimeticona, ciclometicona), vitaminas (por ejemplo, vitamina E), entre otros.

15 Administración bucal

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o comercializarse en una formulación adecuada para la administración bucal. Estas formulaciones pueden estar en forma, por ejemplo, de comprimidos o comprimidos para chupar preparados usando métodos convencionales, y pueden incluir, por ejemplo del 0,1 al 20% (en p/p) del ingrediente activo, comprendiendo el resto una composición oralmente disoluble o degradable y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente. Como alternativa, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo o una disolución o suspensión en aerosol o atomizada que comprende el ingrediente activo. Estas formulaciones en polvo o en aerosol, cuando se dispersan, preferiblemente tendrán un tamaño promedio de partícula o de gota en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros, y pueden comprender también uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente.

Administración rectal

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o comercializarse en una formulación adecuada para la administración rectal. Esta composición puede estar en forma, por ejemplo, de un supositorio, una preparación de enema de retención y una disolución para la irrigación rectal o colónica.

30 Pueden prepararse formulaciones en supositorios combinando el ingrediente activo con un excipiente farmacéuticamente aceptable no irritante que es sólido a temperatura ambiente normal (es decir, aproximadamente 20 °C) y que es líquido a la temperatura rectal del sujeto (es decir, aproximadamente 37 °C en un ser humano sano). Estos excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a manteca de cacao, polietilenglicoles, y diversos glicéridos. Las formulaciones en supositorios pueden comprender además diversos ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a antioxidantes y conservantes.

Pueden prepararse preparaciones de enemas de retención o disoluciones para la irrigación rectal o colónica combinando el ingrediente activo con un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable. Tal como se conoce en la técnica, las preparaciones de enemas pueden administrarse usando un dispositivo de administración adaptado para la anatomía rectal del sujeto y pueden envasarse dentro de este. Las preparaciones de enema pueden comprender además diversos ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a antioxidantes y conservantes.

Otras formas de administración

Otras formas de dosificación de esta invención incluyen las formas de dosificación descritas en las patentes de EE. UU. n.ºs 6.340.475; 6.488.962; 6.451.808; 5.972.389; 5.582.837 y 5.007.790. Otras formas de dosificación de esta invención también incluyen las formas de dosificación descritas en las solicitudes de patente n.ºs 20030147952, 20030104062, 20030104053, 20030044466, 20030039688, y 20020051820. Otras formas de dosificación de esta invención también incluyen las formas de dosificación descritas en las solicitudes PCR n.ºs WO 03/35041, WO 03/35040, WO 03/35029, WO 03/35177, WO 03/35039, WO 02/96404, WO 02/32416, WO 01/97783, WO 01/56544, WO 01/32217, WO 98/55107, WO 98/11879, WO 97/47285, WO 93/18755, y WO 90/11757.

Sistemas de administración de fármacos y formulaciones de liberación controlada

50 Pueden prepararse formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la invención usando la tecnología convencional, empleando, por ejemplo, proteínas equipadas con dominios sensibles al pH o fragmentos escindibles por proteasas. En algunos casos, las formas de dosificación usadas pueden proporcionarse como una liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos en su interior usando, por ejemplo, hidropropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, revestimientos de múltiples capas, micropartículas, liposomas o microesferas, o una de sus combinaciones, para proporcionar el perfil de liberación deseado en diversas proporciones. Pueden seleccionarse con facilidad formulaciones de liberación controlada adecuadas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo las descritas

en la presente, para su uso con las composiciones farmacéuticas de la invención. Así, la presente invención incluye formas de dosificación unitarias individuales adecuadas para la administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina, y comprimidos oblongos, que están adaptadas para la liberación controlada.

5 La mayoría de los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen el objetivo común de mejorar la terapia de fármaco frente a lo que pueden lograr sus homólogos no controlados. De modo ideal, el uso de una preparación de liberación controlada con un diseño óptimo en el tratamiento médico se caracteriza porque emplea un mínimo de sustancia fármaco para curar o controlar el trastorno en una cantidad de tiempo mínima. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen una actividad extendida del fármaco, una frecuencia reducida de la dosificación y un mayor cumplimiento por parte del sujeto. Además, las formulaciones de liberación controlada
10 pueden usarse para afectar al tiempo de aparición de la acción u otras características, tales como nivel en sangre del fármaco, y, por tanto, pueden afectar a la aparición de efectos secundarios.

La mayoría de las formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de fármaco que rápidamente produce el efecto terapéutico deseado, y para liberar de modo gradual y continuo otras cantidades del fármaco para mantener este nivel de efecto terapéutico a lo largo de un periodo extendido de tiempo.
15 Para mantener este nivel constante del fármaco en el cuerpo, el fármaco debe liberarse desde la forma de dosificación a una tasa que reemplace la cantidad de fármaco que se ha metabolizado y excretado del cuerpo.

La liberación controlada de un ingrediente activo puede estimularse por medio de diversos inductores, por ejemplo, pH, temperatura, enzimas, agua u otras condiciones fisiológicas o compuestos. La expresión "componente de liberación controlada", en el contexto de la presente invención, se define en la presente como un compuesto o
20 compuestos que incluyen, pero no se limitan a polímeros, matrices poliméricas, geles, membranas permeables, liposomas, nanopartículas o microesferas, o una de sus combinaciones, que facilitan la liberación controlada del ingrediente activo.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de la presente invención pueden ser, pero no se limitan a formulaciones de liberación a corto plazo, de inicio rápido, así como de liberación controlada, por ejemplo, de liberación sostenida,
25 de liberación retrasada y de liberación pulsátil.

La expresión liberación sostenida se emplea en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco a lo largo de un periodo largo de tiempo y que puede lograr, aunque no necesariamente, unos niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco a lo largo de un periodo largo de tiempo. El periodo de tiempo puede ser tan largo como un mes o más, y deberá ser una liberación que tarde más que la misma cantidad de agente administrada en forma de embolada.
30

Para la liberación sostenida, las composiciones pueden formularse con un polímero o material hidrófobo adecuado que proporciona las propiedades de liberación sostenida a las composiciones. Así, las composiciones para su uso en el método de la invención pueden administrarse en forma de micropartículas, por ejemplo, mediante inyección o en forma de obleas o discos para la implantación.

35 En una realización preferida de la invención, las composiciones de la invención se administran a un sujeto, por sí solas o en combinación con otro agente farmacéutico, usando una formulación de liberación sostenida.

La expresión liberación retrasada se emplea en la presente en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona una liberación inicial del fármaco después de cierto retraso tras de la administración del fármaco y que puede incluir, aunque no necesariamente, un retraso de aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 12 horas.
40

La expresión liberación pulsátil se emplea en la presente en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco de tal modo que se producen unos perfiles del fármaco en plasma pulsados después de la administración del fármaco.

45 La expresión liberación inmediata se emplea en la presente en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco inmediatamente después de la administración del fármaco.

Tal como se emplea en la presente, a corto plazo se refiere a cualquier periodo de tiempo hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora,
50 aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 10 minutos y cualquier o todos los incrementos enteros y parciales entre ellos después de la administración del fármaco.

Tal como se emplea en la presente, un inicio rápido se refiere a cualquier periodo de tiempo hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora,
55 aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 10 minutos y cualquier o todos los incrementos enteros y parciales entre ellos después de la administración del fármaco.

En la presente se describe también una formulación química que comprende ácido propanoico, ácido isobutírico, al menos un éster y al menos un vehículo, en la que la formulación química tiene actividad antibacteriana cuando se aplica a residuos humanos o animales. En la presente se describe también una formulación en la que dicho al menos un éster es butirato de isoamilo. En otra realización, dicho al menos un vehículo es un vehículo con una base de sílice. En otra realización, dicho al menos un vehículo se selecciona del grupo que consiste en bentonita, zeolita y perlita. En la presente se describe también una formulación en la que la proporción de ácido propanoico:ácido isobutírico:butirato de isoamilo es de 3,5:3,5:2 en v/v/v. En la presente se describe también una formulación en la que la proporción de ácido propanoico, ácido isobutírico y butirato de isoamilo es de aproximadamente 7 partes de los dos ácidos y 2 partes de butirato de isoamilo. En la presente se describe también una formulación química que consiste fundamentalmente en ácido propanoico, ácido isobutírico, butirato de isoamilo y un vehículo. En otra realización, el vehículo se selecciona del grupo que consiste en bentonita, zeolita y perlita. En otra realización, la formulación química tiene actividad antibacteriana cuando se aplica a residuos humanos o animales.

En la presente se describe también una formulación química que comprende ácido propanoico, ácido isobutírico, al menos un éster, al menos un vehículo, y al menos un hongo. En la presente también se indica que dicho al menos un éster es butirato de isoamilo. En la presente también se indica que dicho al menos un vehículo es un vehículo con una base de sílice. En otra realización, dicho al menos un vehículo se selecciona del grupo que consiste en bentonita, zeolita y perlita. En la presente también se indica que la proporción de ácido propanoico:ácido isobutírico:butirato de isoamilo es de 3,5:3,5:2 en v/v/v. En la presente también se indica que la proporción de ácido propanoico, ácido isobutírico y butirato de isoamilo es de aproximadamente 7 partes de los dos ácidos y 2 partes de butirato de isoamilo. En otra realización, dicho al menos un hongo es un endofito. En otra realización, el endofito pertenece al género *Fusarium*. En otra realización, el endofito es *F. subglutinans*.

En la presente se describe también una formulación química que comprende ácido propanoico y al menos un componente de éster (ácido) de 6-12 carbonos, en la que la formulación química presenta una proporción de ácido propanoico:componente de éster de 7:2 en v/v. En otra realización de la presente invención, dicho al menos un éster son hexanoatos de isoamilo. En otra realización, la formulación incluye además al menos un suplemento nutricional y al menos una sal. En otra realización, la formulación comprende glucosa, proteína del suero, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de sodio. En otra realización, la formulación comprende glucosa, glicina, cloruro de potasio, cloruro de sodio y acetato de magnesio. En otra realización, la formulación comprende glucosa, glicina, cloruro de potasio, cloruro de sodio, acetato de magnesio y fosfato de monopotasio. En otra realización, la formulación incluye al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el vehículo es cremophor. En otra realización, la formulación consiste fundamentalmente en ácido propanoico y hexanoatos de isoamilo en una proporción de ácido propanoico:hexanoatos de isoamilo de 7:2 en v/v. En otra realización, la presente invención se refiere a una formulación química que consiste fundamentalmente en ácido propanoico, hexanoatos de isoamilo y un vehículo.

En la presente se describe también una formulación química que comprende ácido propanoico y un componente de éster (ácido) de un carbono, en la que la formulación química presenta una proporción de ácido propanoico:componente de éster de 7:2 en v/v. En la presente también se indica que dicho al menos un éster es formiato de isoamilo. En la presente también se describe una formulación que consiste fundamentalmente en ácido propanoico y formiato de isoamilo en una proporción de ácido propanoico:formiato de isoamilo de 7:2 en v/v. En otra realización, la formulación incluye al menos un vehículo. En otra realización, dicho al menos un vehículo es un vehículo con una base de sílice. En otra realización, dicho al menos un vehículo se selecciona del grupo que consiste en bentonita, zeolita y perlita. En la presente se describe también una formulación química que consiste fundamentalmente en ácido propanoico, formiato de isoamilo y un vehículo.

En la presente se describe también una formulación química que comprende ácido propanoico, formiato de isoamilo y al menos un hongo. En otra realización, la proporción de ácido propanoico:formiato de isoamilo es de 7:2 en v/v. En otra realización, dicho al menos un hongo es un endofito. En otra realización, el endofito pertenece al género *Fusarium*. En otra realización, el endofito es *F. subglutinans*.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para tratar residuos humanos o animales, que comprende poner en contacto residuos humanos o animales con una composición que comprende ácido propanoico, ácido isobutírico y al menos un éster, que son hexanoatos de isoamilo, en el que la composición mata o reduce el crecimiento de bacterias en los residuos humanos o animales. En otra realización, la presente invención se refiere a un método para tratar residuos humanos o animales, que comprende poner en contacto residuos humanos o animales con una composición que comprende ácido propanoico, ácido isobutírico, al menos un éster, que son hexanoatos de isoamilo, y al menos un hongo, en el que el ácido propanoico, el ácido isobutírico y al menos un éster matan o reducen el crecimiento de bacterias en los residuos humanos o animales, y dicho al menos un hongo aumenta la velocidad de descomposición de los residuos humanos o animales. En otra realización, la presente invención se refiere a un método para eliminar o reducir el crecimiento microbiano en un sitio de tratamiento, que comprende poner en contacto el sitio de tratamiento con una composición que comprende ácido propanoico y al menos un éster, a una proporción de ácido propanoico:éster de 7:2, en el que el éster son hexanoatos de isoamilo, y la composición mata o reduce el crecimiento de bacterias en los residuos humanos o animales. En la presente se describe también un método para tratar residuos humanos o animales, que comprende poner en contacto residuos

humanos o animales con una composición que comprende ácido propanoico, formiato de isoamilo a una proporción de ácido propanoico:formiato de isoamilo de 7:2, y al menos un hongo, en el que el ácido propanoico y el formiato de isoamilo matan o reducen el crecimiento microbiano en los residuos humanos o animales, y dicho al menos un hongo aumenta la velocidad de descomposición de los residuos humanos o animales. En la presente se describe también un método para tratar un animal que padece una enfermedad o un trastorno asociado con una infección microbiana, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un ácido orgánico. En la presente se describe también una composición que consiste fundamentalmente en un ácido orgánico. En la presente se describe también una composición que consiste en un ácido orgánico. En la presente también se indica que dicho al menos un ácido orgánico es ácido propanoico. En la presente también se indica que dicho al menos un ácido orgánico puede ser ácido isobutírico. En otra realización, el animal es un ser humano. En otra realización, la enfermedad o el trastorno es una enfermedad diarreica. En otra realización, el animal es bovino, porcino u ovino. En otra realización, la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad diarreica y una infección intramamaria. En otra realización, la enfermedad diarreica es la diarrea neonatal. En otra realización, la infección intramamaria es la mastitis subclínica o la mastitis clínica. En otra realización, la composición comprende además al menos un éster. Dicho al menos un éster son hexanoatos de isoamilo. En otra realización, la composición comprende además al menos un suplemento nutricional y al menos una sal. En otra realización, la composición comprende glucosa, proteína del suero, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de sodio. En otra realización, la composición comprende glucosa, glicina, cloruro de potasio, cloruro de sodio y acetato de magnesio. En otra realización, la composición comprende glucosa, glicina, cloruro de potasio, cloruro de sodio, acetato de magnesio y fosfato de monopotasio. En otra realización, la composición comprende además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el vehículo es cremophor. En otra realización, la composición comprende ácido propanoico y hexanoatos de isoamilo en una proporción de ácido propanoico:hexanoatos de isoamilo de 7:2 en v/v. En otra realización, dicho al menos un éster son hexanoatos de isoamilo. En otra realización, la proporción de ácido propanoico:ácido isobutírico:hexanoatos de isoamilo es de 3,5:3,5:2 en v/v/v. En otra realización, la proporción de ácido propanoico, ácido isobutírico y hexanoatos de isoamilo es de aproximadamente 7 partes de los dos ácidos y 2 partes de butirato de isoamilo.

En otra realización, la presente invención se refiere a una formulación química que consiste fundamentalmente en ácido propanoico, ácido isobutírico, hexanoatos de isoamilo y un vehículo. En otra realización, el vehículo se selecciona del grupo que consiste en bentonita, zeolita y perlita. En otra realización, la formulación química tiene actividad antibacteriana cuando se aplica a residuos humanos o animales.

Ejemplos experimentales

Ejemplo 1 (no según la invención)

A continuación se analizan los diversos experimentos que produjeron el descubrimiento de *F. subglutinans* y los sistemas 1 y 2 que pueden usarse en diversos dispositivos de tratamiento de residuos humanos y animales, junto con lechos higiénicos para animales, establos, etc.

Tabla 1. Muestra las actividades de inhibición de diversos ésteres (usados en combinación con una mezcla 1:1 en v/v de ácido propanoico y ácido isobutírico y, así, la proporción de los dos ácidos a los ésteres es de 7:2 en v/v) contra una serie de hongos y bacterias de ensayo que son los organismos usados habitualmente para seleccionar actividades antibióticas. A partir de estos datos se seleccionaron los sistemas 1 y 2 para su uso en esta invención (véanse las áreas destacadas en la tabla).

Tabla 2. Datos genéticos moleculares agrupados en los diversos aislados nuevos de *Fusarium* spp. que crecen en residuos humanos en presencia de la mezcla del sistema 2 (con un vehículo de bentonita o zeolita) según se describió anteriormente. A partir de esto, es obvio que cualquiera de estos organismos es casi igual o, en la mayoría de los casos, mejor que *Fusarium culmorum* (P2-24), el sujeto de una patente anterior. También se incluye un conjunto de datos sobre P2-24.

Tabla 3. El crecimiento de diversos *Fusarium* en residuos humanos provoca una reducción del peso seco de la masa durante el desarrollo de un experimento de 7 semanas. El montaje experimental contenía 0,5 g de bentonita con el sistema 2 sobre una placa de agua-agar que contiene aproximadamente 100 mg de peso húmedo de residuos humanos y un pequeño taco de agar con el *Fusarium* de ensayo. El periodo de incubación fue de 7 semanas a 22 °C. Los restos de los residuos humanos se retiraron físicamente y se secaron durante 4 h a 80 °C y después se pesaron.

Figura 1. Indica cómo se realizaron los ensayos para producir los conjuntos de datos en la tabla 1. Los diversos ésteres se combinaron con una mezcla 1:1 de ácido propanoico y ácido isobutírico, y estos se añadieron 7:2 en v/v con el éster que se va a ensayar. Después se colocaron 9 µl en el pocillo del centro con los tacos de agar del organismo de ensayo individual en la periferia, tal como se indica en la figura

Figura 2. Demuestra la eficacia del sistema 1 (arriba) para matar e inhibir bacterias asociadas a residuos humanos. Se recogieron residuos frescos y después se extendieron aproximadamente 5 mg de manera uniforme sobre la superficie de una placa de agar de dextrosa y patata. Las placas se incubaron durante 2 días y después se

fotografiaron. El panel a la derecha es un control sin tratar, el intermedio contiene bentonita a 0,5 g sin antibiótico, y el izquierdo contiene 0,5 g con el sistema 1.

Figura 3. Demuestra la eficacia del sistema 2 (arriba) para matar e inhibir bacterias asociadas a residuos humanos. Se recogieron residuos frescos y después se extendieron aproximadamente 5 mg de manera uniforme sobre la superficie de una placa de agar de dextrosa y patata. Las placas se incubaron durante 2 días y después se fotografiaron. El panel a la derecha es un control sin tratar, el intermedio contiene bentonita a 0,5 g sin antibiótico, y el izquierdo contiene 0,5 g con el sistema 2.

Figura 4. Una ilustración de cómo un tratamiento con el sistema 1 puede eliminar olores. Se usan dos cajas de arena higiénica para gatos con materia fecal de gato, cada una procedente de 5 gatos diferentes, aproximadamente 140 g. La caja a la izquierda ha sido tratada con el sistema 1 sobre bentonita con 0,5 ml/100 g de bentonita. Después de 5 días, las lecturas de amoníaco fueron de 14 ppm en el control (izquierda) y de 0 ppm en la caja a la derecha tratada. El olor global se redujo significativamente en la caja tratada.

Figura 5. Ilustra cómo el hongo puede crecer sobre residuos humanos frescos y reduce el nivel de olor. Tratamiento de aproximadamente 140 g de residuos humanos en presencia de orina con *Fusarium subglutinans* 06-1 en presencia del sistema 2 (1 ml sobre 10 g de zeolita). Después de 3 semanas se había producido un crecimiento sustancial del *F. subglutinans* (micelio blanco en el recipiente a la derecha). El nivel de amoníaco fue de 71,4 en el control a la izquierda, y de 12,1 en el recipiente tratado a la derecha.

Figura 6. Se muestra el crecimiento de los diversos aislados nuevos de *Fusarium* spp. comparado con el crecimiento de *F. culmorum* (P-2-24) en residuos humanos. Se muestra el crecimiento progresivo de *Fusarium* spp sobre pequeñas porciones de residuos humanos, aproximadamente 100 mg (peso fresco), a lo largo de muchos días. Se compara el crecimiento de los *Fusarium* spp. recién aislados y caracterizados con P2-24, que es *Fusarium culmorum*, el objeto de una patente previa sobre este tema. Los nuevos *Fusarium* spp., en especial E06-1 y E06-5, crecen con más rapidez sobre los residuos. El crecimiento se midió a partir de la extensión de micelio que se extiende desde el taco de agar colocado en la pequeña porción de residuo.

Figura 7. Arriba - Se usó un cultivo de seis días de *Fusarium subglutinans* E06-1, el hongo preferido para ser usado en el tratamiento de residuos humanos y animales en combinación con el sistema 2. Abajo - Vista con microscopio óptico de las esporas y las hifas de *F. subglutinans*. Las esporas son ligeramente curvas y tienen un tamaño de 9,8-12 × 2,5 μ.

Figura 8. *Fusarium subglutinans* (E06-8) crece profusamente sobre residuos humanos en presencia del sistema 2. Nótese la inhibición del crecimiento bacteriano en la parte derecha de la placa de cultivo, influido por los vapores del sistema 2 que emanan de las partículas de bentonita en la parte izquierda de la placa que permiten el crecimiento fúngico. Se añadieron 0,5 g de bentonita tratada, aproximadamente 100 mg de residuos humanos y la placa se incubó durante 12 días. Véase la figura 6 para mediciones de crecimiento comparativas.

Método 1 - Procedimiento experimental para aislar endofitos de *Fusarium* spp

Pueden recogerse aislados de *Fusarium* spp. según los protocolos convencionales que entienden los expertos en la técnica. Brevemente, se empaparon a fondo trozos de ramitas en una disolución de etanol acuosa al 70% para la desinfección de la superficie, y después se retiró la corteza externa/epidermis con un escalpelo estéril. Se trasladaron trozos pequeños de la corteza interna de modo aséptico a la superficie de agua-agar ("water-agar", WA) y medio de glicerol-arginina ("glycerol-arginine medium", GAM). Después de una incubación durante varios días a 25 °C, las puntas de las hifas de los hongos en desarrollo se retiraron de modo aséptico y se colocaron en agar de dextrosa y patata ("potato dextrose agar", PDA). Los cultivos fúngicos puros se adquirieron de esta manera. En particular, es probable que los aislados que tienen una coloración de rosa a rojiza y que poseen esporas con forma de hoz sean *Fusarium* spp endofíticos. Puede realizarse una caracterización más a fondo mediante técnicas moleculares, tal como entienden los expertos en la técnica. Este procedimiento se usó para descubrir cada uno de los organismos usados y descritos en la presente.

En la tabla 1 se muestran los efectos de inhibición y destrucción del ácido propanoico y el ácido isobutírico, juntos y por separado, y con diversos ésteres. Los ensayos se realizaron a lo largo de 30 h a 22 °C. Las mediciones se realizaron con controles apropiados y, por tanto, pueden realizarse los cálculos de porcentaje de inhibición de los tratamientos frente al crecimiento sobre un organismo control (no tratado). Se evaluaron las bacterias y los organismos similares a levaduras basándose en las tasas de crecimiento relativas después de 30 h. Las áreas destacadas en la tabla muestran los compuestos (ésteres) que tienen la compatibilidad máxima con las mezclas de ácido propanoico y ácido isobutírico 1:1 en v/v con los ésteres apropiados a una proporción de 7:2 - Sistemas 1 y 2 anteriores. A partir de este ensayo se descubrieron los sistemas 1 y 2. Los ácidos se añadieron a 7 μl de modo individual, y la combinación de los ésteres con los ácidos se añadió al nivel de 9 μl en el ensayo de placa.

55

Tabla 1

Compuesto ensayado	Organismo de ensayo				
	<i>Cercospora beticola</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Pythium ultimum</i>
Control	0%	0%	0%	0%	0%
Ácido isobutírico + ácido propanoico	95%	87%	70%	20%	89%
Ácido isobutírico	95%	100%	90%	40%	100%
Ácido propanoico	95%	67%	96%	60%	91%
Isobutirato de etilo	95%	100%	80%	90%	100%
Isobutirato de isopropilo	95%	-33%	96%	30%	100%
Isobutirato de isobutilo	95%	0%	92%	75%	100%
Isobutirato de butilo	95%	0%	60%	0%	100%
Butirato de isobutilo	100%	33%	96%	70%	100%
Butirato de isoamilo	100%	100%	100%	95%	100%
Isobutirato de isoamilo	95%	97%	96%	80%	100%
Propionato de isobutilo	100%	33%	88%	80%	100%
Acetato de isobutilo	95%	67%	60%	20%	100%
Isobutirato de propilo	95%	87%	88%	40%	98%
Isovalerato de isobutilo	95%	100%	96%	0%	100%

	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Trichoderma viridae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Control	0%	0%	0%	0%
Ácido isobutírico + ácido propanoico	-3%	20%	86%	0%
Ácido isobutírico	67%	27%	86%	90%
Ácido propanoico	83%	53%	100%	80%
Isobutirato de etilo	67%	67%	100%	80%
Isobutirato de isopropilo	33%	20%	43%	0%
Isobutirato de isobutilo	50%	47%	86%	80%
Isobutirato de butilo	0%	40%	97%	0%
Butirato de isobutilo	33%	47%	100%	0%
Butirato de isoamilo	100%	90%	100%	90%
Isobutirato de isoamilo	67%	67%	100%	80%
Propionato de isobutilo	67%	40%	100%	80%
Acetato de isobutilo	67%	20%	57%	0%

Isobutirato de propilo	50%	33%	97%	50%
Isovalerato de isobutilo	67%	20%	94%	0%

	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Control	Crecimiento observado	Crecimiento observado	Crecimiento observado	Crecimiento observado
Ácido isobutírico + ácido propanoico	Crecimiento observado	Inhibido	Inhibido	Inhibido
Ácido isobutírico	Crecimiento observado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Ácido propanoico	Crecimiento observado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Isobutirato de etilo	Crecimiento observado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Isobutirato de isopropilo	Crecimiento observado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Isobutirato de isobutilo	Crecimiento observado	Inhibido	Inhibido	Crecimiento observado
Isobutirato de butilo	Crecimiento observado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Butirato de isobutilo	Crecimiento observado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Butirato de isoamilo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Isobutirato de isoamilo	Crecimiento observado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Propionato de isobutilo	Crecimiento observado	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento observado
Acetato de isobutilo	Crecimiento observado	Inhibido	Inhibido	Crecimiento observado
Isobutirato de propilo	Crecimiento observado	Inhibido	Inhibido	Crecimiento observado
Isovalerato de isobutilo	Crecimiento observado	Inhibido	Inhibido	Crecimiento observado

Nota: cuando aparece sin crecimiento o 100% de inhibición, los organismos estaban muertos y no fue posible revivirlos.

5 En la tabla 2 se muestra una descripción de los datos genéticos moleculares (a continuación) obtenidos con los nuevos aislados de *Fusarium* que se ensayaron para su capacidad para degradar residuos humanos. Cada uno de los aislados se indica en el encabezado. Los detalles de la adquisición de los datos se proporcionan al final de la tabla.

Tabla 2

E 06-05, *Fusarium subglutinans*

10 Secuencia (480 bases):

AACATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTAACGCGGACGGCC
 CGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAAT
 AAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCA
 AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
 ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCT
 CAAGCCCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCCCAAATTGATTGG
 CGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCG
 CGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC
 CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA (SEQ ID NO: 1)

Correspondencia de NCBI BLAST:

Descripción	Puntuación máx.	Puntuación total	Cobertura de ensayo	Valor de E	Ident. máx.	n.º de registro
<i>Fusarium verticillioides</i> referencia UOA/HCPF 14862, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	KC709665.1
Especie fúngica AM2013 cepa 186_Jm, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	KC506334.1
<i>Fusarium subglutinans</i> cepa H1, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JX960431.1
<i>Fusarium sacchari</i> , espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JN997445.1
<i>Fusarium</i> sp. PRE4b, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb KC254039.1 colección de cultivos de <i>Gibberella intermedia</i> UOA/HCPF<GRC>: 12610, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN	887	887	100%	0,0	100%	JN254793.1

ribosómico 28S, secuencia parcial						
<i>Gibberella moniliformis</i> aislado FM2, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JF499676.1
<i>Gibberella moniliformis</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, cepa: MAFF 240085	887	887	100%	0,0	100%	AB587012.1
<i>Gibberella moniliformis</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, cepa: CBS 576.78	887	887	100%	0,0	100%	AB587010.1
<i>Fusarium subglutinans</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, cepa: ATCC 38016	887	887	100%	0,0	100%	AB587008.1
<i>Gibberella moniliformis</i> cepa Gm3, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	HQ718417.1

E 06-08, *Fusarium subglutinans*

Secuencia (478 bases):

CATACCAATTGTTGCCTCGGC GGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCCG
 CCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTA ACTTCTGAGTAAAACCATAAATAA
 ATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAA
 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
 ATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCA
 AGCCCAGCTTGGTGTTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTC CCAAATTGATTGGCG
 GTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCG
 GCCACGCCGTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC
 GCTGAACTTAAGCATATCAATAA (SEQ ID NO: 2)

5 Correspondencia de NCBI BLAST:

Descripción	Puntuación máx.	Puntuación total	Cobertura de ensayo	Valor de E	Ident. máx.	n.º de registro
<i>Fusarium verticillioides</i> referencia UOA/HCPF 14862, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico	883	883	100%	0,0	100%	KC709665.1

28S, secuencia parcial						
Especie fúngica AM2013 cepa 186_Jm, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	883	883	100%	0,0	100%	KC506334.1
Especie fúngica AM2013 cepa 165_Gbp, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	883	883	100%	0,0	100%	KC506316.1
<i>Fusarium subglutinans</i> cepa H1, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	883	883	100%	0,0	100%	JX960431.1
<i>Fusarium sacchari</i> , espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	883	883	100%	0,0	100%	JN997445.1
<i>Gibberella moniliformis</i> aislado FM11, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	883	883	100%	0,0	100%	HQ995666.1
<i>Fusarium</i> sp. PRE4b, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb KC254039.1 colección de cultivos de <i>Gibberella intermedia</i> UOA/HCPF<GRC>: 12610, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	883	883	100%	0,0	100%	JN254793.1
<i>Gibberella moniliformis</i> aislado FM2, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	883	883	100%	0,0	100%	JF499676.1

<i>Gibberella moniliformis</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, cepa: MAFF 240085	883	883	100%	0,0	100%	AB587012.1
<i>Gibberella moniliformis</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, cepa: CBS 576.78	883	883	100%	0,0	100%	AB587010.1

E 4-5, *Fusarium* sp.

Secuencia (488 bases):

CTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCCGCCAG
 AGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTTCTGAGTAAAACAAACAAATAAAT
 CAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAT
 GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
 TGCGCCCGCTGGTATTCGCGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAG
 CCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCTTCTGGCGGTGCCGCCCCCGAAAT
 ACATTGGCGGTCTCGCTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGA
 ACGCGGCGCGGCCATGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGT
 AGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAG (SEQ ID NO: 3)

5 Correspondencia de NCBI BLAST:

Descripción	Puntuación máx.	Puntuación total	Cobertura de ensayo	Valor de E	Ident. máx.	n.º de registro
<i>Fusarium</i> no cultivado, clon R1_12, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	900	900	99%	0,0	100%	KC753424.1
<i>Fusarium</i> no cultivado, ADN genómico que contiene el gen de ARNr de 18S, ITS1, gen de ARNr de 5,8S, ITS2 y gen de ARNr de 28S, clon RRA10	900	900	99%	0,0	100%	HE977525.1
<i>Fusarium tricinctum</i> aislado XSCZ07, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	900	900	99%	0,0	100%	JQ676180.1
Hongo sin cultivar, clon Hyp12, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	900	900	99%	0,0	100%	JQ618507.1

<i>Fusarium tricinctum</i> aislado UASWS0796, gen de ARN ribosómico 18S, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, espaciador transcrito interno 2, y gen de ARN ribosómico 28S, región	900	900	99%	0,0	100%	JN662408.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 52933, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	900	900	99%	0,0	100%	JF740937.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 52714, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	900	900	99%	0,0	100%	JF740911.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 25129, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb JF740916.1 <i>Fusarium</i> sp. NRRL 52726, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb JF740917.1 <i>Fusarium</i> sp. NRRL 52727, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb JF740918.1 <i>Fusarium</i> sp. NRRL 52730, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	900	900	99%	0,0	100%	JF740895.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 25128, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	900	900	99%	0,0	100%	JF740894.1
<i>Gibberella avenacea</i> aislado 3214, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	900	900	99%	0,0	100%	FJ224099.1

PC-2-24 (control), *Fusarium culmorum*

Secuencia (477 bases):

CATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAAAGGGACGGCCCCG
 CCGCAGGAACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAAGTTCTGAGTATAAAAAACAAATAA
 ATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAA
 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
 ATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCA
 AGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCCAAATACATTGGCGG
 TCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACATATCGTTACTGGTAATCGTCGCGG
 CCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG
 CTGAACTTAAGCATATCAATAG (SEQ ID NO: 4)

Correspondencia de NCBI BLAST:

Descripción	Puntuación máx.	Puntuación total	Cobertura de ensayo	Valor de E	Ident. máx.	n.º de registro
<i>Fusarium</i> sp. OTU930, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	881	990	100%	0,0	100%	GU934527.1
<i>Fusarium culmorum</i> aislado 149, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	880	880	99%	0,0	100%	KC989094.1
<i>Fusarium cerealis</i> , contiene genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, cepa: MAFF 101144	880	880	99%	0,0	100%	AB820718.1
<i>Fusarium culmorum</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, cepa: MAFF 241212 >dbj AB820717.1 <i>Fusarium cerealis</i> , contiene genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, cepa: MAFF 241212	880	880	99%	0,0	100%	AB586990.1
<i>Fusarium cerealis</i> cepa FC3, gen de ARN ribosómico 18S, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, espaciador transcrito interno 2, y gen de ARN ribosómico 28S, región	880	880	99%	0,0	100%	JF303876.1
<i>Fusarium cerealis</i> cepa FC2, gen de ARN ribosómico 18S, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, espaciador transcrito interno 2, y gen de ARN ribosómico 28S, región	880	880	99%	0,0	100%	JF303871.1

<i>Fusarium cerealis</i> cepa FC1, gen de ARN ribosómico 18S, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, espaciador transcrito interno 2, y gen de ARN ribosómico 28S, región	880	880	99%	0,0	100%	JF303867.1
<i>Fusarium culmorum</i> cepa G5, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	880	880	99%	0,0	100%	GU566271.1
Hypocreales no cultivado, clon B2_i ITS1F, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S, secuencia completa; y espaciador transcrito interno 2, secuencia parcial	880	880	99%	0,0	100%	EU754930.1
Hypocreales no cultivado, clon B3_1_c ITS1F, espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; gen de ARN ribosómico 5,8S, secuencia completa; y espaciador transcrito interno 2, secuencia parcial	880	880	99%	0,0	100%	EU754928.1

E 30-14, *Fusarium avenaceum*

Secuencia (485 bases):

CAGAAGTTGGGGTTTTACGGCATGGCCGCGCCGCGTTCCAGTTGCGAGGTGTTAGCT
 ACTACGCAATGGAGGCTGCAGCGAGACCGCCAATGTATTTTCGGGGGCGGCACCGCC
 AGAAGGCAGAGCCGATCCCCAACACCAAACCCGGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACG
 CTCGAACAGGCATGCCC GCCGAATACCAGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTC
 GATGATTC ACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCAT
 CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTTGTTTTACT
 CAGAAGTTACAATAAGAAACATTAGAGTTTGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTT
 ACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACATTAAGGTATGTTTCACAGGGGTTTGG
 GAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCA (SEQ ID NO: 5)

5 Correspondencia de NCBI BLAST:

Descripción	Puntuación máx.	Puntuación total	Cobertura de ensayo	Valor de E	Ident. máx.	n.º de registro
<i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb JX402187.1	896	896	100%	0,0	100%	JX402184.1
<i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de	896	896	100%	0,0	100%	JX402183.1

ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial						
<i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	896	896	100%	0,0	100%	JX402180.1
<i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	896	896	100%	0,0	100%	JX402179.1
<i>Fusarium tricinctum</i> cepa wxm38, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	896	896	100%	0,0	100%	HM037940.1
<i>Fusarium tricinctum</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, aislado: TS08-58-2	896	896	100%	0,0	100%	AB470855.1
<i>Fusarium tricinctum</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, aislado: TS08-86-1 >dbj AB470818.1 <i>Fusarium tricinctum</i> , genes para ARNr de 18S, ITS1, ARNr de 5,8S, ITS2, ARNr de 28S, secuencia parcial y completa, aislado: TS08-70-1 >gb GU586834.1 <i>Fusarium tricinctum</i> aislado Ppf30, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	896	896	100%	0,0	100%	AB470859.1
<i>Gibberella avenacea</i> aislado FA37, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	896	896	100%	0,0	100%	FJ602983.1
<i>Gibberella avenacea</i> aislado FA18, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	896	896	100%	0,0	100%	FJ602964.1

<p>>gb FJ602975.1 <i>Gibberella avenacea</i> aislado FA29, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb FJ603000.1 <i>Gibberella avenacea</i> aislado FA54, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial</p>						
<p><i>Gibberella avenacea</i> aislado FA17, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb FJ602968.1 <i>Gibberella avenacea</i> aislado FA22, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb FJ602973.1 <i>Gibberella avenacea</i> aislado FA27, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb FJ602981.1 <i>Gibberella avenacea</i> aislado FA35, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb FJ602999.1 <i>Gibberella avenacea</i> aislado FA53, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial</p>	<p>896</p>	<p>896</p>	<p>100%</p>	<p>0,0</p>	<p>100%</p>	<p>FJ602963.1</p>

E 06-7, *Fusarium subglutinans*

Secuencia (469 bases):

CAGAAGTTGGGGTTTAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGGTTTTACT
 ACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAATTTGGGGAACGCGATTTGACT
 CGCGAGTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCAT
 GCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGA
 ATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACC
 AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATAT
 AGAAACAGAGTTTAGGGGTCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCT
 GATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGT
 AATGATCCCTCCGC (SEQ ID NO: 6)

Correspondencia de NCBI BLAST:

Descripción	Puntuación máx.	Puntuación total	Cobertura de ensayo	Valor de E	Ident. máx.	n.º de registro
<i>Fusarium verticillioides</i> referencia UOA/HCPF 14862, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	867	867	100%	0,0	100%	KC709665.1
<i>Fusarium subglutinans</i> cepa AAFc-Fcir-012, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	867	867	100%	0,0	100%	KC464632.1
<i>Gibberella moniliformis</i> , ADN genómico que contiene el gen de ARNr de 18S, ITS1, gen de ARNr de 5,8S, ITS2 y gen de ARNr de 28S, cepa: DBT-112	867	1017	100%	0,0	100%	HF570008.1
<i>Gibberella moniliformis</i> aislado SIDV20110221051, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	867	867	100%	0,0	100%	KC143121.1
<i>Gibberella intermedia</i> referencia LFG4-3BBRS, gen similar al espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia parcial; mitocondrial	867	867	100%	0,0	100%	JQ272470.1
<i>Gibberella moniliformis</i> cepa CB1, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	867	867	100%	0,0	100%	JX511973.1

<i>Fusarium</i> sp. CHTAG40, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	867	867	100%	0,0	100%	JF773630.1
<i>Fusarium</i> sp. CHTAG38, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	867	867	100%	0,0	100%	JF773629.1
<i>Fusarium</i> sp. CHTAG34, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	867	867	100%	0,0	100%	JF773628.1
<i>Fusarium</i> sp. CHTAG32, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	867	867	100%	0,0	100%	JF773627.1

E-30-7, *Fusarium avenaceum*

Secuencia (480 bases):

GAAGTTGGGGTTTTACGGCATGGCCGCGCCGCGTTCCAGTTGCGAGGTGTTAGCTAC
TACGCAATGGAGGCTGCAGCGAGACCGCCAATGTATTTCTGGGGGCGGCACCGCCAG
AAGGCAGAGCCGATCCCCAACACCAAACCCGGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCT
CGAACAGGCATGCCCGCCGGAATACCAGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCTGA
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCG
ATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTTGTGTTTACTCA
GAAGTTACAATAAGAAACATTAGAGTTTGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTAC
GGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACATTAAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGA
GTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCC (SEQ ID NO: 7)

5 Correspondencia de NCBI BLAST:

Descripción	Puntuación máx.	Puntuación total	Cobertura de ensayo	Valor de E	Ident. máx.	n.º de registro
<i>Fusarium avenaceum</i> aislado 143, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	KC989099.1

<i>Fusarium</i> no cultivado, clon R1_12, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	KC753424.1
<i>Fusarium avenaceum</i> cepa Fk15, gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico de subunidad grande, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	KC464345.1
<i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb JX402187.1 <i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb JX402188.1 <i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb JX402189.1 <i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb JX402190.1 <i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JX402184.1
<i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JX402183.1

<i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JX402180.1
<i>Fusarium avenaceum</i> , gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JX402179.1
<i>Fusarium</i> no cultivado, ADN genómico que contiene el gen de ARNr de 18S, ITS1, gen de ARNr de 5,8S, ITS2 y gen de ARNr de 28S, clon RRF01	887	887	100%	0,0	100%	HE977545.1
<i>Fusarium</i> sp. CHTAM47, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JF773662.1
<i>Fusarium</i> sp. CHTAM2, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	887	887	100%	0,0	100%	JF773634.1

E 06-01, *Fusarium subglutinans*

Secuencia (468 bases):

GAAGTTGGGGTTTAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGGGTTTTACTAC
TACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAATTTGGGGAACGCGATTTGACTCG
CGAGTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGC
CCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATT
CTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAG
AGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGA
AACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATC
CGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATG
ATCCCTCCGCA (SEQ ID NO: 8)

5 Correspondencia de NCBI BLAST:

ES 2 769 893 T3

Descripción	Puntuación máx.	Puntuación total	Cobertura de ensayo	Valor de E	Ident. máx.	n.º de registro
<i>Fusarium verticillioides</i> referencia UOA/HCPF 14862, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	865	865	100%	0,0	100%	KC709665.1
<i>Gibberella moniliformis</i> , ADN genómico que contiene el gen de ARNr de 18S, ITS1, gen de ARNr de 5,8S, ITS2 y gen de ARNr de 28S, cepa DBT-112	865	1016	100%	0,0	100%	HF570008.1
<i>Gibberella moniliformis</i> aislado SIDV20110221051, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	865	865	100%	0,0	100%	KC143121.1
<i>Gibberella moniliformis</i> cepa CB1, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	865	865	100%	0,0	100%	JX511973.1
<i>Gibberella moniliformis</i> aislado FM13, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	865	865	100%	0,0	100%	HQ995667.1
<i>Gibberella moniliformis</i> aislado FM2, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	865	865	100%	0,0	100%	JF499676.1
<i>Fusarium</i> sp. Ljf001, gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial	865	865	100%	0,0	100%	HQ025928.1

<p><i>Gibberella</i> sp. FLS-2010 aislado FS-74(3), gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb HQ023214.1 <i>Gibberella</i> sp. FLS-2010 aislado FS-78(3), gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial >gb HQ023215.1 <i>Aspergillus</i> sp. FLS-2010 aislado FS-55(3), gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial</p>	865	865	100%	0,0	100%	HQ023213.1
<p><i>Gibberella</i> sp. FLS-2010 aislado FS-48.5(1), gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial</p>	865	865	100%	0,0	100%	HQ023211.1
<p><i>Gibberella</i> sp. FLS-2010 aislado FS-82(3), gen de ARN ribosómico 18S, secuencia parcial; espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5,8S, y espaciador transcrito interno 2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico 28S, secuencia parcial</p>	865	865	100%	0,0	100%	HQ023203.1

Análisis filogenético basado en ITS

El análisis filogenético de estos organismos se realizó mediante la adquisición de la secuencia del gen ribosómico de 5,8S-ITS. El hongo se cultivó sobre PDA durante 7 días, y se prepararon moldes de ADN usando el reactivo de preparación de muestras Prepman Ultra (Applied Biosystems, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Las regiones ITS del hongo se amplificaron con los cebadores de ITS universales ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'; SEQ ID NO:9) e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'; SEQ ID NO:10) usando la reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction", PCR). Las condiciones de la PCR usadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 15 s, 50 °C durante 30 s, 72 °C durante 45 s, y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los 50 µl de la mezcla de reacción contenían 1x tampón de PCR, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, 10 pmol de cada cebador, 1-5 ng de ADN, y 2,5 U de ADN polimerasa *Taq*. El producto amplificado (5 µl) se visualizó sobre un gel de agarosa al 1% (en p/v) para confirmar la presencia de una única banda amplificada. Los productos amplificados se purificaron mediante columnas Amicon Ultra (Millipore, EE. UU.) y se usaron 20-40 ng en una reacción de secuenciación de 10 µl usando el kit de secuenciación Big Dye Terminator kit (v. 3.1), con 2 pmoles del cebador directo o inverso en la reacción de secuenciación con ciclos. Se realizaron veinte ciclos de 96 °C durante 10 s, 50 °C durante 5 s, y 60 °C durante 4 min, y los productos de la extensión se purificaron mediante precipitación en etanol, se disolvieron en 10 µl de formamida HiDi, se incubaron a 95 °C durante 1 min y se cargaron en un analizador genético ABI Prism 377 (Perkin-Elmer, EE. UU.) para la secuenciación. Todos los reactivos para la secuenciación procedieron de Applied Biosystems, EE. UU. Los productos amplificados se secuenciaron y se alinearon con las secuencias en GenBank mediante el programa BLASTN (Altschul *et al.*, 1997). La secuenciación se realizó en la Universidad de California,

Berkeley.

5 En la tabla 3 se demuestra que el crecimiento de diversos *Fusarium* en residuos humanos provoca una reducción del peso seco de la masa durante el desarrollo de un experimento de 7 semanas. El montaje experimental contenía 0,5 g de bentonita con el sistema 2 sobre una placa de agua-agar que contiene aproximadamente 100 mg de peso húmedo de residuo humano y un pequeño taco de agar con el *Fusarium* de ensayo. El periodo de incubación fue de 7 semanas a 22 °C. Los restos de los residuos humanos se retiraron físicamente y se secaron durante 4 h a 80 °C y después se pesaron.

Tabla 3

Denominación del aislado de <i>Fusarium</i>	Peso seco de los residuos humanos remanentes después de 7 semanas. mg
Control - sin <i>Fusarium</i>	43
EC-4-5	14
E06-7	23
E 06-7	25
P2-24, <i>Fusarium culmorum</i> , control original	24
E30-2	18
E 30-7	27
E 06-1	16
E 30-14	15
E06-8	14

10 Ejemplo 2: Establecimiento de las mezclas S-3 y S-4

Se realizaron ensayos de un modo similar a los descritos para los anteriores sistemas 1 y 2 (figura 9) para averiguar las actividades biológicas de diversas mezclas de ensayo frente a un panel de microbios de ensayo. Se colocó un taco con cada organismo en la periferia de la placa de PDA. En el pocillo central se colocó la disolución de ensayo en una copa de plástico. También se preparó una placa control (A). Después de 30 h se comparó el crecimiento de los organismos de ensayo con el control y se calculó el porcentaje de inhibición. La placa (B) contenía la mezcla de ensayo. Las mediciones se realizaron 30 h después de preparar la placa.

20 Debe advertirse que las mezclas del sistema 1 y 2 (según la invención) descritas en la presente contienen aproximadamente 3,5 partes de ácido propanoico, junto con 3,5 partes de ácido isobutírico y, por último, dos partes de un éster, butirato de isoamilo (sistema 1) o isobutirato de isoamilo (sistema 2). Se entiende que, aunque estas mezclas son eficaces en una serie de aplicaciones, pueden existir otras mezclas que sean aún más eficaces debido a su gama de actividades biológicas, su utilidad y su eficacia a dosis bajas. Para este fin, se realizó una búsqueda usando el ácido propanoico convencional como punto de partida, al mismo tiempo que se omitía el ácido isobutírico (debido a su mal olor) y se incluían ésteres de peso molecular mayor como el componente de éster. De modo bastante sorprendente e inesperado, se descubrió que el uso de ácido propanoico en una cierta parte (7) y hexanoatos de isoamilo en una cierta parte (2) produce una mezcla volátil con actividades biológicas que son mayores que B-23 (véase a continuación) y S-1, tal como se muestra en la tabla 4. Esta nueva mezcla se denomina sistema 3, mientras que la formulación que comprende ácido propanoico (7) y formiato (2) se denomina sistema 4. Debe advertirse que el sistema 4 es menos activo frente a la mayoría de los organismos ensayados que el sistema 3, pero el sistema 4 mata a *E. coli*, al mismo tiempo que permite el crecimiento de *Fusarium*. Debido a esto, el sistema 4 es una mezcla eficaz que puede usarse como tratamiento de residuos humanos junto con *Fusarium* spp.

35 Tabla 4. Efectos de diversos ésteres y ácido propanoico sobre el crecimiento de organismos de ensayo medidos a las 30 h a temperatura ambiente. El efecto se representa como porcentaje de inhibición del crecimiento cuando se compara directamente con el crecimiento de un control no inoculado. Se realizaron las mediciones (promedio de dos) como el crecimiento de las hifas desde el borde del taco del inóculo.

35

ES 2 769 893 T3

	<i>Cercospora beticola</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Pythium ultimum</i>
Disolución S-1	100	72	92	0	100
B-23**	92	89	42	66	100
Hexanoatos de isoamilo (2 µl)	83	13	0	66	28
Ácido propanoico	66	38	83	0	100
Ácido propanoico con formiato de isoamilo (7:2) = S-4	100	72	100	0	100
Ácido propanoico con formiato de isobutilo (7:2)	100	79	98	0	100
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (7:2) = S-3* (según la invención)	100	100	100	100	100
Ácido propanoico con formiato de isoamilo y cineol (7:1:1)	100	92	100	94	100
Ácido propanoico con una mezcla igual de formiatos y valenceno (7:2:0,5)	95	89	100	50	100
Ácido propanoico con una mezcla igual de formiatos (7:2)	98	92	100	64	100
Ácido propanoico con formiato de hexilo (7:2)	100	88	87	60	100

	<i>Fusarium solani</i>	<i>Trichoderma viridae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
Disolución S-1	72	56	100	86
B-23**	32	32	81	29
Hexanoatos de isoamilo (2 µl)	83	13	0	66
Ácido propanoico	17	45	81	52
Ácido propanoico con formiato de isoamilo (7:2) = S-4	53	25	85	0
Ácido propanoico con formiato de isobutilo (7:2)	0	32	47	29
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (7:2) = S-3* (según la invención)	95	58	100	83
Ácido propanoico con formiato de isoamilo y cineol (7:1:1)	69	35	74	0
Ácido propanoico con una mezcla igual de formiatos y valenceno (7:2:0,5)	74	35	77	43

Ácido propanoico con una mezcla igual de formiatos (7:2)	58	30	77	29
Ácido propanoico con formiato de hexilo (7:2)	86	49	93	90

Actividad contra levaduras y bacterias

Sí = Crecimiento

Intermedio = Algo de crecimiento

5 No = Sin crecimiento

	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Disolución S-1	Algo de crecimiento	No	No	Sí
B-23**	Sí	No	No	Intermedio
Hexanoatos de isoamilo (2 µl)	Sí	Sí	Sí	Sí
Ácido propanoico	Intermedio	No	No	Sí
Ácido propanoico con formiato de isoamilo (7:2), S-4	Intermedio	No	No	Sí
Ácido propanoico con formiato de isobutilo (7:2)	Sí	No	No	Sí
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (7:2), S-3* (según la invención)	Trazas	No	No	Sí
Ácido propanoico con formiato de isoamilo y cineol (7:1:1)	No	No	No	Sí
Ácido propanoico con una mezcla igual de formiatos y valenceno (7:2:0,5)	Sí	Intermedio	No	Intermedio
Ácido propanoico con una mezcla igual de formiatos (7:2)	Sí	No	No	Intermedio
Ácido propanoico con formiato de hexilo (7:2)	Sí	No	No	Intermedio

* Los ensayos de S-3 se realizaron durante 30 h a temperatura ambiente y después se midieron y se fotografiaron. Las mediciones se realizaron desde el borde del bloque de inoculación hasta el borde de la colonia. Se realizaron dos mediciones y después se promediaron. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente. Los resultados demuestran que S-3 fue la mezcla más biológicamente activa de las disoluciones ensayadas. Además, nótese que S3 inhibe a *Erwinia carotovora* en 80-90% e inhibe a *Lactobacillus* sp. en aproximadamente 50%.

** La fórmula B-23 ensayada es la siguiente: 1,39 partes de acetaldehído; 2,83 partes de 2-butanona; 30,56 partes de metil éster del ácido 2-metilpropanoico; 2,29 partes de 2-metilpropil éster del ácido acético; 1,09 partes de 2-metilpropil éster del ácido 2-metilpropanoico; 1,78 partes de 2-metil-1-propanol; 1,51 partes de (E)-2-metil-2-butenal; 4,79 partes de acetato de 3-metil-1-butanol; 4,78 partes de 2-metilbutil éster del ácido 2-metilpropanoico; 5,38 partes de 3-metil-1-butanol; 351,18 partes de ácido 2-metilpropanoico; 1,31 partes de 2-feniletíl éster del ácido acético.

5 Debe advertirse que la mezcla S-3 produce una inhibición del 100% en muchos de los organismos ensayados (tabla 4). El efecto fue mayor que con hexanoatos de isoamilo o ácido propanoico por sí solos. Así, en algunos casos parece ser fuertemente sinérgico, concretamente, *Sclerotinia sclerotiorum* 66% con hexanoatos, 0% con ácido propanoico, y 100% cuando se combinan los dos. Otros organismos también reaccionaron de la misma manera, tales como *Rhizoctonia solani*. Además, parece que S-3 es más activo que S-1, así como B-23 y, por supuesto, que los hexanoatos de isoamilo o el ácido propanoico por sí solos (tabla 4). Otras combinaciones de ácido propanoico y otros ésteres o combinaciones de ésteres y terpenoides, tal como cineol o valenceno, no fueron tan eficaces (tabla 4). La formulación S-4, aunque no es tan activa como S-3, no provocó un efecto tan grande sobre *Fusarium*, pero sí inhibió otros microbios y, por tanto, puede ser más adecuada como agente útil para tratar residuos humanos en combinación con *Fusarium*. S-3 destruyó ambos organismos de ensayo bacterianos en los ensayos (tabla 4). S-3 también afectó a *Erwinia* y *Lactobacillus* sp. (tabla 4).

Establecimiento de las proporciones adecuadas de ingredientes para S-3

15 Se variaron las mezclas de ácido propanoico a hexanoatos de isoamilo y después se ensayaron según los procedimientos indicados anteriormente. Resultó que la mezcla más favorable fue la proporción de 7:2 de los dos ingredientes (tabla 5). Todas las demás produjeron unos valores menores de inhibición (tabla 5). La adición de terpenoides, tales como el valenceno, no estimuló la actividad biológica. Por tanto, la proporción de 7:2 en v/v de los dos ingredientes es la más preferida para la aplicación práctica.

Tabla 5. Efectos de diversas proporciones de ácido propanoico a hexanoatos de isoamilo en un panel de organismos de ensayo. Todos los ensayos se realizaron como se describe en la tabla 4.

	<i>Cercospora beticola</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Pythium ultimum</i>
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (7:2) = S-3 (según la invención)	100	100	100	100	100
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (5:4) (según la invención)	86	95	100	70	100
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (3:6) (según la invención)	95	95	94	60	100
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo y valenceno (6:2:1) (según la invención)	100	95	94	20	100

20

	<i>Fusarium solani</i>	<i>Trichoderma viridae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (7:2) (según la invención)	95	58	100	83
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (5:4) (según la invención)	58	59	89	50
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (3:6) (según la invención)	72	62	93	50
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo y valenceno (6:2:1) (según la invención)	72	59	93	50

Sí = Crecimiento

Intermedio = Algo de crecimiento

No = Sin crecimiento

	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (7:2) (según la invención)	Sí	No	No	Algo
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (5:4) (según la invención)	Sí	Trazas	No	Algo
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo (3:6) (según la invención)	Sí	Sí	Trazas	Algo
Ácido propanoico con hexanoatos de isoamilo y valenceno (6:2:1) (según la invención)	Sí	Algo	No	Algo

C. Ensayo de otros ésteres con ácido propanoico

- 5 Tal como se muestra en la siguiente tabla 6, se ensayaron otros ésteres para una mezcla con ácido propanoico a una proporción de ácido propanoico:éster 7:2. Estas formulaciones se añaden a las formulaciones S-1, S-2, S-3 (según la invención) y S-4 y, por consiguiente, forman parte de las formulaciones de la presente invención. Debe apreciarse que la presente invención puede incluir múltiples ésteres o combinaciones de cualquiera de los ésteres descritos en la presente, junto con ácido propanoico, preferiblemente a una proporción de mezcla de ácido propanoico:éster 7:2.
- 10

Tabla 6. Ensayo de ésteres

Disolución de ensayo	<i>Cercospora beticola</i>	B. <i>Phytophthora cinnamomi</i> *	C. <i>Verticillium dahliae</i>	D. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	E. <i>Pythium ultimum</i>
Ácido propanoico con benzoato de isoamilo (7:2)	96	—	100	80	100
Ácido propanoico con fenilacetato de isoamilo (7:2)	80	—	100	59	100
Ácido propanoico con cinamato de isoamilo	96	—	100	59	100
Ácido propanoico con octanoato de isoamilo (7:2)	96	—	100	54	100
Ácido propanoico con salicilato de isoamilo (7:2)	88	—	100	49	100
Ácido propanoico con laurato de isoamilo (7:2)	72	—	100	45	100

Organismo no disponible

	F. <i>Fusarium solani</i>	G. <i>Trichoderma viridae</i>	H. <i>Rhizoctonia solani</i>	I. <i>Aspergillus flavus</i>
Ácido propanoico con benzoato de isoamilo (7:2)	0	77	74	92
Ácido propanoico con fenilacetato de isoamilo (7:2)	0	60	54	92

Ácido propanoico con cinamato de isoamilo	74	66	64	96
Ácido propanoico con octanoato de isoamilo (7:2)	66	64	62	96
Ácido propanoico con salicilato de isoamilo (7:2)	0	64	43	92
Ácido propanoico con laurato de isoamilo (7:2)	0	47	62	20

Sí = Crecimiento

Intermedio = Algo de crecimiento

No = Sin crecimiento

	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
Ácido propanoico con benzoato de isoamilo (7:2)	Trazas	No	No	Trazas	Intermedio	No
Ácido propanoico con fenilacetato de isoamilo (7:2)	Trazas	No	No	Intermedio	Intermedio	No
Ácido propanoico con cinamato de isoamilo	Trazas	No	No	Intermedio	Trazas	No
Ácido propanoico con octanoato de isoamilo (7:2)	Trazas	No	No	Trazas	Trazas	No
Ácido propanoico con salicilato de isoamilo (7:2)	Sí	No	No	Trazas	Trazas	No
Ácido propanoico con laurato de isoamilo (7:2)	Sí	No	No	Trazas	Trazas	No
Control	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

5

Todos los ensayos se realizaron según los métodos en la tabla 4.

Ejemplo 3 (según la invención): Ensayos de descontaminación de maíz

10 El maíz se fermenta para fabricar etanol. Se tritura, se calienta para formar una masa y se trata con enzimas antes de la adición de células de levadura para lograr una preparación final. También se añaden una o más preparaciones de antibióticos que tienden a suprimir a los microbios competitivos que podrían contaminar el proceso de fermentación. Puesto que dichos antibióticos se están retirando del mercado, son necesarios otros procesos de tratamiento antimicrobiano. Para determinar si la preparación S-3 tiene eficacia contra los microbios que contaminan el maíz, se realizó lo siguiente:

15 Se trataron aproximadamente 5 g de maíz triturado (maíz partido) durante 1 h con 10 ml de disoluciones al 0% (control), al 0,25%, al 0,5% y al 1% de S-3 preparadas con 7:2 en v/v más 10 microlitros de Triton×100 (por 10 ml). El tratamiento se realizó durante 1 h, y el producto se secó sobre un pañuelo de papel para eliminar el exceso de líquido. Se colocaron aproximadamente 2 gramos del material directamente en una placa de PDA y se incubaron durante 2 días antes de ser fotografiados. En otro caso, las semillas partidas se secaron bajo una campana y después se cultivó sobre PDA.

20 Los resultados demuestran que los niveles de tratamiento del 0,5% y 1,0% de S-3 durante 1 h eliminaron completamente la contaminación bacteriana de las partículas de maíz partido (figura 10). Cuando las partículas de maíz se secaron con papel secante y después se secaron aún más y se ensayaron de la misma manera, los resultados fueron casi los mismos.

De modo global, los resultados indican que la disolución S-3 puede usarse para descontaminar materiales y productos de procedencia agrícola y alimentaria. Esto se puede aplicar de modo similar a instrumentos, equipos, ropa y alimentos que se están procesando para el consumo.

Ejemplo 4: Uso de S-4 en el tratamiento de residuos humanos con *Fusarium subglutinans*

5 Se ensayaron las fórmulas S-3 (según la invención) y S-4 para conocer su eficacia para tratar bacterias de residuos humanos. El ensayo se realizó usando 0,5 g de bentonita a una tasa de 1 ml de S-1, S-2, S-3 o S-4 o B-23 por 10 g de bentonita. En el control no había mezcla de compuestos. Se colocaron semillas de cebada contaminadas con *Fusarium subglutinans* (el mismo que el usado previamente) en placas de PDA. La placa intermedia se sembró en estrías con un cultivo puro de *E. coli* obtenido de residuos humanos. Se tapó y se selló con parapelícula y después se incubó durante 3 días y se fotografió. Tanto S-3 como S-4 mataron a *E. coli*, pero se obtuvo un efecto menor con B-23. Los *Fusarium* crecieron en presencia de S-3 y crecieron mejor con S-4. Los *E. coli* crecieron en el control, y ligeramente en presencia de B-23, tal como se ilustra en la figura 11. Debe advertirse que S-4 en bentonita produjo la destrucción completa de *E. coli*, y además *Fusarium* creció. Esto también es verdad con los tratamientos de S-1 y S-3, pero los *Fusarium* fueron más inhibidos. El B-23 como control también fue eficaz en la destrucción de *E. coli*, pero no hasta el mismo grado. Los resultados demuestran que S-4 es un tratamiento bueno y razonable de residuos humanos para matar a las bacterias entéricas con el uso concomitante de *Fusarium* para permitir la degradación de los materiales de los residuos humanos.

Ejemplo 5 (según la invención): Tratamiento de residuos animales con S-3

20 Se aplicó S-3 a la tasa de 3 ml por 453,59 gr (1 libra) de zeolita. Para ensayar su eficacia para tratar residuos animales con el control del crecimiento bacteriano, se realizaron los siguientes experimentos. La zeolita tratada (0,5 g) se colocó en un pocillo central de una placa de PDA (excavado). La placa había sido completamente cubierta de cultivos en estría y además cubierta por una suspensión de células bacterianas procedente de estiércol de pollo, cabra, gato y caballo. Las placas se cubrieron y se sellaron con parapelícula y después se observaron después de 3-4 días de incubación y se fotografiaron. Los resultados en todos los casos demuestran que S-3 es una mezcla antimicrobiana eficaz, en virtud de la zona de inhibición que provocó en las placas. Este efecto también se advirtió en el caso de la extensión sobre las placas de bacterias de la materia fecal de caballo, cabra y gato (figura 12). Los resultados sugieren que la combinación de S-3 y zeolita tiene el potencial de ser usada como tratamiento de la arena higiénica para gatos o como tratamiento para gallineros de pollos o como aplicación para lechos higiénicos para animales.

30 Ejemplo 6 (según la invención)

Se ensayó más a fondo la eficacia de S-3 como tratamiento para la arena higiénica para gatos y como tratamiento para lechos higiénicos para animales.

Ensayo de eficacia comparativa de un tratamiento para arena higiénica para gatos

35 Un recipiente con tapa de sellado por presión de 929,03 cm² (1 pie cuadrado) se llenó con el tratamiento para arena higiénica deseado más bentonita sin tratar en las proporciones indicadas en las instrucciones de envasado (figura 13). Para estos ensayos, se ensayó CLOE (usado la tasa de 4 ml por 453,6 gr (1 libra)) y una bentonita control no tratada. Se mantuvo una temperatura constante en las instalaciones de ensayo durante el transcurso de los ensayos (por ejemplo, 21 °C (70 °F)). Se añadieron aproximadamente 50 g de heces de gato y 5 ml de orina a los recipientes tratados. A intervalos de 24 horas se midió el nivel de amoníaco en cada caja usando el medidor de amoníaco Z-800. Las mediciones se realizaron introduciendo el medidor en cada caja a los respectivos intervalos de 5 minutos, minimizando el tiempo en que el recipiente se mantiene abierto. El medidor de amoníaco indica un nivel promedio de amoníaco a lo largo de cinco minutos, así como el nivel máximo de amoníaco alcanzado durante los cinco minutos. Después de terminar las mediciones, se retiró la materia fecal del día y se añadieron aproximadamente 50 g de materia fecal fresca y 5 ml de orina. Los recipientes se volvieron a sellar. Estas etapas continuaron a diario durante 1 semana para determinar las eficacias relativas de los productos. Se tomó una lectura de amoníaco de una vez a intervalos de una hora en cada uno de los recipientes.

Después de 8 días, las lecturas del nivel promedio de amoníaco tomadas a lo largo de intervalos de 5 minutos cada 24 horas demostraron que la producción de amoníaco fue mucho menor en la arena higiénica tratada con CLOE que en el control no tratado (véanse las figuras 14A y 14B).

50 Ejemplo 7: Análisis microbiológico

Se realizaron estudios microbiológicos para demostrar que los procesos de formación de olores están directamente relacionados con la actividad microbiológica en los residuos y en el entorno de los residuos. La inhibición o el control de la actividad microbiana deberían tener un efecto beneficioso sobre la reducción de los olores. El CLOE tiene un efecto directo sobre esta actividad microbiana, en lugar de disminuir los olores mediante su absorción, tal como hacen otros productos para el tratamiento de la arena higiénica para gatos. Para demostrar esta cualidad, se colocaron aproximadamente 0,5 g de CLOE en el pocillo central de una placa de agar de dextrosa y patata (PDA), que había sido cubierta con un césped de bacterias derivadas de residuos sólidos frescos de gato. Las placas se

incubaron a 23 °C durante 1 semana y se fotografiaron. La serie de fotografías que se muestra en las figuras 15A y 15B indica que el control de bentonita (15A) presenta grandes cantidades de colonias bacterianas que crecen por toda la placa, incluyendo las áreas cercanas al pocillo que contiene la arena higiénica. Por contraste, el tratamiento con CLOE (4 ml de S3 por 453,6 gr (1 libra) de vehículo, 15B) presentaba una inexistencia prácticamente total de colonias bacterianas alrededor del pocillo de la placa, pero sí existe algo de crecimiento de *Penicillium* sp., que es inherente a la sustancia vehículo y no contribuye a la producción de olores. Por favor, nótese también la presencia de *Penicillium* sp. en el pocillo control.

Evidentemente, la actividad antimicrobiana del producto de CLOE está directamente relacionada con su eficacia como tratamiento para la arena higiénica para gatos y su capacidad para reducir el amoníaco y otros olores que emanan de los residuos animales (específicamente, de gato), según manifiestan muchos usuarios. Esto también fue confirmado por la capacidad del producto para inhibir y matar a los microbios asociados con los residuos, tales como *E. coli*. La fórmula de CLOE es absorbida por las sustancias vehículo, pero también se libera lentamente a lo largo del tiempo y, así, puede actuar con eficacia a cierta distancia de la fuente puntual de las partículas de vehículo de bentonita o zeolita.

Ejemplo 8: Ensayo de eficacia comparativa de la reparación de un lecho higiénico para pollos

Se rellenaron recipientes de plástico con tapa de sellado por presión de 929,03 cm² (1 pie cuadrado) con virutas de pino y el tratamiento deseado del lecho higiénico en las proporciones indicadas en las instrucciones del envase (figura 16). Para estos ensayos, se ensayó un lecho higiénico de corral a la tasa de 15 ml por 453,6 gr (1 libra) de zeolita y un control de zeolita no tratada, puesto que estos productos son los artículos más populares del mercado. Se mantuvo una temperatura constante en las instalaciones de ensayo durante el transcurso de los ensayos (por ejemplo, 21 °C (70 °F)). Se añadieron aproximadamente 50 g de heces de pollo a los recipientes y se pulverizaron con aproximadamente 2 ml de agua. A intervalos de 24 horas se midió el nivel de amoníaco en cada caja usando el medidor de amoníaco Z-800. Las mediciones se realizaron introduciendo el medidor en cada caja durante los respectivos intervalos de 5 minutos, minimizando el tiempo en que el recipiente se mantiene abierto. El medidor de amoníaco indica un nivel promedio de amoníaco a lo largo de cinco minutos, así como el nivel máximo de amoníaco alcanzado durante los cinco minutos. Se añadieron aproximadamente 50 g de materia fecal fresca y 2 ml de agua cada día después de finalizar las mediciones, y el recipiente se volvió a sellar. Estas etapas continuaron durante 3 semanas para determinar las eficacias relativas de la fórmula. Se tomó una lectura de amoníaco de una vez a intervalos de una hora en cada uno de los recipientes.

Después de 8 días, las lecturas del nivel promedio de amoníaco tomadas a lo largo de intervalos de 5 minutos cada 24 horas demostraron que la producción de amoníaco más alta fue en el control de zeolita y la más baja en el lecho tratado con lecho higiénico de corral (figuras 17A y 17B).

Ejemplo 9: Ensayo de eficacia comparativa de la reparación de un lecho higiénico de corral para animales grandes

Se llenó un recipiente de plástico con tapa de sellado por presión de 929,03 cm² (1 pie cuadrado) con virutas de pino (un material usado habitualmente para animales grandes) y el tratamiento deseado del lecho higiénico, en las proporciones indicadas en las instrucciones del envase (figura 18). Para estos ensayos, se ensayó un lecho higiénico de corral y un control de zeolita no tratada. Se mantuvo una temperatura constante en las instalaciones de ensayo durante el transcurso de los ensayos (por ejemplo, 21 °C (70 °F)). Se añadieron aproximadamente 100 g de estiércol de caballo fresco y aproximadamente 10 ml de orina a los recipientes tratados. Después de 24 horas, se colocó un medidor de amoníaco Z-800 dentro de cada caja para realizar las mediciones a los respectivos intervalos de 5 minutos, minimizando el tiempo en que el recipiente se mantiene abierto. El medidor de amoníaco indica un nivel promedio de amoníaco a lo largo de cinco minutos, así como el nivel máximo de amoníaco alcanzado durante los cinco minutos. Después de terminar las mediciones, se retiró el estiércol del día y el lecho de pino empapado en orina. Se añadió la proporción recomendada de tratamiento del lecho para manchas de humedad más aproximadamente 100 g de estiércol fresco y aproximadamente 10 ml de orina, y cada recipiente se volvió a sellar. Estas etapas continuaron durante 1 semana para determinar las eficacias relativas de los productos. Se tomó una lectura de amoníaco de una vez a intervalos de una hora en cada uno de los recipientes.

Después de 8 días, las lecturas del nivel promedio de amoníaco tomadas a lo largo de intervalos de 5 minutos cada 24 horas demostraron que la producción de amoníaco más alta fue en el lecho higiénico control y la más baja en el lecho tratado con lecho higiénico de corral (figuras 19A y 19B).

Ejemplo 10 (según la invención): Tratamiento de la diarrea neonatal con la fórmula S-3

La diarrea neonatal es una enfermedad diarreica de los terneros provocada principalmente por la infección vírica y bacteriana del ternero. En algunos casos, la diarrea neonatal puede aparecer en más del 70% de terneros en un rebaño y provoca la muerte de 50% de los terneros infectados. Aunque existe una etiología vírica para estos acontecimientos, la causa más común es una de las cepas bacterianas más patógenas de *Escherichia coli*, seguida de cepas de *Cryptosporidia* y *Salmonella*.

La concentración mínima inhibidora ("minimum inhibitory concentration", MIC) de S-3 para *E. coli* es <0,00125%.

Véase también la anterior tabla 5. Por consiguiente, una disolución de S-3 aproximadamente al 1% en 50 ml puede ser eficaz para tratar a un ternero con diarrea neonatal. Se preparó una disolución (S-X) para su ensayo con terneros diagnosticados con los síntomas clásicos de la diarrea neonatal.

La fórmula S-X contiene los siguientes ingredientes:

- 5 Por 100 ml:
 - 1 g de glucosa
 - 1 g de proteína del suero
 - 0,25 g de KCl
 - 0,25 g de MgSO₄
- 10 0,5 g de NaCl
- 1 ml de S-3

La glucosa y la proteína del suero se añadieron para proporcionar un suplemento nutricional a los animales tratados, mientras que las demás sales se añadieron para potenciar el equilibrio electrolítico del animal. El componente de S-3 está presente para inhibir y matar a las bacterias patógenas.

- 15 Se realizó un primer ensayo con 5 terneros recién nacidos Holstein sin diarrea neonatal para saber si la disolución S-X es tóxica o produce algún efecto secundario. A cada ternero sano se le administraron 50 ml de la disolución S-X, y después 1 día y a lo largo de varias semanas no se advirtieron efectos secundarios adversos ni, en particular, señales de efectos secundarios químicos o un comportamiento anómalo.

- 20 Después se hicieron arreglos para realizar el ensayo en animales *in vivo* con la mezcla S-X en una granja en Bozeman, Montana. Los primeros informes sobre animales con diarrea neonatal (de raza Angus) surgieron realizaron durante una época de tiempo frío y húmedo varias semanas antes. Cada animal con diarrea neonatal presentaba todos los síntomas asociados con la enfermedad. Las dosis para cada animal se ajustaron a 50 ml por animal por tratamiento.

- 25 Se trataron quince terneros con diarrea neonatal certificada con 50 ml de la disolución a través de la cavidad oral mediante intubación. Trece terneros que habían sido tratados con 1 dosis se recuperaron durante la noche. Dos animales requirieron una segunda dosis y se recuperaron durante la noche después de la segunda dosis. La figura 20A muestra uno de los dos terneros con diarrea neonatal (marcador 166) que tuvo que recibir un segundo tratamiento de 50 ml de la disolución S-X (imagen tomada antes de la administración de la disolución S-X). Nótese la gran pila de excrementos en la esquina inferior derecha, y la cabeza y las orejas inclinadas hacia abajo (figura 20A).
- 30 Un día después del segundo tratamiento con la disolución S-X, el ternero podía andar y estaba exento de diarrea (figura 20B). El segundo día después del segundo tratamiento con S-X, el ternero ya estaba mamando de su madre.

No se indicaron muertes en este experimento. Los propietarios de la granja indicaron que la disolución S-X era mucho mejor que todos los demás tratamientos que habían usado hasta la fecha. Por consiguiente, la disolución S-X representa un tratamiento seguro, rápido y eficaz para la diarrea neonatal.

- 35 Ejemplo 11 (según la invención): Tratamiento de la diarrea neonatal en ganado

- Se desarrolló una fórmula de tratamiento de la diarrea neonatal que contenía la formulación S-3 más azúcar, aminoácidos, cloruro de sodio y potasio, y acetato de magnesio. Se trataron muchos animales que presentaban diarrea neonatal infecciosa (provocada por un patógeno). Generalmente, si está implicada una diarrea neonatal infecciosa, las deposiciones tienen un color amarillo a marrón a ligeramente verde. Además, si la diarrea neonatal está provocada por un parásito, la materia fecal contiene sangre, y esto resulta evidente. Si está implicada una diarrea neonatal no infecciosa (diarrea neonatal de la leche), la materia fecal es blanquecina. En este estudio, al menos dos animales tenían diarrea neonatal de la leche y no se recuperaron. De modo similar, parece que un animal tenía diarrea neonatal parasitaria y tampoco se recuperó. Básicamente, el resto de los animales (que tenían diarrea neonatal provocada por virus o bacterias) sí se recuperaron cuando se les administraron los tratamientos de S-X. En aproximadamente 90% de los casos, la recuperación se produjo dentro de 12-24 h y las señales de recuperación aparecieron dentro de 3-4 h. En unos pocos casos, la recuperación tardó dos días y requirió un segundo tratamiento. Esto no se parece a ningún otro tratamiento disponible. El material se administra por vía oral mediante jeringa o sonda de alimentación. Otros tratamientos que emplean antibióticos y disoluciones de nutrientes y electrolitos pueden ayudar al animal, pero la recuperación no es tan segura como es casi siempre el caso con el tratamiento de S-3.
- 40
- 45
- 50

Ejemplo de formulación y tratamiento de la diarrea neonatal en terneros

Por 90 ml de agua:

1 g de glucosa

1 g de glicina

0,5 g de NaCl

0,25 g de KCl

5 0,25 g de acetato de Mg

1 ml de S-3 que contiene 0,7 ml de ácido propanoico y 0,2 ml de hexanoatos de isoamilo.

Se administraron 50 ml por animal a través de una jeringa o sonda de alimentación por tratamiento, y a veces fue necesario repetir el tratamiento si el animal no se había recuperado en 24 h.

Ejemplo de formulación y tratamiento de la diarrea neonatal en lechones

10 Por 90 ml de agua:

1 g de glucosa

1 g de glicina

0,5 g de NaCl

0,25 g de KCl

15 0,25 g de acetato de Mg

0,1 g de KH_2PO_4

Dos ml de S-3 contienen 0,7 ml de ácido propanoico y 0,2 ml de hexanoatos de isoamilo.

Se administraron 1-2 ml por lechón mediante una jeringa.

Estudio de campo del tratamiento de la diarrea neonatal con S-X

20 Caso 1 - Granja 1

16 de mayo, 2014 - Un ternero había enfermado de diarrea neonatal el 6 de mayo, y había sido tratado con banomina y dos inyecciones de LA-200 9 (un fármaco antiinfeccioso). También se le administraron disoluciones de electrolitos a diario en una dosificación de 0,47 litros (1 pinta); sin embargo, el animal no se recuperó y languideció durante 9 a 10 días con diarrea neonatal crónica. La disolución S-X se envió la mañana del 17 de mayo y el ternero neonatal recibió 50 ml por vía oral mediante jeringa. Se advirtió que el ternero mejoró muchísimo su condición por la tarde y se encontró completamente mejor la mañana del 18 de mayo. El ternero no mostró más señales de diarrea neonatal hasta el 22 de mayo, 2014. Estos resultados demuestran que casi todos los tratamientos de la diarrea neonatal en este animal habían fracasado y que no pasó a un estadio de recuperación hasta que se administró el tratamiento con S-3.

30 Caso 2 - Granja 2

La granja 2 experimentó la llegada de terneros con diarrea neonatal y mortalidad al final del invierno de 2014. Se les proporcionó la disolución con la tecnología de S-X, y los granjeros usaron la disolución para el tratamiento de los terneros mediante sonda de alimentación. Se trataron tres terneros de esta manera. La recuperación de la diarrea neonatal de estos terneros se produjo dentro de 24 horas después del tratamiento, y no se administraron otras medicaciones conocidas al mismo tiempo que los tratamientos con S-X que podrían haber contribuido a la recuperación. Los animales enfermos se introdujeron en el establo y se fotografiaron durante su recuperación. Uno de estos animales aparece en la figura 21.

35 Caso 3 - Granja 3

La granja 3 sufrió un invierno particularmente duro durante la temporada de pariciones, incluyendo vientos fuertes y una gran cantidad de nieve. Estas condiciones provocan que la diarrea neonatal aparezca con más frecuencia en los terneros.

Los tratamientos con S-X para la diarrea neonatal de los terneros se administraron en esta granja desde el 2 de abril al 24 de abril, 2014. Se trataron once animales con dosificaciones de 50 ml usando el método de sonda de alimentación. Los resultados fueron muy buenos en nueve cabezas con una sola dosis, mientras que un animal hubo de ser tratado una segunda vez y otro necesitó tres tratamientos distintos. En algunos casos, S-X no fue el único tratamiento administrado. Algunos animales también presentaban síntomas de neumonía y necesitaron dosis de

Baytril, sulfapíldoras, o Nufloor. Todos los animales que fueron tratados con la disolución S-X se recuperaron, y la mayoría (9) se recuperaron dentro de veinticuatro horas después del tratamiento.

Caso 4 - Vaquería 1

5 15 de mayo, 2014 - La vaquería 1 es una instalación de vacas lecheras Holstein. Esta vaquería aloja a 300 animales cuya salud y necesidades diarias deben cuidarse. En esta vaquería se demostró que la fuente de la diarrea neonatal eran rotavirus, lo cual fue descubierto por el centro veterinario localizado cerca de la vaquería. El tratamiento con S-X se administró a 7 animales jóvenes que padecían diarrea neonatal mediante una aplicación con una jeringa oral. Todos los animales que recibieron el tratamiento con S-X se recuperaron. Todos los animales, excepto uno, se recuperaron dentro de 24 horas, y uno después de un segundo tratamiento con S-X.

10 Según la vaquería 1, en diciembre de 2013, 30 de sus terneros murieron por diarrea neonatal, aunque estos terneros habían recibido múltiples tratamientos con electrolitos, así como antibióticos. El tratamiento de estos terneros habitualmente duró 5-7 días con múltiples tratamientos, comparado con un día de 1-2 dosificaciones de los tratamientos de S-X. La vaquería 1 prefirió la administración del tratamiento mediante bebida oral y esta demostró ser eficaz.

15 La gerente de la vaquería 1 comentó, "Necesitamos más, esto realmente funciona". Se refería a la disolución S-X y al éxito de estos tratamientos. La vaquería continuará tratando la diarrea neonatal de terneros con la tecnología de S-X, así como proporcionará información sobre los animales que se tratarán con la fórmula S-X.

Caso 5 - Granja 4

20 La tecnología de S-X también se ensayó en una instalación de producción de cerdos Hutterite durante la semana del 14 de abril de 2014, cuando cientos de lechones padecían diarrea neonatal. La presencia del virus PED en esta población de cerdos fue confirmada por Newport Labs, Worthington, MN. Según el productor, más de 850 lechones habían muerto en las tres semanas previas, lo cual representa casi 100% de mortalidad en los lechones infectados.

25 El productor fue entrevistado acerca de los resultados de su ensayo con la fórmula para lechones de la tecnología de S-X usada en lechones con diarrea neonatal el 19 de abril, 2014. El productor comentó que el 12 de abril de 2014 más o menos, un lechón de 8 días recibió 6 ml de la fórmula S-X por vía oral a través de una jeringa. Después de 5 horas, el lechón se encontraba mejor y al día siguiente no presentaba señales de diarrea neonatal. Además, el 15 de abril, 10 lechones de 14 días mostraron señales de diarrea neonatal con el síntoma clásico de deposiciones sueltas de color amarillo oscuro. Estos lechones recibieron 4 ml de la disolución S-X por vía oral a través de una jeringa, y dentro de 24 horas, cada animal estaba completamente "seco". El productor también indicó que, a partir de su experiencia previa con la enfermedad, habría esperado muchas muertes.

30 Además, el 19 de abril más o menos, 10 lechones de 3 días mostraron señales de diarrea neonatal y recibieron 2 ml de la disolución S-X a través de una jeringa. Todos estos lechones seguían vivos después de varias semanas. Se administró otro tratamiento a 30 lechones de 3 días que mostraron señales de diarrea neonatal. Estos 30 lechones recibieron 3 ml de la disolución S-X y todos los lechones siguieron vivos. Si el tratamiento no hubiera sido administrado, el productor hubiese esperado la muerte de casi todos estos animales, basándose en su experiencia previa. El productor también administró Tylan 40-50 a cada uno de los lechones de 3 días en el estudio cuyos tratamientos se realizaron el 15 y 19 de abril. Tylan es un antibiótico que se usa para tratar la neumonía. El productor piensa que Tylan-40, junto con el tratamiento con S-X, fueron los responsables de la supervivencia de estos animales jóvenes; sin embargo, según los expertos en la técnica, los antibióticos en general no son eficaces frente a infecciones víricas y bacterianas intestinales. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, en este caso, es posible que Tylan-40 no produjese ningún efecto sobre la supervivencia de los lechones.

45 Desde que usó la disolución S-X para tratar a sus lechones, el productor no ha perdido a ningún animal debido a la diarrea neonatal. Además, el 27 de mayo de 2014, las muestras de los lechones que se habían enviado a Norwalk Labs después de la adición de los tratamientos con S-X confirmaron que PED ya no estaba presente. Este descubrimiento indica que la disolución S-X tiene éxito para tratar la diarrea neonatal en lechones de la colonia Harlowton. Además, la desaparición del virus PED del área puede atribuirse a los tratamientos con S-X, puesto que todos los lechones con diarrea neonatal fueron tratados con la tecnología y se recuperaron.

Caso 6 - Granja 5

50 La granja 5, cerca de la frontera canadiense, participó en los tratamientos con S-X de la diarrea neonatal en su ganado vacuno para carne. Las temperaturas durante la temporada de pariciones fueron particularmente bajas durante el último invierno, con vientos fuertes y mucha nieve. La disolución S-X se proporcionó a principios de abril, y la primera fecha de tratamiento fue el 6 de abril, 2014. Se trataron veintiún animales solo con la disolución S-X para trastornos de diarrea neonatal, y los animales se trataron mediante administración con sonda de alimentación de 50 ml de disolución S-X. Después de 24 horas, 18 de los terneros que habían sido tratados con la disolución S-X se recuperaron de la diarrea neonatal; sin embargo, 3 animales necesitaron la readministración de la dosificación. Estos animales pronto se recuperaron después del tratamiento. De los 21 animales tratados, 8 mostraron síntomas de neumonía y recibieron Nufloor. La recuperación de los animales tratados con S-X no estaba relacionada con el

tratamiento por la aparición de neumonía. La última fecha de tratamiento fue el 18 de abril, 2014. En total, aproximadamente 85% de los animales tratados con la tecnología de S-X se recuperaron con una dosis de la disolución. Estos resultados demuestran que la tecnología de S-X requiere menos tiempo y es más eficaz que las formas tradicionales de tratamiento de animales con diarrea neonatal.

5 Caso 7 - Granja 6

La granja 6 es una instalación lechera que usó la tecnología de S-X como tratamiento de la diarrea neonatal a mediados de abril de 2014. La vaquería tiene aproximadamente 100 cabezas de ganado lechero Holstein con diversos otros animales, incluyendo ganado vacuno para carne. La incidencia de la diarrea neonatal en la granja es particularmente elevada, y la mayoría de los animales contraen diarrea neonatal al poco de nacer. Se suministró la fórmula S-X a la vaquería y se administró a terneros para carne y a terneros Holstein en dosis de 50 ml a través de jeringas orales.

Los tratamientos iniciales de la fórmula S-X se administraron a 8 terneros en dosis de 50 ml a través de una jeringa, de los cuales 7 habían mostrado la diarrea neonatal de color amarillo cremoso típica, y 1 ternero (número 80) presentaba una diarrea neonatal pastosa blanca que se transformó en diarrea neonatal acuosa después de dos días. Este trastorno del ternero es típico de la diarrea neonatal de la leche. Este ternero concreto se trató con S-X mucho después de que sus síntomas se hubiesen desarrollado, y murió 4 días después. Se sospecha que la diarrea neonatal de este ternero concreto fue provocada nutricionalmente debido a las características de la diarrea, en cuyo caso la tecnología de S-X no habría sido eficaz. La mayoría de los animales que fueron tratados con la disolución S-X se recuperaron y estuvieron completamente bien dentro de 24 horas; sin embargo, un ternero Holstein tardó 48 horas en recuperarse totalmente. Además, se advirtió que un ternero para carne (número 34 como control sin tratar) en la granja padecía diarrea neonatal y no recibió una dosis de la disolución S-X junto con los otros animales, y murió dentro de dos semanas. La figura 23 son una serie de imágenes que muestran a un ternero tratado con S-X antes y después del tratamiento.

Caso 8 - Granja 7

Los dueños de la granja 7 estaban interesados en utilizar la tecnología de S-X a principios de primavera de 2014 para tratar a los terneros recién nacidos que desarrollaron diarrea neonatal. Se suministró la fórmula S-X a los dueños y, a lo largo de varias semanas, los terneros que mostraban señales de diarrea neonatal se trataron inmediatamente en la zona de pasto con 50 ml de la disolución S-X en dos dosis de 25 ml en una jeringa oral. Se trataron al menos 15 terneros con la disolución S-X y todos, excepto uno, se recuperaron en 24 h. El ternero que no se recuperó en 24 horas presentaba heces blancas que podían atribuirse a la "diarrea neonatal de la leche". Este ternero también padecía neumonía, por lo cual también se trató con Nuflor y una bebida. También se le administraron dos tratamientos adicionales de la disolución S-X. El ternero se recuperó de la diarrea neonatal y ahora está en condiciones normales. El dueño advirtió que, la mayoría de las veces, los terneros se recuperaban dentro de 3 a 4 horas después de los tratamientos con la disolución S-X. El dueño también comentó que reconoció la mejora porque los terneros dejaron de "rechinar los dientes" y aumentaron su actividad en general. El dueño comentó que el método de jeringa oral del tratamiento con la disolución S-X facilitaba la administración de dosis a terneros de 45,36 kg (100 libras). Estos resultados demuestran que la administración de S-X puede realizarse usando el método de sonda de alimentación o de jeringa.

Caso 9 - Granja 8

Los experimentos con terneros para carne con diarrea neonatal se realizaron en la granja 8 a una altura de 1359 metros (4.459 pies) desde el 4 de mayo de 2013 hasta el 21 de mayo de 2014, concentrándose en la primavera de 2013 y el invierno y la primavera de 2014. En esta granja nacieron 300 terneros en primavera y 300 en otoño. Se trataron 142 terneros diferentes con una disolución S-X o una combinación de disolución S-X y otras medicaciones. La fórmula S-X inicial se usó a lo largo de enero de 2014, tras lo cual se empleó una fórmula mejorada del tratamiento de la diarrea neonatal con la tecnología de S-X. Las temperaturas variaron de -29 °C (-20 °F) hasta 10 °C (50 °F) en los meses de febrero y marzo. Se observaron vientos y nieve significativos durante este periodo de tiempo, registrándose unos fuertes cambios de temperatura.

Un gran número de terneros mostraba señales clínicas de diarrea neonatal (orejas gachas, ojos hinchados y abundante diarrea). Estos terneros recibieron 50 ml de la disolución S-X a través de un sistema de sonda de alimentación y se comprobaron aproximadamente seis horas después para determinar si se estaban recuperando o si era necesaria la readministración del fármaco. De los 243 terneros tratados, 36 recibieron solo la disolución para la primera o la segunda dosis o la disolución más un suplemento de vitaminas, mientras que al resto se le administraron antibióticos convencionales junto con el tratamiento de S-X para la diarrea neonatal. Doce de los tratamientos solo con S-X se administraron como una segunda o tercera dosis dentro del mismo día. En total, 243 tratamientos incluyeron la disolución S-X y 29 de estos fueron tratados 2 o 3 veces. El número de terneros individuales totales que fueron tratados con ambas fórmulas fue de 142. Los fármacos que se administraron generalmente junto con el tratamiento de S-X incluyeron: Excede (trata infecciones respiratorias), probióticos, Toxiban (absorbe las toxinas con carbón), Noromycin LA (antibiótico que se usa para el ojo rosa, la podredumbre del pie y otras infecciones), multivitaminas, Inforce 3 (una vacuna respiratoria de tres vías), Draxxin (antibiótico para el

ojo rosa, la podredumbre del pie o enfermedades respiratorias), y sulfacomprimidos (sulfonamidas para tratamientos antibacterianos).

5 Los dueños de la granja 8 fueron entrevistados el 3 de marzo de 2014 acerca de sus experiencias con el tratamiento con S-X de la diarrea neonatal. Se advirtió diarrea neonatal por primera vez durante la temporada de pariciones el 27 de febrero de 2014, y se suministraron 40 dosis de 50 ml cada una. Desde el 27 de febrero hasta el 3 de marzo, se trataron 15 terneros con señales de diarrea neonatal con la tecnología de S-X. De estos 15, trece se recuperaron durante la noche después de una dosis, mientras que 2 requirieron una segunda dosis y se recuperaron durante la noche, sin que hubiera mortalidad en ninguno de los casos. La mitad de los terneros se trataron en la zona de pasto, mientras que solo 6 se metieron en el establo. El tratamiento normal para la diarrea neonatal incluye electrolitos, administración IV de fluidos, y algunos antibióticos, tales como tetraciclina.

10 Los productores observaron que algunos de los terneros tratados tenían neumonía y se administraron otras medicaciones; sin embargo, también se advirtió que los tratamientos con S-X eran mucho mejores que las otras medicaciones y acreditaban su uso con una recuperación rápida y total. Se calculó que sin S-X, una tercera parte o más de los terneros con diarrea neonatal habrían muerto. Otras observaciones del tratamiento con S-X fueron que era fácil de usar y de transportar cuando se está trabajando con el rebaño, que era una opción de tratamiento rápida y que no es necesario un tratamiento con antibióticos si la diarrea neonatal se detecta con la suficiente rapidez. La figura 24 son una serie de imágenes que muestran a un ternero tratado con S-X antes y después del tratamiento.

15 La tabla 7 muestra los tratamientos de S-X administrados en las granjas 3, 5 y 8 sin más medicaciones administradas más que suplementos de vitaminas.

20 Tabla 7. Tratamientos de S-X sin otras medicaciones, S-3 según la invención

Granja	S-X	Fecha	Ternero	n.º de tratamientos
8	S-1	4/5/2013	Y122	1º
8	S-1	4/5/2013	Y306B	1º
8	S-1	6/5/2013	Y350a	1º
8	S-3	24/2/2104	Y3742	1º
8	S-3*	27/2/2104	Y26262	1º
8	S-3*	27/2/2104	Y321	1º
8	S-3*	27/2/2104	Y383	1º
8	S-3	2/3/2104	R18361	1º
8	S-3	2/3/2104	Y3730	1º
8	S-3	2/3/2104	Y387	1º
8	S-3	3/3/2104	G032	1º
8	S-3	3/3/2104	Y166461	1º
8	S-3	3/3/2104	Y402	1º
8	S-3	4/3/2104	G03	2º
8	S-3	4/3/2104	G3731	1º
8	S-3	4/3/2104	R1396	1º
8	S-3	4/3/2104	Y29092	1º
8	S-3	5/3/2104	G309	1º
8	S-3	5/3/2104	Y29902	1º
8	S-3	5/3/2104	Y3311	1º
8	S-3	5/3/2104	Y8A20	1º
8	S-3	6/3/2104	R2451	2º

ES 2 769 893 T3

8	S-3	6/3/2104	Y163391	1º
8	S-3	9/3/2104	Y2014	2º
8	S-3	12/3/2104	R215	1º
8	S-3	15/3/2104	Y16629	3º
8	S-3	15/3/2104	Y2014	2º
8	S-3	16/3/2104	R26861	2º
8	S-3	16/3/2104	Y2062	2º
8	S-3	16/3/2104	Y3619	1º
8	S-3	17/3/2104	Y20060	2º
8	S-3	18/3/2104	Y3630	2º
8	S-3	18/3/2104	Y80842	2º
8	S-3	27/3/2104	R616	2º
8	S-3	27/3/2104	Y411	2º
8	S-3	30/3/2104	R616	1º
5	S3	6/4/2014	516	1º
5	S3	6/4/2014	1122	1º
5	S3	6/4/2014	1255	1º
5	S3	6/4/2014	8104	1º
5	S3	6/4/2014	9203	1º
5	S3	7/4/2014	7490	1º
5	S3	8/4/2014	173	1º
5	S3	8/4/2014	1241	1º
5	S3	8/4/2014	5416	1º
5	S3	12/4/2014	1203	2º
5	S3	12/4/2014	2487	1º
5	S3	12/4/2014	2637	1º
5	S3	16/4/2014	1219	2º
5	S3	18/4/2014	711	1º
5	S3	18/4/2014	1000	1º
5	S3	18/4/2014	1636	1º
5	S3	18/4/2014	k23	1º
3	S-X	18/4/2014	2431	1º

* Recibieron un suplemento multivitamínico.

La tabla 8 muestra todos los tratamientos de S-X administrados, independientemente de que se administrase cualquier otra medicación en las granjas 3, 5 y 8.

Tabla 8. Todos los tratamientos con S-X, S-3 según la invención

ES 2 769 893 T3

Granja	S-X	Fecha	Ternero	Número de tratamientos	Medicación adicional
8	S-1	4/5/2013	Y122	1º	
8	S-1	4/5/2013	Y306B	1º	
8	S-1	6/5/2013	Y350a	1º	
8	S-1	15/5/2013	Y163	1º	Noromycin LA, Toxi Ban, Nas
8	S-1	15/5/2013	Y169	1º	Noromycin LA
8	S-1	15/5/2013	Y3351	1º	Noromycin LA
8	S-1	18/5/2013	R22326	1º	Noromycin LA
8	S-1	18/5/2013	Y169	1º	Noromycin LA
8	S-1	18/5/2013	Y3351	1º	Noromycin LA
8	S-1	29/5/2013	Y2886	1º	Noromycin LA, Toxi Ban
8	S-1	21/10/2013	Y311	1º	Excede 5 cc
8	S-1	23/10/2013	R287	1º	Noromycin LA 5 cc
8	S-1	25/10/2013	R325	1º	Noromycin LA 5 cc
8	S-1	25/10/2013	Y238	1º	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	23/2/2014	G309	1º	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban, sulfa
8	S-3	23/2/2014	Y124981	1º	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban, sulfa
8	S-3	23/2/2014	Y14146	1º	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban, sulfa
8	S-3	23/2/2014	Y17739	1º	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban, sulfa
8	S-3	23/2/2014	Y36192	1º	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban, sulfa
8	S-3	23/2/2014	Y3742	1º	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban, sulfa
8	S-3	23/2/2014	Y405	1º	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban, sulfa
8	S-3	23/2/2014	Y420	1º	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban, sulfa
8	S-3	24/2/2104	Y3742	1º	
8	S-3	27/2/2104	Y26262	1º	Multivitaminas
8	S-3	27/2/2104	Y321	1º	Multivitaminas
8	S-3	27/2/2104	Y336	1º	Noromycin LA, multivitaminas
8	S-3	27/2/2104	Y383	1º	Multivitaminas
8	S-3	27/2/2104	Y422	1º	
8	S-3	2/3/2104	R18361	1º	

ES 2 769 893 T3

8	S-3	2/3/2104	Y3730	1°	
8	S-3	2/3/2104	Y387	1°	
8	S-3	3/3/2104	G032	1°	
8	S-3	3/3/2104	Y166461	2°	
8	S-3	3/3/2104	Y188352	1°	Noromycin LA, Toxi Ban, multivitaminas
8	S-3	3/3/2104	Y402	1°	
8	S-3	4/3/2104	G03	1°	Noromycin LA, Toxi Ban, multivitaminas
8	S-3	4/3/2104	G03	2°	
8	S-3	4/3/2104	G3731	1°	
8	S-3	4/3/2104	R1396	1°	
8	S-3	4/3/2104	Y29092	1°	
8	S-3	4/3/2104	Y389	1°	Noromycin LA, Toxi Ban
8	S-3	5/3/2014	G309	1°	
8	S-3	5/3/2014	Y29902	1°	
8	S-3	5/3/2014	Y3311	1°	
8	S-3	5/3/2014	Y3779	1°	Toxi Ban
8	S-3	5/3/2014	Y8A20	1°	
8	S-3	6/3/2104	G0561	1°	Toxi Ban
8	S-3	6/3/2104	G3731	1°	Noromycin LA, Toxi Ban
8	S-3	6/3/2104	R1396	1°	Noromycin LA, Toxi Ban
8	S-3	6/3/2104	R2451	1°	Noromycin LA, Toxi Ban
8	S-3	6/3/2104	R2451	2°	
8	S-3	6/3/2104	R2456	1°	Toxi Ban
8	S-3	6/3/2104	Y163391	1°	
8	S-3	6/3/2104	Y20251	1°	Toxi Ban
8	S-3	6/3/2104	Y3859	1°	Noromycin LA, Toxi Ban
8	S-3	6/3/2104	Y408	1°	Toxi Ban
8	S-3	7/3/2014	G03	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	7/3/2014	G522	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	7/3/2014	R22519	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	7/3/2014	Y16131	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	7/3/2014	Y1951	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	7/3/2014	Y29961	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	7/3/2014	Y29962	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	7/3/2014	Y3779	1°	Noromycin LA 5 cc

ES 2 769 893 T3

8	S-3	8/3/2014	R2451	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	8/3/2014	Y28869	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	8/3/2014	Y29962	1°	Excede 3 cc
8	S-3	9/3/2104	G235	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	9/3/2104	R13951	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	9/3/2104	Y163391	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	9/3/2104	Y1954	1°	Excede 3 cc
8	S-3	9/3/2104	Y2014	2°	
8	S-3	9/3/2104	Y2014	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	9/3/2104	Y2220	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	9/3/2104	Y3016	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	9/3/2104	Y3042	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	9/3/2104	Y3562	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	10/3/2014	Y166461	1°	Toxi Ban
8	S-3	10/3/2014	Y19541	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	10/3/2014	Y2366	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	10/3/2014	Y28392	1°	Toxi Ban
8	S-3	10/3/2014	Y2985	1°	Noromycin LA
8	S-3	10/3/2014	Y3630	1°	Noromycin LA
8	S-3	10/3/2014	Y365	1°	Noromycin LA
8	S-3	10/3/2014	Y401	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	11/3/2014	R2391	1°	Noromycin LA
8	S-3	11/3/2014	Y2014	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	11/3/2014	Y2162	1°	Excede 3 cc
8	S-3	11/3/2014	Y2985	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	11/3/2014	Y2985	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	11/3/2014	Y3042	1°	Excede 3 cc
8	S-3	12/3/2104	R215	1°	
8	S-3	12/3/2104	Y19349	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	12/3/2104	Y2116	1°	Excede
8	S-3	12/3/2104	Y2366	1°	Excede 5 cc
8	S-3	12/3/2104	Y2985	1°	Excede
8	S-3	12/3/2104	Y29962	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	12/3/2104	Y3630	1°	Excede 5 cc
8	S-3	12/3/2104	Y64659	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	13/3/2014	G3731	1°	Noromycin LA 5 cc

ES 2 769 893 T3

8	S-3	13/3/2014	R215	1°	Excede 5 cc, Toxi Ban
8	S-3	13/3/2014	Y16629	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	13/3/2014	Y19349	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	13/3/2014	Y28392	1°	Excede
8	S-3	14/3/2014	Y1106	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	14/3/2014	Y16629	1°	Excede 3 cc
8	S-3	14/3/2014	Y2951	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	15/3/2014	R26861	1°	Noromycin LA
8	S-3	15/3/2014	R2902	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	15/3/2014	Y16629	3°	
8	S-3	15/3/2014	Y2014	1°	Noromycin LA
8	S-3	15/3/2014	Y2014	2°	
8	S-3	15/3/2014	Y2366	1°	EX
8	S-3	15/3/2014	Y28392	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	15/3/2014	Y2985	1°	Draxxen
8	S-3	15/3/2014	Y3S6	1°	Noromycin LA
8	S-3	15/3/2014	Y3619	1°	Noromycin LA
8	S-3	16/3/2104	R21441	1°	Noromycin LA 5 cc, Toxi Ban
8	S-3	16/3/2104	R26861	2°	
8	S-3	16/3/2104	Y2062	2°	
8	S-3	16/3/2104	Y2062	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	16/3/2104	Y2382	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	16/3/2104	Y264	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	16/3/2104	Y3619	1°	
8	S-3	17/3/2104	G235	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	G3731	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	R13951	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	R317	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	Y20060	2°	
8	S-3	17/3/2104	Y20060	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	Y2116	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	Y2382	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	Y264	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	Y2951	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	17/3/2104	Y3630	1°	Noromycin LA 5 cc

ES 2 769 893 T3

8	S-3	17/3/2104	Y80842	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	18/3/2104	G34491	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	18/3/2104	G4335	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	18/3/2104	Y3630	2°	
8	S-3	18/3/2104	Y64659	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	18/3/2104	Y80842	2°	
8	S-3	19/3/2014	R215	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	19/3/2014	R29092	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	19/3/2014	Y2382	3°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	19/3/2014	Y2951	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	19/3/2014	Y2985	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	19/3/2014	Y3619	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	19/3/2014	Y64659	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	19/3/2014	Y80842	3°	Excede 3 cc
8	S-3	20/3/2014	Y2951	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	20/3/2014	Y411	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	20/3/2014	Y80B42	1°	Excede 3 cc
8	S-3	22/3/2014	R616	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	22/3/2014	Y411	3°	Excede 3 cc
8	S-3	23/3/2014	R20016	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	23/3/2014	R616	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	23/3/2014	Y2382	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	23/3/2014	Y2951	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	24/3/2014	R1836	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	24/3/2014	R29092	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	24/3/2014	R616	3°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	24/3/2014	Y10651	1°	Draxxen, Inforce 3
8	S-3	24/3/2014	Y321	1°	Draxxen, Inforce 3
8	S-3	24/3/2014	Y3619	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	24/3/2014	Y411	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	25/3/2014	R1836	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	25/3/2014	R290	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	25/3/2014	R29092	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	25/3/2014	Y29852	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	25/3/2014	Y3619	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	25/3/2014	Y368	1°	Draxxen, sulfa

ES 2 769 893 T3

8	S-3*	25/3/2014	Y3742	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	25/3/2014	Y3862	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	G1310	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	R239	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	R239	2°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	R3000	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	R3041	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	Y1606	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	Y20142	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	26/3/2014	Y259	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	26/3/2014	Y28869	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	Y29062	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	Y30162	2°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	Y30162	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	26/3/2014	Y331	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	26/3/2014	Y3619	3°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	27/3/2104	R1836	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	27/3/2104	R616	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	27/3/2104	R616	2°	
8	S-3	27/3/2104	R8461	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	27/3/2104	Y411	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	27/3/2104	Y411	1°	
8	S-3*	28/3/2014	Y1361	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	28/3/2014	Y1606	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	28/3/2014	Y266962	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	29/3/2014	G1310	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	29/3/2014	R2028	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	29/3/2014	Y16932	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	29/3/2014	Y18835	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	29/3/2014	Y3590	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	30/3/2104	G3060	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	30/3/2104	R616	1°	
8	S-3*	30/3/2104	Y166461	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	30/3/2104	Y2116	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	30/3/2104	Y259	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	31/3/2014	G131	1°	Draxxen, sulfa

ES 2 769 893 T3

8	S-3*	31/3/2014	G5052	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	31/3/2014	G57	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	31/3/2014	R3691	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	31/3/2014	Y1124	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	31/3/2014	Y119	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	31/3/2014	Y26682	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	31/3/2014	Y2839	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	31/3/2014	Y36192	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	31/3/2014	Y365	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	31/3/2014	Y384	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	31/3/2014	Y386	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	31/3/2014	Y424	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	1/4/2014	B1395	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	1/4/2014	G5052	2°	Draxxen, sulfa
8	S-3	1/4/2014	Y1126	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	1/4/2014	Y2446	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	1/4/2014	Y266962	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	1/4/2014	Y29852	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	1/4/2014	Y3279	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	1/4/2014	Y3412	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	1/4/2014	Y43	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	1/4/2014	Y592	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	2/4/2014	Y17739	1°	Draxxen
8	S-3*	2/4/2014	Y26262	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3	2/4/2014	Y29852	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3*	2/4/2014	Y399	1°	Draxxen, sulfa
8	S-3*	3/4/2014	Y121242	1°	Draxxen
8	S-3*	3/4/2014	Y16936	1°	Draxxen
8	S-3*	3/4/2014	Y411	1°	Draxxen
8	S-3	21/5/2014	G34491	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	21/5/2014	R1836	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	21/5/2014	R20016	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	21/5/2014	R2616	1°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	21/5/2014	R29092	1°	Excede 3 cc
8	S-3	21/5/2014	Y411	2°	Noromycin LA 5 cc
8	S-3	21/5/2014	Y5861	1°	Noromycin LA 5 cc

ES 2 769 893 T3

5	S3	6/4/2014	8104	1°	
5	S3	6/4/2014	9203	1°	
5	S3	6/4/2014	1122	1°	
5	S3	6/4/2014	516	1°	
5	S3	6/4/2014	1255	1°	
5	S3	7/4/2014	1255	2°	Nuflor
5	S3	7/4/2014	7490	1°	
5	S3	8/4/2014	1203	1°	Nuflor
5	S3	8/4/2014	1241	1°	
5	S3	8/4/2014	5416	1°	
5	S3	8/4/2014	173	1°	
5	S3	12/4/2014	2363	1°	Nuflor
5	S3	12/4/2014	9203	1°	Nuflor
5	S3	12/4/2014	1203	2°	
5	S3	12/4/2014	2637	1°	
5	S3	12/4/2014	2487	1°	
5	S3	12/4/2014	2763	1°	Nuflor
5	S3	14/4/2014	1219	1°	Nuflor
5	S3	16/4/2014	1219	2°	
5	S3	18/4/2014	1000	1°	
5	S3	18/4/2014	1636	1°	
5	S3	18/4/2014	k23	1°	
5	S3	18/4/2014	711	1°	
3	S-X	8/4/2014	2012	1°	Bebida
3	S-X	18/4/2014	Y273	1°	Bebida, Baytril
3	S-X	18/4/2014	2431	1°	
3	S-X	18/4/2014	Y177	1°	Baytril
3	S-X	22/4/2014	Y82	1°	Bebida, Baytril
3	S-X	23/4/2014	Y273	1°	Suprio
3	S-X	24/4/2014	2811	1°	Bebida, Nuflor
3	S-X	24/4/2014	wl	1°	Bebida, Nuflor, sulfa
3	S-X	24/4/2014	1100	1°	Baytril
3	S-X	25/4/2014	841	1°	Bebida
3	S-X	25/4/2014	longhorn	1°	Bebida
3	S-X	25/4/2014	452	1°	Bebida, Nuflor

* indica un tratamiento con S-X a través de los conductos nasales (2 cc).

Ejemplo 12 (según la invención): Tratamiento de la mastitis animal

El problema de la mastitis en las glándulas mamarias en animales generalmente es provocado por infecciones de *E. coli* o *Staphylococcus aureus* y otros patógenos bacterianos. La teta se inflama y, en último término, el trastorno puede extenderse a todos los demás sectores de la glándula mamaria. La producción de leche cesa. Si no se trata, el animal puede morir. La mayoría de los tratamientos de antibióticos son caros e ineficaces. En los últimos tres meses, una cordera y dos vacas lecheras que padecían mastitis se trataron con 15 ml por teta de la disolución de tratamiento de la mastitis. La figura 25A muestra una teta de una oveja que padece mastitis. El animal tratado tenía la enfermedad bien desarrollada y no murió, sino que sigue estando sano. La glándula mamaria ha cesado de funcionar. La fórmula S-3 se administró a través de una jeringa (figura 25B). Las dos vacas que padecían mastitis se encontraban en estadios más tempranos de esta enfermedad. Cada una se trató con 15 ml por teta infectada, y se advirtió una recuperación total dentro de 24 h.

Ejemplo de formulación y tratamiento de la mastitis de animales de granja

Por 90 ml de agua:

5 mg de cremophor u otro tensioactivo apropiado

15 0,7 ml de ácido propanoico y 0,2 ml de hexanoatos de isoamilo

La formulación se agitó bien y se administraron a una vaca hasta 15 ml por teta con una jeringa. El cremophor actúa para llevar a disolución los ingredientes de la formulación S-3.

Ejemplo 13: Ensayo de MIC de las formulaciones S-3 (según la invención) y S-4

Protocolo de MIC para ensayar S-3 (según la invención) y S-4

20 Cultivos bacterianos turbios cultivados en el medio de caldo de cultivo nutriente apropiado se ajustaron a $DO_{650} = 0,4$ y posteriormente se diluyeron 1:100 en caldo de cultivos, lo cual representa una concentración de 1×10^6 CFU/ml. Se añadieron 50 μ l de este cultivo a cada pocillo excepto el control negativo, al que se añadieron 50 μ l de caldo de cultivo. La cantidad final de bacterias en cada pocillo fue de 5×10^6 CFU.

25 Se añadieron 20 μ l de disolución madre de antibiótico B-23 a 480 μ l de caldo de cultivo. Se diluyeron 250 μ l de esta disolución hasta 1:2. Esto se repitió dos veces para formar cuatro disoluciones de antibiótico progresivamente diluidas. Las diluciones se realizaron de tal modo que las concentraciones finales del antibiótico en los pocillos apropiados eran iguales al 1%, 0,5%, 0,25% y 0,125% de la disolución madre de antibiótico B-23.

30 Se usó una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se cultivaron 6 tratamientos en total: al 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,061%, 0,03% y 0% de antibiótico con inóculo bacteriano, y sin inóculo bacteriano. Cada tratamiento se cultivó por triplicado.

Se añadió caldo de cultivo a cada pocillo para alcanzar un volumen final de 200 μ l. En los pocillos sin inóculo bacteriano ni disolución de antibiótico, se añadieron 50 μ l más de caldo de cultivo.

Las placas de MIC se incubaron en las condiciones de crecimiento apropiadas hasta los momentos registrados en las tablas de resultados. Se eligieron los criterios de valoración cuando el pocillo de control positivo se volvía turbio.

35 El punto de MIC se consideró la concentración más baja en la cual no existía un crecimiento evidente.

Resultados

Las MIC fueron las siguientes para los siguientes organismos:

Bacillus subtilis: 0,06125%

Vibrio cholerae: 0,06125%

40 *Pseudomonas aeruginosa*: 0,125%

Salmonella enterica serovar *Typhimurium*: 0,06125%

Escherichia coli: 0,125%

Staphylococcus aureus resistente a meticilina: 0,06125%

45 Para otros ensayos de MIC - Se usó caldo de cultivo de dextrosa y patata en lugar de caldo de cultivo de nutrientes, y los ensayos se realizaron de la misma manera. Los resultados fueron:

Erwinia amylovora: 0,0612%

Lactobacillus sp.: 0,0625%

Erwinia carotovora: 0,125%

Los resultados demuestran que S-3 y S-4 son útiles para el tratamiento de enfermedades en plantas, animales y seres humanos provocados por microorganismos. Estas enfermedades incluyen enfermedades de las plantas provocadas por *Erwinia* y los problemas en la fermentación de cereales para producir etanol provocados por biopelículas de *Lactobacillus* spp. producidas por *Pseudomonas*. Otras enfermedades incluyen afecciones alimentarias provocadas por *Salmonella*, *E. coli* y enfermedades importantes generales provocadas por MRSA.

Ejemplo 14 (según la invención): Tratamientos de frambuesas

Los resultados descritos en la presente demuestran que la tecnología de S-X es útil para la conservación de la fruta y las verduras durante el transporte y el almacenamiento. La fórmula S-3 se mezcló para formar dos formulaciones: 1 ml de S-3 por 10 g de bentonita (la mezcla 1:10); 1 ml de S-3 con 20 g de bentonita (la mezcla 1:20) u otro vehículo. Se colocó 1 gramo de la mezcla en una copa pequeña de plástico en presencia de frambuesas compradas en una tienda. Los materiales se colocaron en una caja de plástico transparente pequeña que se selló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 semana, seguido del examen para la presencia de hongos contaminantes. Los resultados demuestran que la flora normal de la fruta provoca su descomposición con rapidez después de 1 semana a temperatura ambiente (figura 26A). Sin embargo, el uso de la mezcla 1:10 no provocó descomposición (figura 26B). Sin embargo, la mezcla 1:20 no tuvo una actuación tan buena como la 1:10, puesto que al menos 1 frambuesa se descompuso. No obstante, la mezcla 1:20 fue útil para evitar la degradación de las frambuesas, y las frambuesas tratadas eran comestibles. Se realizó un experimento similar con uvas Thompson Delicious compradas en una tienda y los resultados fueron similares, observándose que las uvas control se descompusieron, mientras que las uvas tratadas no se descompusieron. Las uvas también fueron comestibles, ya que 4 personas las comieron y proporcionaron una evaluación de su aceptabilidad.

Ejemplo 15 (según la invención): Tratamiento de la intoxicación alimentaria y/o gripe estomacal en seres humanos usando S-X

Los síntomas y los trastornos de la intoxicación alimentaria y/o la gripe estomacal en seres humanos son similares a los que aparecen en animales que padecen diarrea neonatal. Por ejemplo, los síntomas posibles incluyen: espasmos abdominales, diarrea (puede ser sanguinolenta), fiebre y escalofríos, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y debilidad (puede ser grave). La mayoría de las personas simplemente atraviesan la experiencia (12-48 h) haciendo lo que pueden para descansar y beber fluidos de reemplazamiento y minerales que se pierden por la diarrea y los vómitos. Parece que no existe ningún producto disponible que proporcione un alivio instantáneo.

Sin embargo, en diez voluntarios que padecían uno o más de estos síntomas, al menos 10-15 ml de una fórmula de S-3 al 1% fueron tomados por vía oral cuando aparecieron los síntomas o dentro de unas pocas horas después de la aparición de los síntomas. En todos los casos, los pacientes indicaron que se sentían mejor dentro de una a dos horas después del tratamiento. La fiebre, el dolor de estómago, la diarrea y los vómitos cesaron, y los pacientes se recuperaron totalmente. Todos los pacientes eran adultos, blancos y hombres y mujeres. Sin embargo, un paciente indicó que no notó diferencias en el trastorno estomacal después de tomar una dosis de 10 ml de la fórmula S-3 al 1%. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se sospecha que el paciente estaba sufriendo una infección estomacal inducida por virus que no habría respondido al tratamiento con S-X. No obstante, el hecho de que 90% de las personas tratadas presentaron esta recuperación inmediata y completa, combinado con todos los estudios en animales sobre la diarrea neonatal, apoya la hipótesis de que S-3 es útil para tratar a seres humanos que padecen gripe estomacal e intoxicación estomacal provocadas por bacterias. Esta hipótesis también se ve apoyada por los impresionantes valores de MIC de S-3 contra *E. coli* y *S. aureus*, que son dos agentes causales conocidos de la intoxicación alimentaria en seres humanos (ejemplo 13).

Ejemplo 16 (según la invención): Mastitis en vacas lecheras y la tecnología S-X

45 Tratamiento:

Se mezcla a fondo una fórmula que contenía 2% de la formulación S-3 en presencia de 5 mg de cremophor (un solubilizante no iónico) en agua pura y se emplea como agente de tratamiento. Se trataron ocho vacas lecheras que padecían mastitis preclínica a subclínica con 12 ml de la fórmula por teta. En siete casos, el tratamiento se repitió a lo largo de un día. En todos los casos, los animales se recuperaron totalmente al día siguiente. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, es probable que la recuperación de los animales fuera debida al hecho de que las causas bacterianas comunes de la mastitis, tales como *E. coli* y *S. aureus*, son organismos que son extremadamente sensibles a las formulaciones S-X descritas en la presente (véase el ejemplo 13.)

Ejemplo 17 (según la invención): Ensayos con detergentes de S-3

55 Varios detergentes que se obtuvieron pidiendo muestras se ensayaron con la disolución S-3 para determinar su eficacia sobre superficies que suelen estar cubiertas por una diversidad de patógenos. Estas superficies incluyen el suelo de un laboratorio y el suelo de un cuarto de baño de mujeres, la taza del inodoro y el mango de la puerta. Para

5 el ensayo del suelo, se vertieron aproximadamente 5 ml de cada una de las disoluciones de detergentes (con 1 ml de S-3 por 100 ml de agua desionizada) sobre diferentes secciones del suelo y se secaron con un pañuelo de papel. Cuando la sección del suelo se secó, se limpió con un Kimwipe y este después se frotó sobre la superficie de una placa Petri con caldo de cultivo de dextrosa y patata. Para el ensayo de la taza del inodoro, un pañuelo de papel se humedeció con las disoluciones de detergentes y se limpió una sección de la superficie. De nuevo se usaron Kimwipes sobre la superficie secada y después se frotaron en estrías a través de una placa con caldo de cultivo de dextrosa y patata. El procedimiento para el mango de la puerta fue el mismo que para la taza, excepto que solo se ensayó uno de los detergentes junto con un control. Los resultados se muestran en las siguientes tablas 9 y 10.

Tabla 9. Resultados del suelo del laboratorio

		Experimento 1	Experimento 2
	Cantidad de detergente	Número de colonias	Número de colonias
Control		22	23
Sucragel CF	1 mililitro	1	0
Chemoxide CAW	2 mililitros	1	2
BioSoft D40	0,5 mililitros	0	3
Lathanol LAL	1 gramo	2	1
BioTerge AS-40	1 mililitro	1	2
Nacconol 90G	1 gramo	1	4
Cocoato de potasio	2 mililitros	1	1

10

La tabla 9 muestra el número de colonias bacterianas o fúngicas que crecieron en las placas de caldo de cultivo de dextrosa y patata que surgieron de las estrías procedentes de las muestras limpiadas con los diversos detergentes o solo con Kimwipe como control después de 48 horas. Se usó un mililitro de S-3 por 100 mililitros de agua desionizada.

15

Tabla 10. Ensayo de detergentes en el cuarto de baño de mujeres

	Cantidad de detergente	Colonias del suelo	Colonias de la taza del inodoro	Colonias del mango de la puerta
Control		12	6	2
Sucragel CF	1 mililitro	1	0	0
Chemoxide CAW	2 mililitros	0	1	
BioSoft D40	0,5 mililitros	0	0	
Lathanol LAL	1 gramo	2	16	
BioTerge AS-40	1 mililitro	4	21	
Cocoato de potasio	1 gramo	0	4	
Nacconol 90G	2 mililitros	1	0	

20

La tabla 10 muestra los resultados del ensayo en el cuarto de baño de mujeres sobre una diversidad de superficies (suelo, taza del inodoro y mango de la puerta), y el número de colonias bacterianas o fúngicas limpiadas de las superficies con un Kimwipe que crecieron después de 48 horas en una placa de caldo de cultivo de dextrosa y patata.

Ejemplo 17 (según la invención): Experimento con *Verticillium*

Se inocularon 30 semillas de guisante con *Verticillium* sp. después de colocarse en una placa Petri en donde se estaba cultivando el hongo. Las semillas se hicieron rodar y después se rasparon muestras del hongo y se colocaron

5 con las semillas de guisante en una placa Petri que se selló con parapelícula y se dejó en reposo durante tres días. Después de los tres días, las placas de agar de dextrosa y patata con copas esterilizadas colocadas en su centro se rellenaron con 50 microlitros de S-3, con 20 microlitros de S-3, o se dejaron vacías como control. Diez semillas de guisante del grupo no inoculado se colocaron en cada una de las tres placas Petri que contenían agar de dextrosa y patata y las copas rellenas o no rellenas. Los guisantes se dejaron dos días en reposo y después se comprobaron para el crecimiento fúngico y la germinación. Los resultados del experimento se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Semillas de guisante inoculadas con *Verticillium*

Tratamiento	Porcentaje con crecimiento fúngico
Control	100
20 microlitros de S-3	0
50 microlitros de S-3	0

Porcentaje de semillas de guisante inoculadas con *Verticillium* sp. que germinaron y que mostraron crecimiento fúngico después de 48 horas en el control (sin S-3), con 20 microlitros de S-3, y con 50 microlitros de S-3.

10 Ejemplo 17 (según la invención): Experimento con camelina

15 Se tomaron semillas camelina que se sabía que estaban contaminadas con diversos patógenos fúngicos y bacterianos, y se colocaron con S3 para observar si el crecimiento fúngico y bacteriano podía detenerse. Se obtuvieron varias placas de caldo de cultivo de dextrosa y patata junto con copas para la colocación de S-3. Se colocaron aproximadamente 40 semillas en una de las placas y se colocó una copa vacía esterilizada en el centro como grupo control. Esta placa se cerró con parapelícula y se dejó en reposo durante dos días para determinar la germinación y el crecimiento fúngico y bacteriano. Se colocaron más de cien semillas en otra placa Petri con una copa esterilizada rellena de 50 microlitros de S-3. Estas semillas se dejaron en reposo con S-3 en una placa sellada herméticamente con parapelícula durante los siguientes intervalos de horas, en cuyo momento se extrajeron de veinte a treinta semillas y se cultivaron individualmente en una placa: 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, y 48 horas. Para cada uno de los intervalos, las placas se dejaron en reposo durante 48 horas y después se comprobaron para la germinación y el crecimiento de patógenos.

Tabla 12. Germinación de semillas de camelina y crecimiento de patógenos

	Semillas por placa	Porcentaje germinado	Porcentaje con crecimiento de patógenos
Control	39	100	56
50 microlitros de S-3:			
1 hora	29	97	45
2 horas	25	96	40
4 horas	22	100	9

25 La tabla 12 muestra el número del porcentaje de semillas de camelina germinadas y el porcentaje con crecimiento de patógenos que se cultivaron sin S-3 (control), o se cultivaron con 50 microlitros de S-3 a intervalos de horas. Todas las muestras se registraron 48 horas después de introducirse en placas con caldo de cultivo de dextrosa y patata.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Strobel, Gary A. Blatt, Bryan	
	<120> Formulaciones de compuestos orgánicos volátiles que tienen actividad antimicrobiana.	
5	<130> 206054-0001-00-WO.603297	
	<150> US 61/842,362	
	<151>02-07- 2013	
10	<150> US 61/948,902	
	<151> 06-03-2014	
	<160> 10	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 480	
20	<212> ADN	
	<213> Fusarium subglutinans	
	<400> 1	
	aacataccaa ttgttgccctc ggcggatcag cccgctcccg gtaaacggg acgccccgcc	60
	agaggacccc taaactctgt ttctatatgt aacttctgag taaaaccata aataaatcaa	120
	aactttcaac aacggatctc ttggttctgg catcgatgaa gaacgcagca aaatgcgata	180
	agtaattgga attgcagaat tcagtgaatc atcgaatctt tgaacgcaca ttgcgccccg	240
	cagtattctg gcgggcatgc ctgttcgagc gtcatttcaa cctcaagcc cagcttgggtg	300
	ttgggactcg cgagtcaaat cgcgttcccc aaattgattg gcggtcacgt cgagcttcca	360
	tagcgtagta gtaaaaccct cgttactggt aatcgtcgcg gccacgccgt taaaccccaa	420
	cttctgaatg ttgacctcgg atcaggtagg aatacccgct gaacttaagc atatcaataa	480
25	<210> 2	
	<211> 478	
	<212> ADN	
	<213> Fusarium subglutinans	
30	<400> 2	
	cataccaatt gttgcctcgg cggatcagcc cgctcccggg aaaacgggac ggccccgccag	60
	aggaccoccta aactctgttt ctatatgtaa cttctgagta aaaccataaa taaatcaaaa	120
	ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcaaa atgcgataag	180
	taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccccca	240
	gtattctggc gggcatgcct gttcagcgt catttcaacc ctcaagccca gcttgggtgt	300
	gggactcgcg agtcaaatcg cgttcccaa attgattggc ggtcacgctg agcttccata	360
	gcgtagtagt aaaaccctcg ttactggtaa tcgctcgggc cacgccgta aaccccaact	420
	tctgaatggt gacctcggat caggtaggaa taccgctga acttaagcat atcaataa	478
35	<210> 3	
	<211> 488	
	<212> ADN	
	<213> Fusarium sp	

ES 2 769 893 T3

	<400> 3		
	cttaatgttg cctcggcggg tcagcccgcg ccccgtaaaa cgggacggcc cgccagagga	60	
	cccaaactct aatgtttctt attgtaactt ctgagtaaaa caaacaata aatcaaaact	120	
	ttcaacaacg gatctcttgg ttctggcatc gatgaagaac gcagcaaat gcgataagta	180	
	atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa cgcacattgc gcccgctggt	240	
	attccggcgg gcatgcctgt tcgagcgtca tttcaaccct caagcccccg ggtttggtgt	300	
	tggggatcgg ctctgccttc tggcgggtgcc gccccgaaa tacattggcg gtctcgtcgc	360	
	agcctccatt gcgtagtagc taacacctcg caactggaac gcggcgcggc catgccgtaa	420	
	aacccaact tctgaatggt gacctcggat caggtaggaa taccgctga acttaagcat	480	
	atcaatag	488	
5	<210> 4 <211> 477 <212> ADN <213> Fusarium culmorum		
10	<400> 4		
	cataccttat gttgcctcgg cggatcagcc cgcgccccgt aaaaaggac ggcccgcgcg	60	
	aggaacccta aactctgttt ttagtggaac ttctgagtat aaaaaacaaa taaatcaaaa	120	
	ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcaaa atgcgataag	180	
	taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccgcca	240	
	gtattctggc gggcatgcct gttcgcgcgt catttcaacc ctcaagccca gcttggtggt	300	
	gggagctgca gtccctgctgc actccccaaa tacattggcg gtcacgtcga gttccatag	360	
	cgtagtaatt tacatatcgt tactgtaat cgtcgcggcc acgcccgtta accccaactt	420	
	ctgaatggtg acctcggatc aggtaggaa acccgctgaa cttaagcata tcaatag	477	
15	<210> 5 <211> 485 <212> ADN <213> Fusarium avenaceum		
20	<400> 5		
	cagaagttgg ggttttacgg catggccgcg ccgcgttcca gttgcgaggt gttagctact	60	
	acgcaatgga ggctgcagcg agaccgcaa tgtatttcgg gggcggcacc gccagaaggc	120	
	agagccgatc cccaacacca aaccggggg cttgaggggt gaaatgacgc tcgaacaggc	180	
	atgcccgccg gaataccagc gggcgcaatg tgcgttcaaa gattc gatga ttactgaat	240	
	tctgcaattc acattactta tcgcattttg ctgcgttctt catcgatgcc agaaccaaga	300	
	gatccggtgt tgaaagtttt gatttatttg tttgttttac tcagaagtta caataagaaa	360	
	cattagagtt tgggtcctct gggggcccg cccgttttac ggggcgcggg ctgatccgcc	420	
	gaggcaacat taaggtatgt tcacaggggt ttgggagttg taaactcggc aatgatccct	480	
	ccgca	485	
25	<210> 6 <211> 469 <212> ADN		

ES 2 769 893 T3

<213> Fusarium subglutinans

<400> 6

cagaagttgg ggtttaacgg cgtggccgcg acgattacca gtaacgaggg ttttactact 60
 acgctatgga agctcgacgt gaccgccaat caatttgggg aacgcgattt gactcgcgag 120
 tcccaacacc aagctgggct tgagggttga aatgacgctc gaacaggcat gcccgccaga 180
 atactggcgg gcgcaatgtg cgttcaaaga ttcgatgatt cactgaattc tgcaattcac 240
 attacttata gcattttgct gcgtttctca tcgatgccag aaccaagaga tccgttggtg 300
 aaagttttga tttatttatg gttttactca gaagttacat atagaaacag agtttagggg 360
 tcctctggcg ggcctgccg ttttaccggg agcgggctga tccgccgagg caacaattgg 420
 tatgttcaca ggggtttggg agttgtaaac tcgtaatga tccctccgc 469

5

<210> 7

<211> 480

<212> ADN

<213> Fusarium avenaceum

10

<400> 7

gaagtggggg ttttacggca tggcccgccc gcgttccagt tgcgaggtgt tagctactac 60
 gcaatggagg ctgcagcgag accgccaatg tatttcgggg gcggcaccgc cagaaggcag 120
 agccgatccc caacacccaaa cccgggggct tgagggttga aatgacgctc gaacaggcat 180
 gcccgccgga ataccagcgg gcgcaatgtg cgttcaaaga ttcgatgatt cactgaattc 240
 tgcaattcac attacttata gcattttgct gcgtttctca tcgatgccag aaccaagaga 300
 tccgttggtg aaagttttga tttatttgtt tgttttactc agaagttaca ataagaaaca 360
 ttagagtttg ggtcctctgg cgggccgtcc cgttttacgg ggccggggct gatccgcoga 420
 ggcaacatta aggtatgttc acaggggttt gggagtgtga aactcggtaa tgatccctcc 480

15

<210> 8

<211> 468

<212> ADN

<213> Fusarium subglutinans

<400> 8

gaagtggggg ttaacggcg tggcccgcac gattaccagt aacgaggggt ttactactac 60
 gctatggaag ctgcagctga ccgccaatca atttggggaa cgcgatttga ctgcgagtc 120
 ccaacaccaa gctgggcttg aggggtgaaa tgacgctcga acaggcatgc ccgcagaat 180
 actggcgggc gcaatgtgcg ttcaaagatt cgatgattca ctgaattctg caattcacat 240
 tacttatcgc attttgctgc gttcttcatc gatgccagaa ccaagagatc cgttggttga 300
 agttttgatt tatttatggt tttactcaga agttacatat agaaacagag tttaggggtc 360
 ctctggcggg ccgtcccgtt ttaccgggag cgggctgatc cgccgaggca acaattggta 420
 tgttcacagg ggtttgggag ttgtaactc ggtaatgatc cctccgca 468

20

<210> 9

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 9

tccgtaggtg aacctgcgg 19

5

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 10

15 tcctccgctt attgatatgc 20

20

REIVINDICACIONES

- 1.- Una formulación que comprende ácido propanoico y hexanoatos de isoamilo.
- 2.- La formulación de la reivindicación 1, que comprende además ácido isobutírico.
- 5 3.- La formulación de la reivindicación 2, en la que la proporción de ácido propanoico:ácido isobutírico es de 1:1 en v/v.
- 4.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la proporción de ácido:hexanoatos de isoamilo es de 7:2 en v/v.
- 5.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en la que la proporción de ácido propanoico:ácido isobutírico:hexanoatos de isoamilo es de 3,5:3,5:2 en v/v/v.
- 10 6.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además un vehículo.
- 7.- La formulación de la reivindicación 6, en la que el vehículo se selecciona del grupo que consiste en bentonita, zeolita y perlita.
- 8.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además un hongo endofítico.
- 9.- La formulación de la reivindicación 8, en la que el hongo endofítico pertenece al género *Fusarium*.
- 15 10.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además uno o más de un suplemento nutricional, una sal y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 11.- Un método para tratar residuos humanos o animales, que comprende poner en contacto residuos humanos o animales con la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 20 12.- Un método para eliminar o reducir el crecimiento microbiano en un sitio de tratamiento, que comprende poner en contacto el sitio de tratamiento con la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la formulación mata o reduce el crecimiento bacteriano sobre residuos humanos o animales.
- 13.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 10 para su uso en un método para tratar a un animal que padece una enfermedad o un trastorno asociado con una infección microbiana, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 10.
- 25 14.- La formulación para el uso de la reivindicación 13, en la que el animal se selecciona del grupo que consiste en seres humanos, bovinos, porcinos, ovinos, perros y gatos.
- 15.- La formulación para el uso de la reivindicación 13, en la que la infección microbiana está provocada por *E. coli*, *S. aureus* o *Salmonella*.

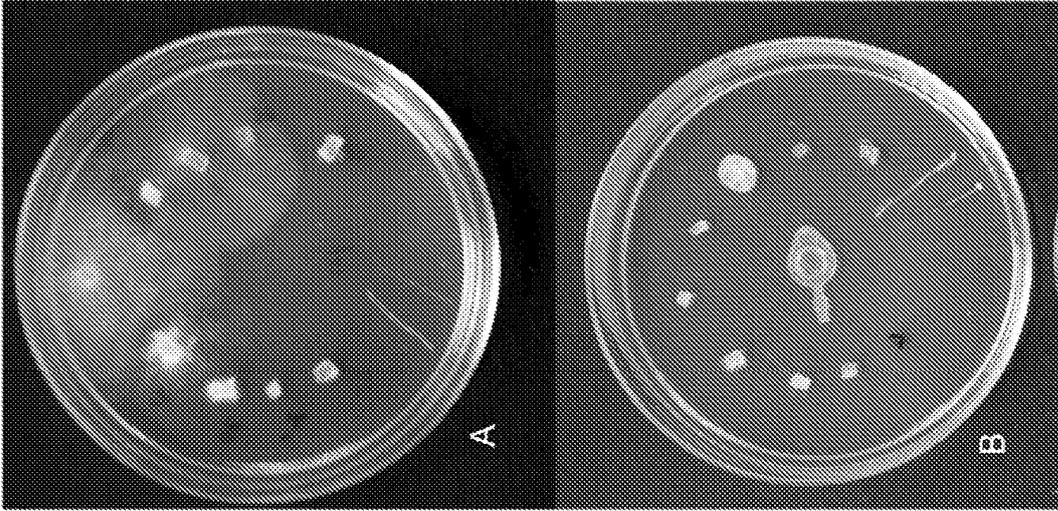


Figura 1

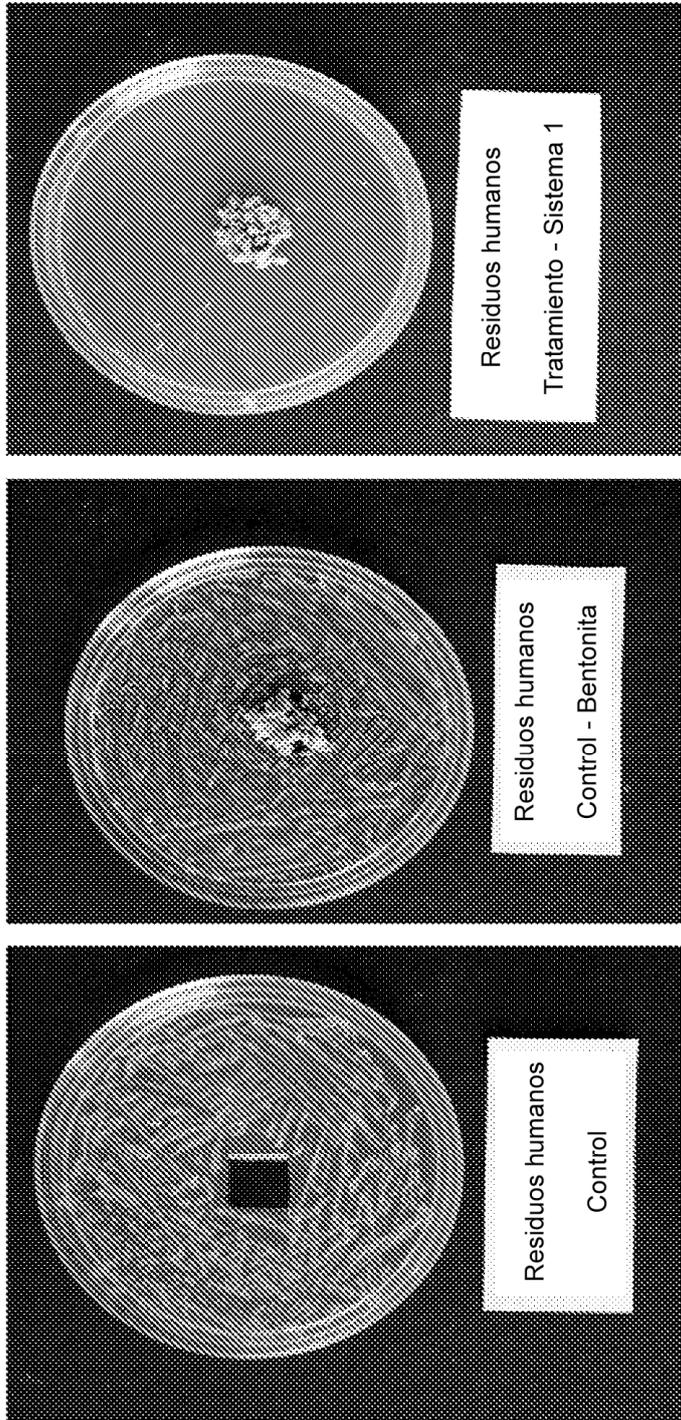


Figura 2

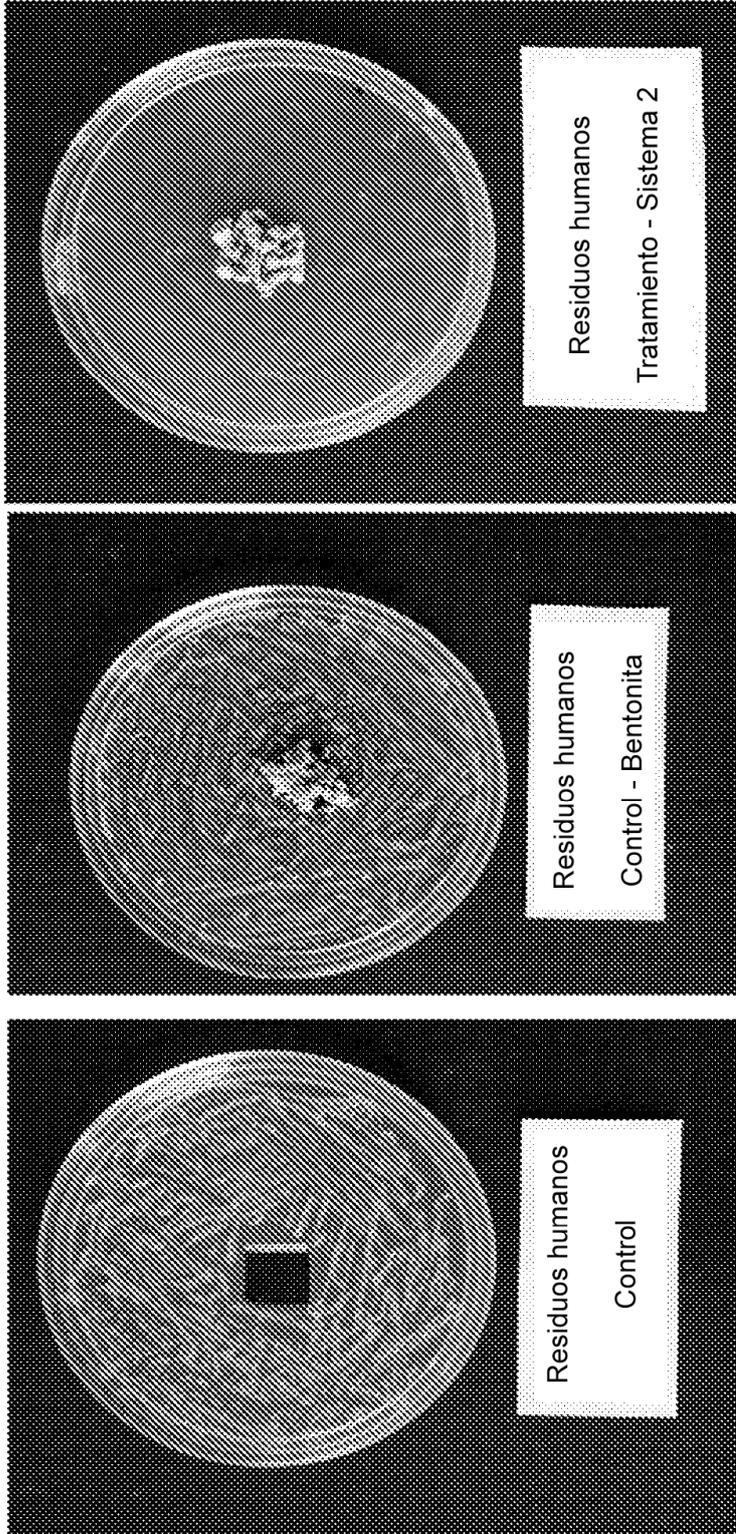


Figura 3



Figura 4

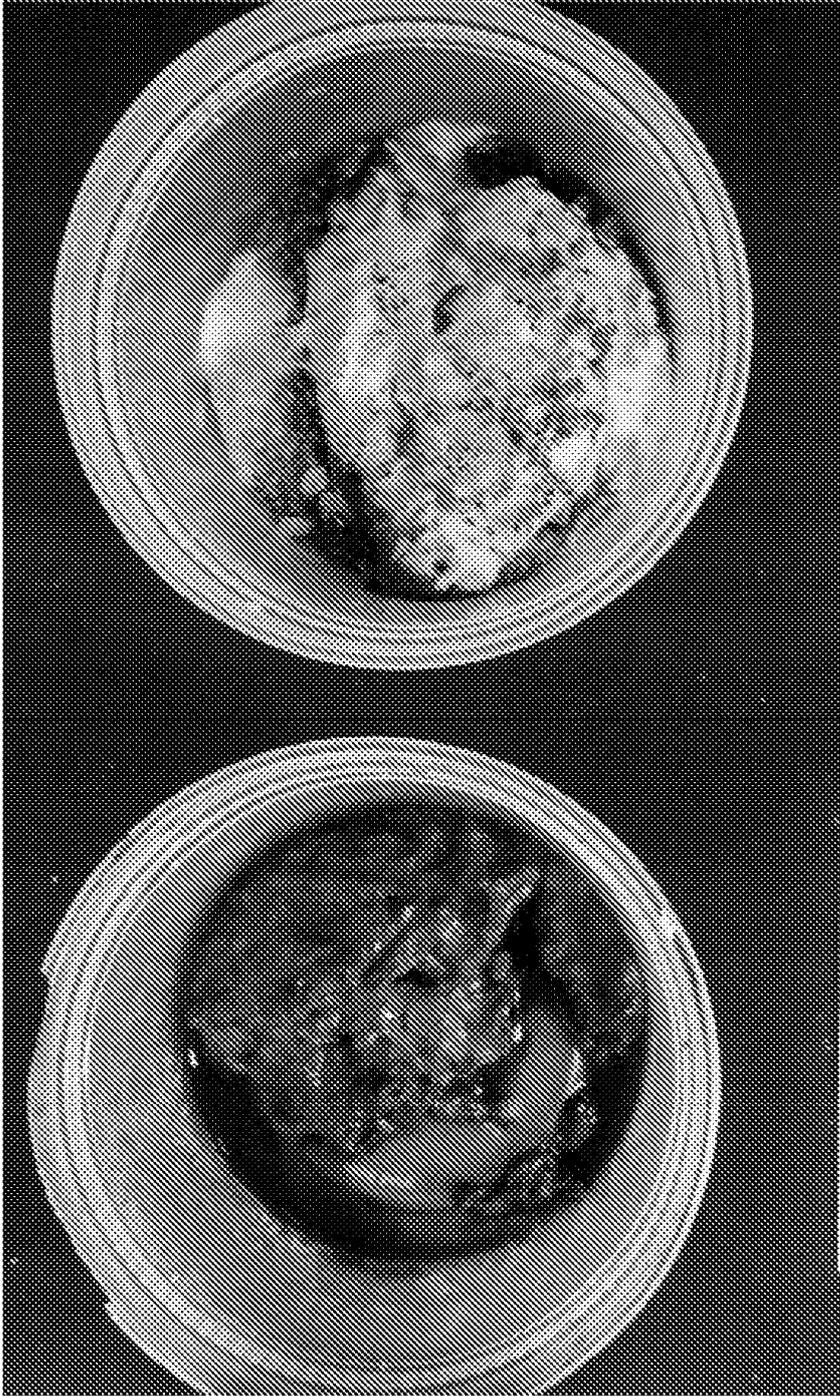


Figura 5

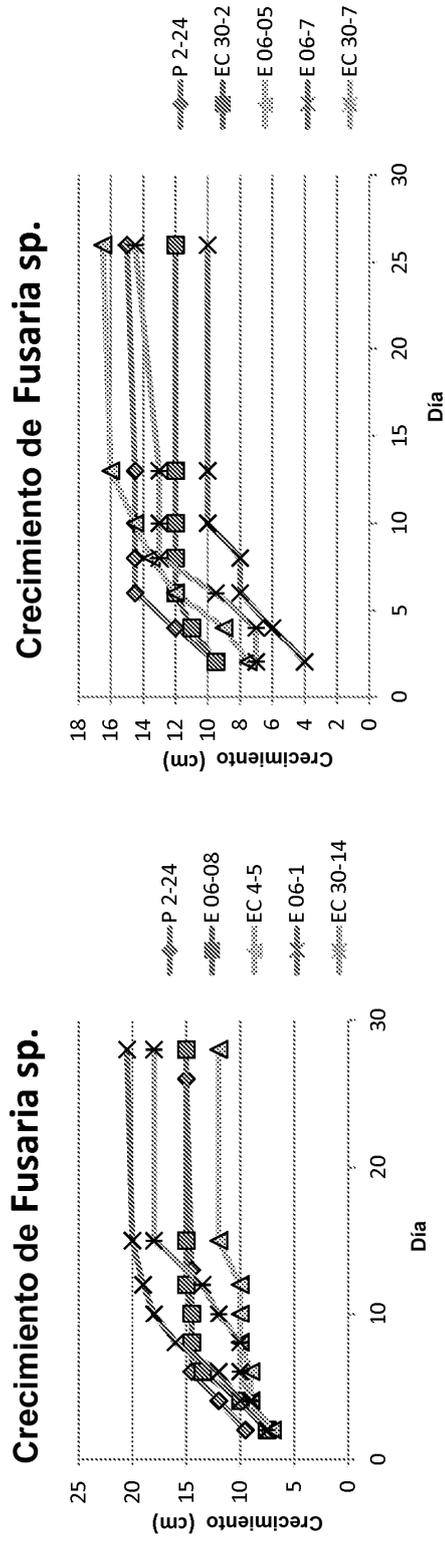


Figura 6

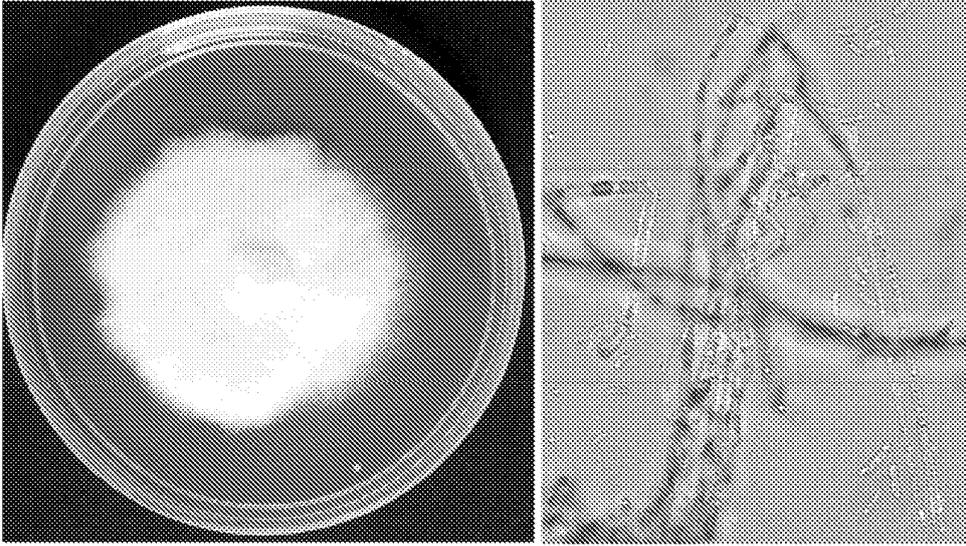


Figura 7



Figura 8

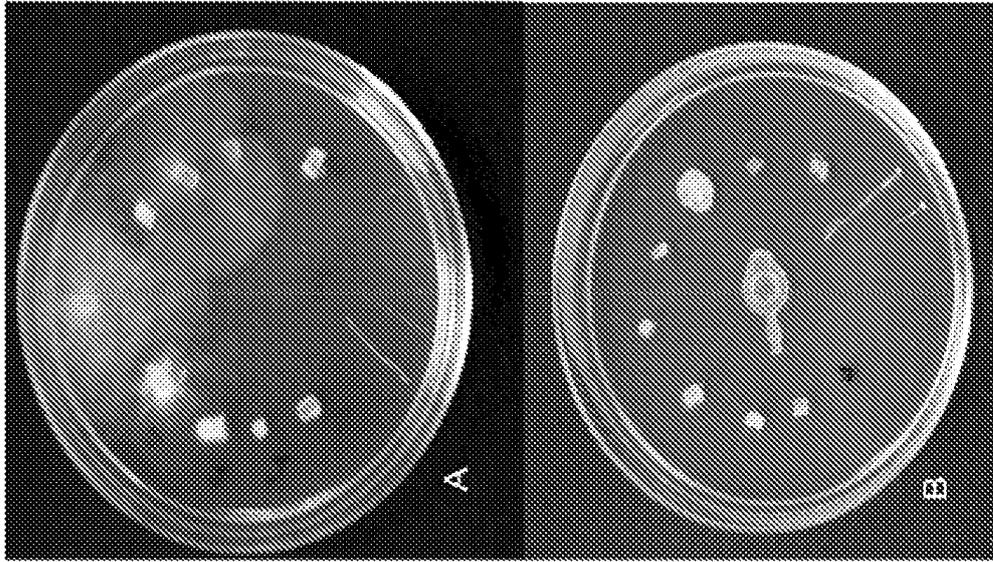


Figura 9

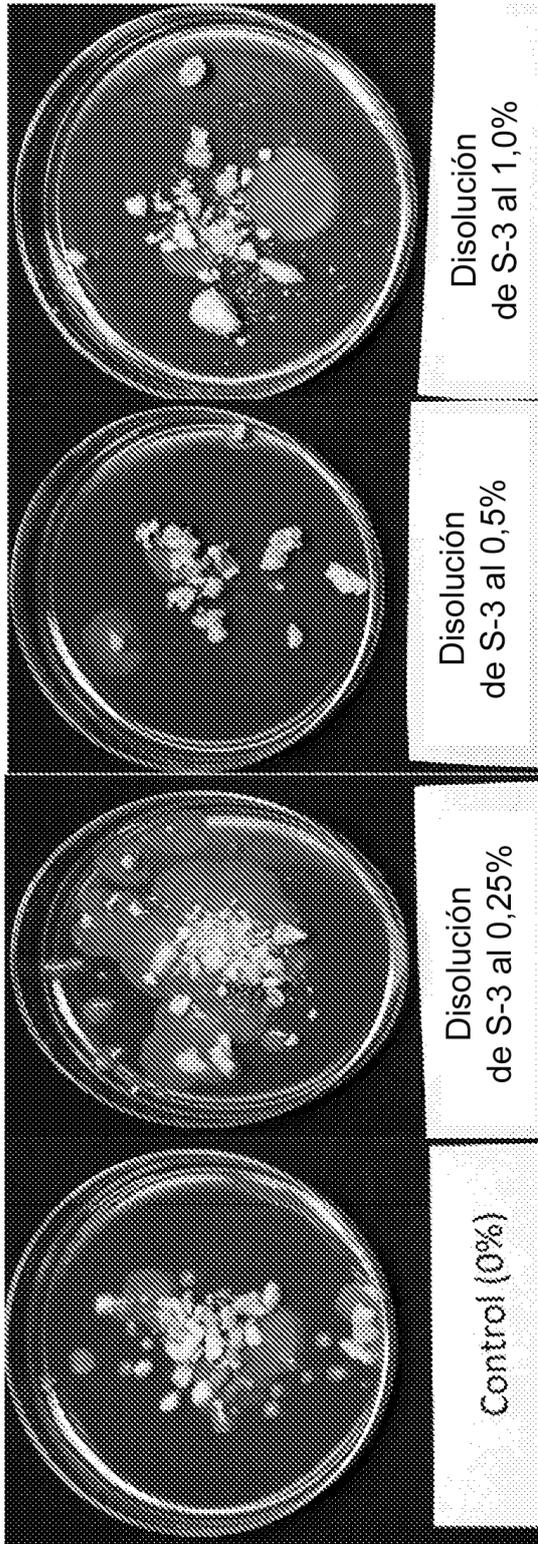


Figura 10

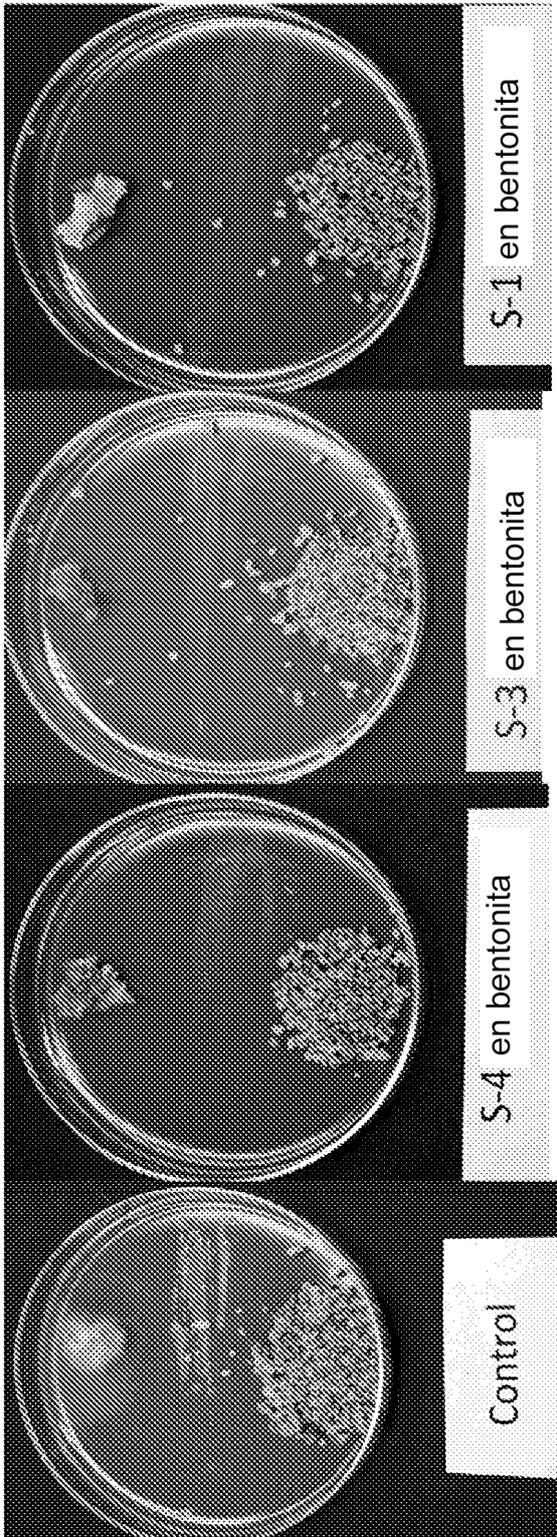


Figura 11

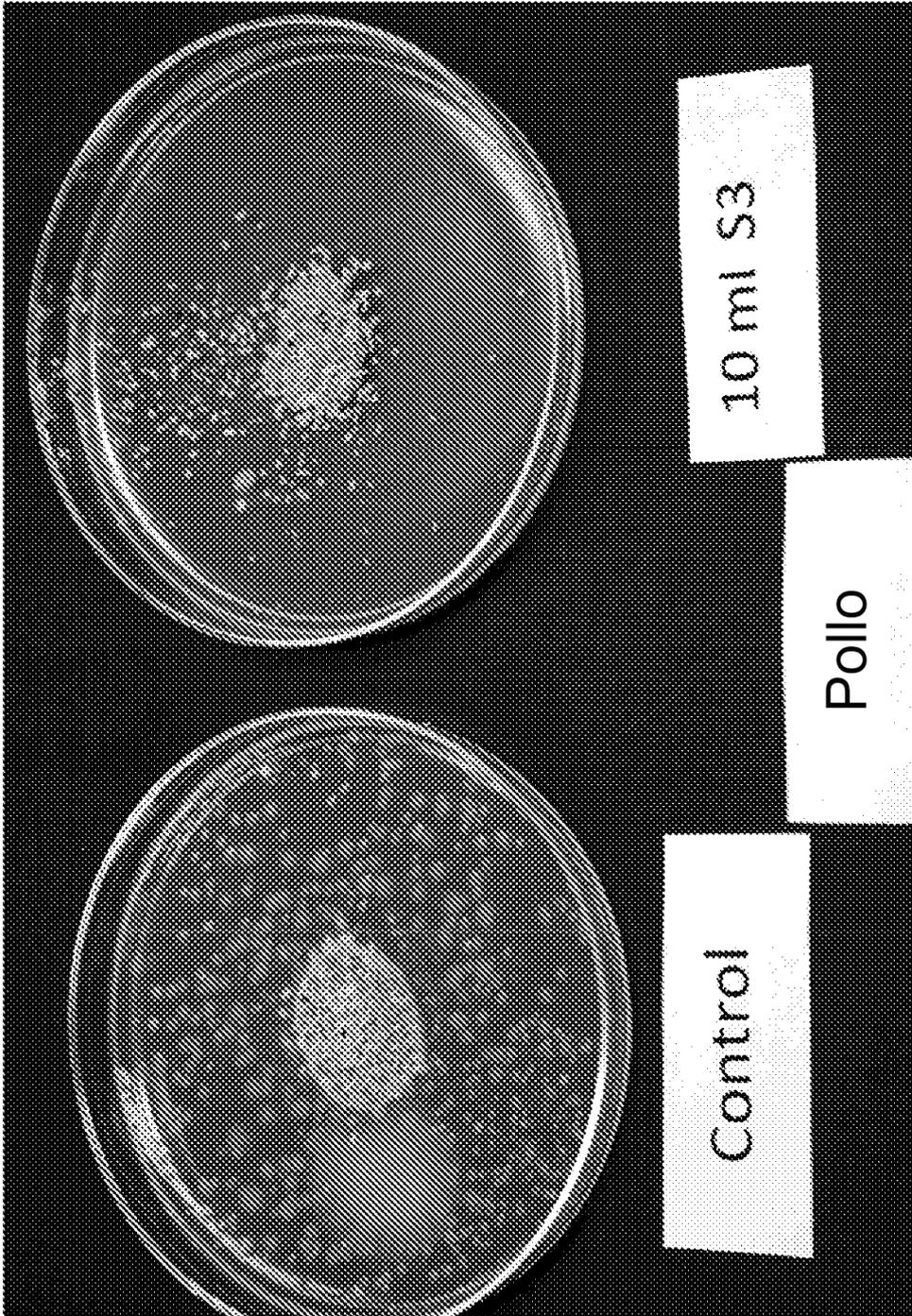


Figura 12



Figura 13

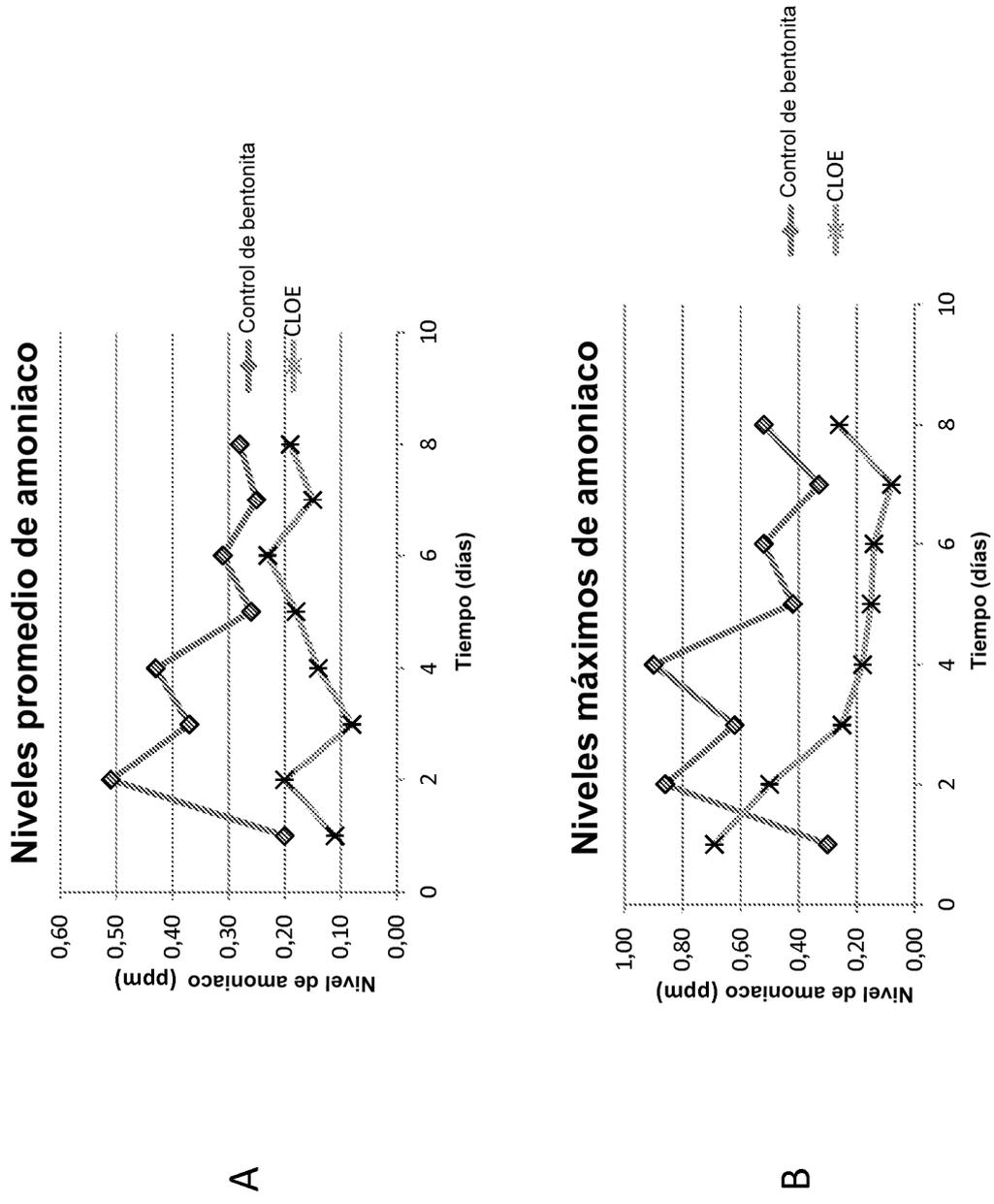
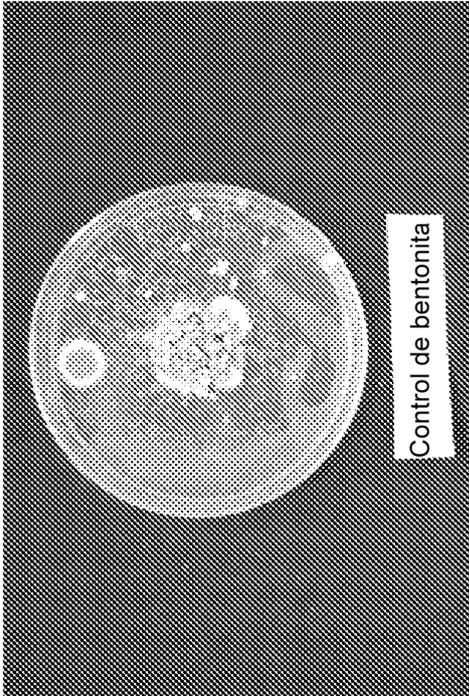
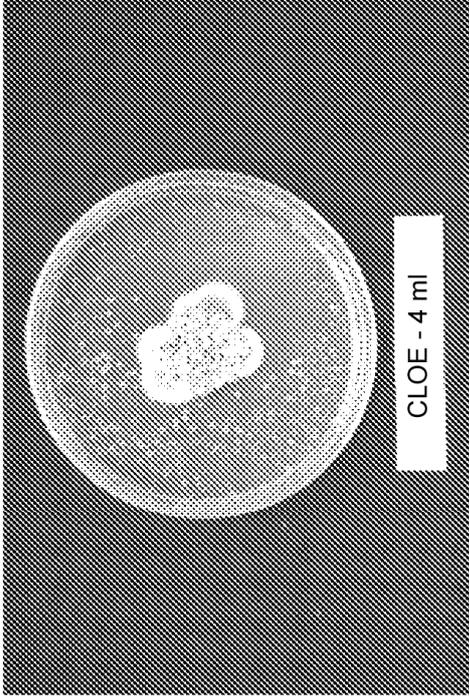


Figura 14



A

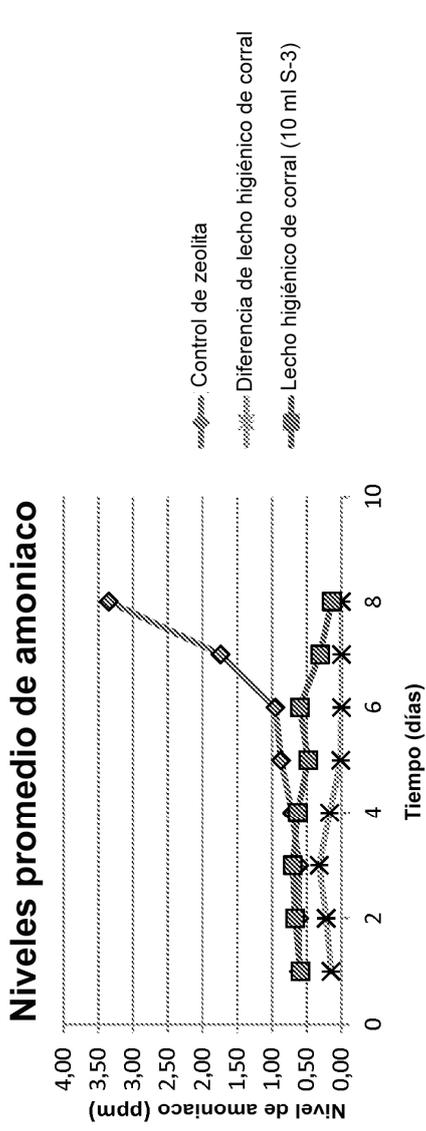


B

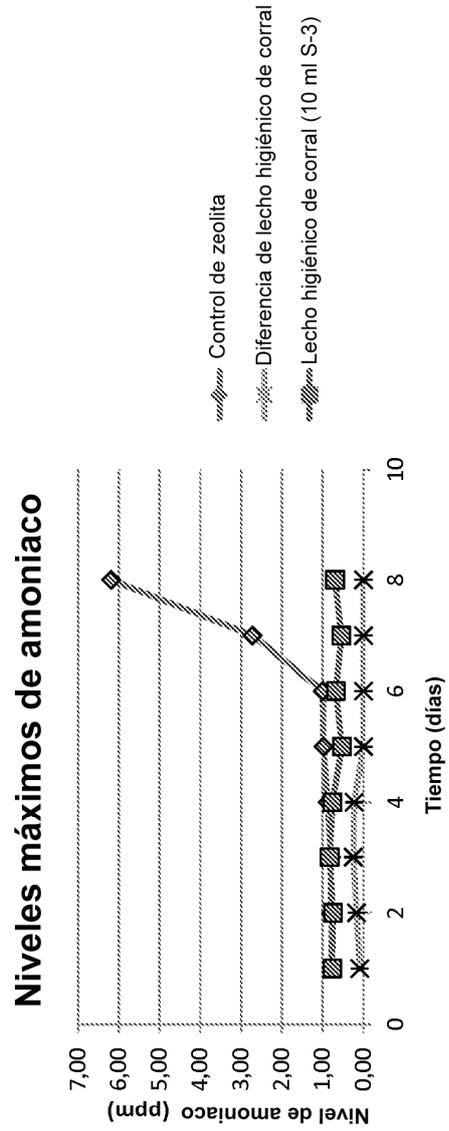
Figura 15



Figura 16



A



B

Figura 17

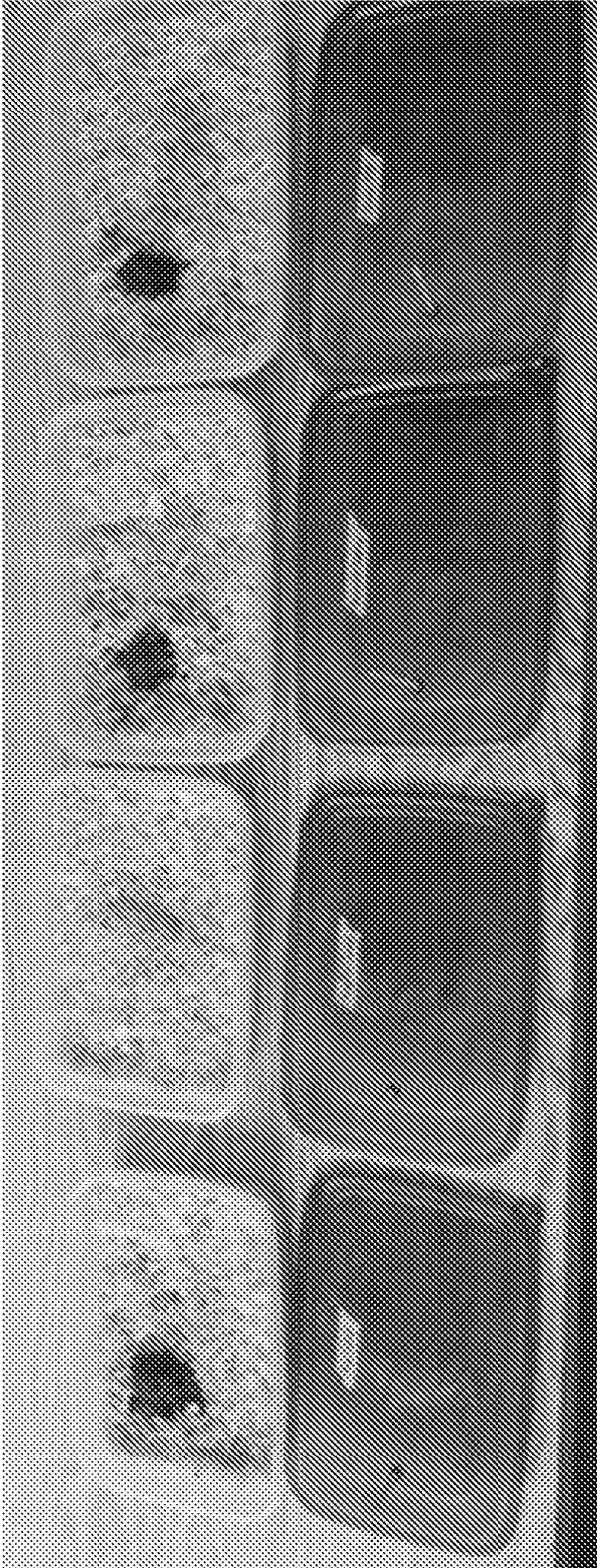
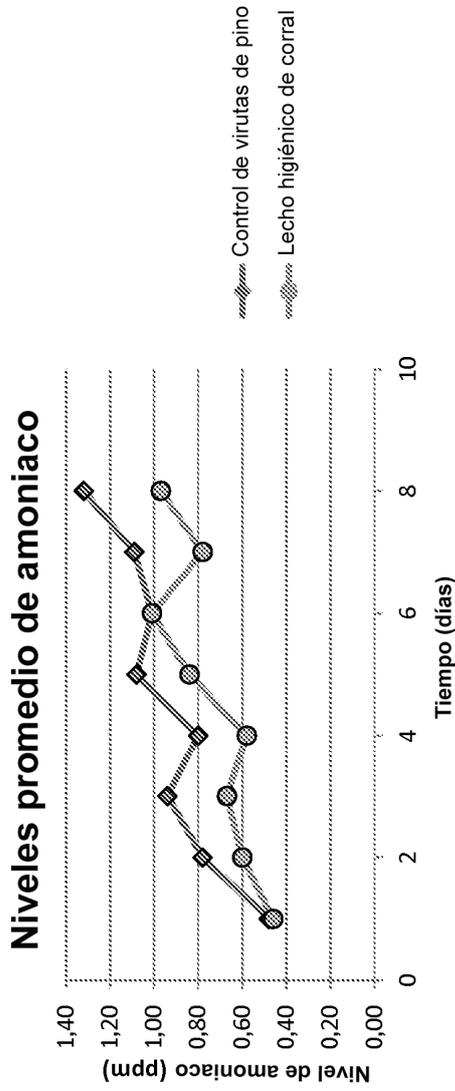
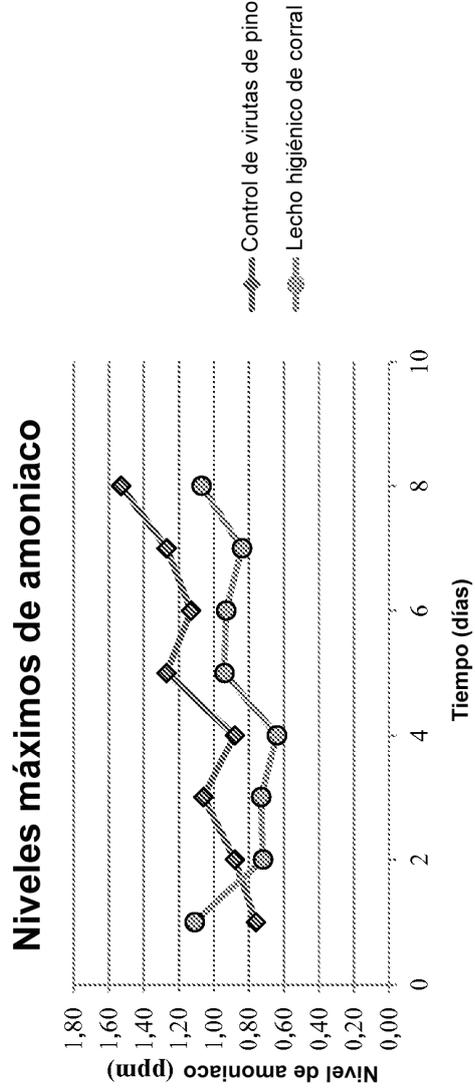


Figura 18



A



B

Figura 19

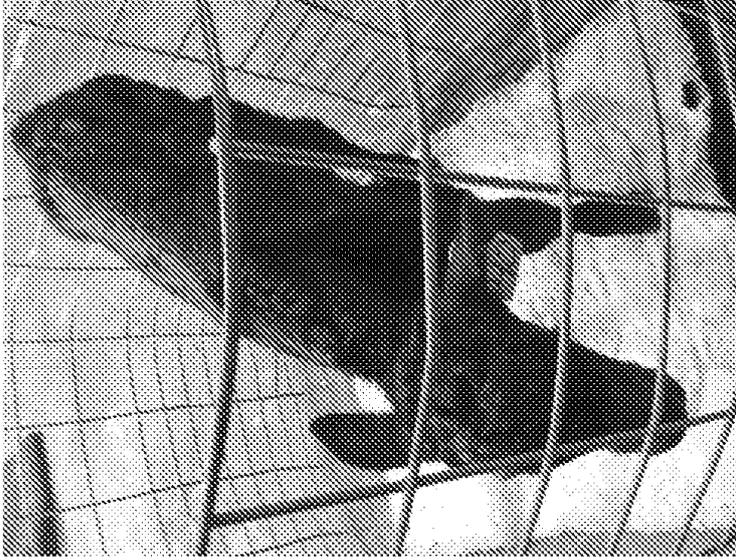


B



A

Figura 20



B

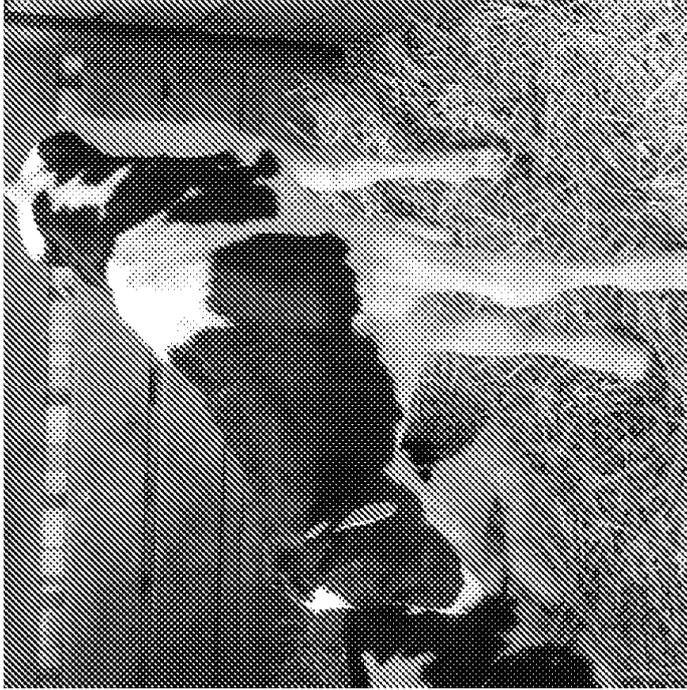


A

Figura 21



Figura 22



B

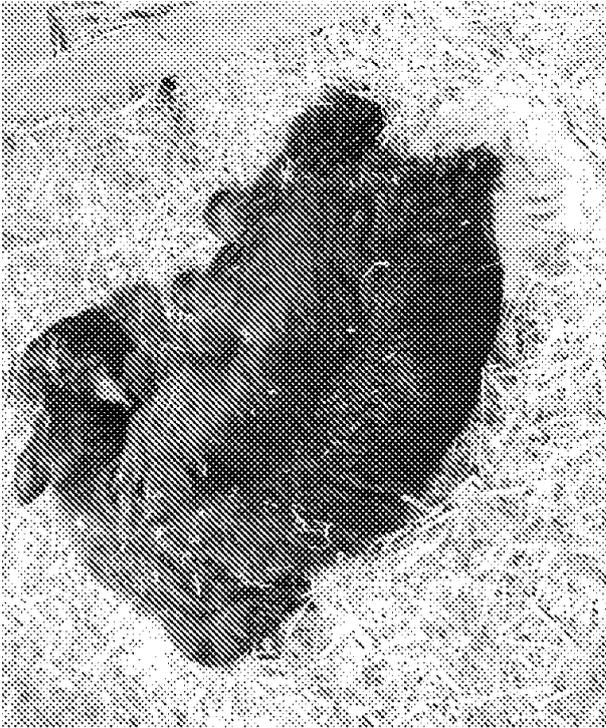


A

Figura 23



B



A

Figura 24



B



A

Figura 25



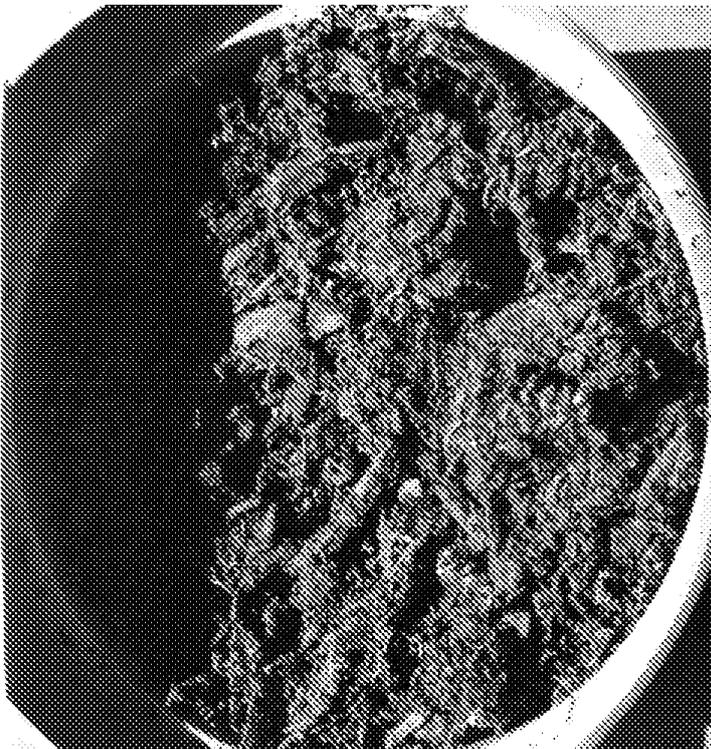
B

A

Figura 26



B



A

Figura 27

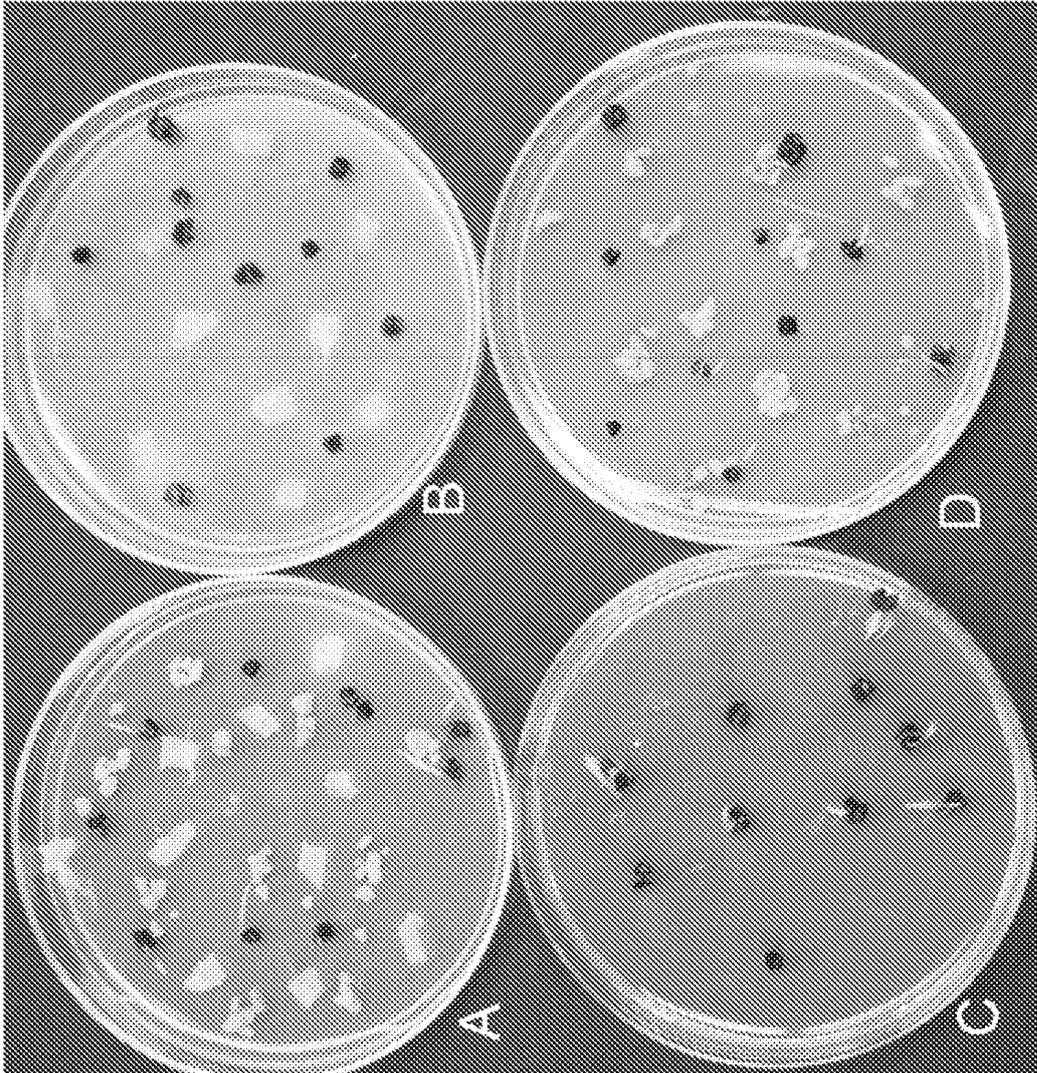


Figura 28