

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 293**

51 Int. Cl.:

A61K 36/87 (2006.01)
A61K 36/82 (2006.01)
A61K 36/45 (2006.01)
A61K 36/61 (2006.01)
A61K 36/73 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2017** **PCT/EP2017/077956**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2018** **WO18083115**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2017** **E 17791112 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3534926**

54 Título: **Extracto de una composición herbaria como agente antimicrobiano y/o antibiopelícula**

30 Prioridad:

02.11.2016 FR 1660588
04.11.2016 EP 16197217

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.11.2024

73 Titular/es:

ALPHANOSOS S.A.S. (100.0%)
20-22 Rue Henri et Gilberte Goudier, Zone
Industrielle La Varenne
63200 Riom, FR

72 Inventor/es:

MAYER, PASCAL y
BREUILS, LAURE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 986 293 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

Extracto de una composición herbaria como agente antimicrobiano y/o antibiopelícula

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se define en las reivindicaciones 1-23 y se refiere a un extracto de una composición herbaria que comprende al menos dos plantas secas diferentes útiles como agentes antimicrobianos y/o antibiopelículas. Se ha descubierto también que en dicho extracto, los ingredientes activos ejercen sus efectos biológicos de una manera sinérgica.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Al igual que cualquier organismo vivo, las plantas contienen numerosas entidades químicas, que incluyen productos químicos de bajo peso molecular, polipéptidos, polisacáridos, enzimas. Un extracto vegetal es por tanto un ejemplo trivial de mezcla de entidades químicas que se produce de manera natural.

Las actividades biológicas y terapéuticas de muchas mezclas de entidades químicas obtenidas a partir de plantas son de conocimiento secular y se recopilan en numerosos manuscritos (véase, por ejemplo, The Definitive Home Reference Guide to 550 Key Herbs with all their Uses as Remedies for Common Ailments Hardcover – 15 de noviembre de 2000, por Andrew Chevallier).

La ciencia moderna permite observar los efectos biológicos y terapéuticos de las combinaciones de entidades químicas obtenidas de plantas en un gran número de organismos.

Por ejemplo, se describe en Scheggi (Scheggi S. et al, Pharm. Biol. enero 2016 5:1-11 [Epub anterior a la impresión] cómo un modelo de rata permite probar el efecto contra la depresión de las combinaciones de entidades químicas obtenidas de plantas.

En Zhipeng QU (Oncotarget. 1 de septiembre de 2016 Epub) se muestra cómo es posible identificar los mecanismos moleculares anticancerosos candidatos de la inyección del compuesto Kushen usando genómica funcional. La inyección de compuesto Kushen (ICK) se ha usado clínicamente en China durante más de 15 años para tratar diversos tipos de tumores sólidos. Sin embargo, debido a que tales preparaciones de Medicina China Tradicional (MCT) son mezclas complejas de metabolitos secundarios vegetales, es esencial explorar sus mecanismos moleculares subyacentes de una manera sistemática. Este estudio muestra que la ICK inhibía la proliferación de células MCF-7 e inducía apoptosis de una manera dependiente de la dosis. Se descubrió que se perturbaban múltiples rutas y se identificó el ciclo celular como la posible ruta diana primaria de ICK en células MCF-7. La ICK también puede inducir apoptosis en células MCF-7 a través de un mecanismo independiente de p53. Además, identificaron nuevos lncARN y mostraron que muchos de ellos podrían expresarse como una respuesta al tratamiento con ICK.

El efecto de las mezclas de entidades químicas obtenidas, por ejemplo, de plantas, hongos o bacterias sobre el crecimiento de microorganismos tales como bacterias y hongos se ha descrito muchas veces, por ejemplo, en Venkatadri (Venkatadri B. et al., Indian J. Pharm. Sci. noviembre-diciembre 2015; 77(6):788-91).

El efecto de las combinaciones de entidades químicas obtenidas, por ejemplo, de plantas, hongos o bacterias sobre la formación de biopelículas (comunidades de microorganismos embebidos en una matriz polimérica unida a una superficie) también se ha descrito muchas veces, por ejemplo, en Süntar (Süntar I. et al., Pharm. Biol. junio de 2016; 54(6):1065-70Epub 2015 Oct 29).

Shimizu M. et al. (Antimicrob Agents Chemother. noviembre de 2001; 45(11):3198-201) descubrió que un extracto de *Arcostaphylos uva-ursi* redujo marcadamente las CIM (Concentraciones Inhibidoras Mínimas) de los antibióticos betalactámicos, tales como oxacilina y cefmetazol, contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. El mismo grupo aisló también el compuesto eficaz y lo identificó como corilagina.

Otro grupo (Denev P. et al, Acta Biochim. Pol. 2014;61(2):359-67. Epub 18 de junio de 2014) estudió las actividades antioxidantes, antimicrobianas y moduladoras de neutrófilos de extractos de seis plantas medicinales de morera (*Rubus fruticosus*) hojas de acohón (*Aronia melanocarpa*), hojas de espino (*Crataegus monogyna*), manto de la landa (*Alchemilla glabra*) partes aéreas de la hierba de la mandioca (*Filipendula ulmaria*), partes aéreas y hojas de frambuesa (*Rubus idaeus*). La actividad antimicrobiana de los extractos investigados contra 11 patógenos humanos se investigó usando tres métodos diferentes y los resultados de este estudio permitieron concluir que los extractos de hojas de Filipendula Ulmaria y mora tenían el efecto antimicrobiano más alto y las concentraciones inhibidoras mínimas (CIM) más bajas contra los microorganismos ensayados.

Yam T. et al. (FEMS Microbiol Lett. 1 de julio de 1997; 152 (1) :169-74) centró su estudio en la actividad microbiológica de extractos crudos completos y fraccionados de té (*Camellia sinensis*), y de componentes del té. Se

probaron extractos acuosos de tés (*Camellia sinensis*) de diferentes tipos y de diversas fuentes y se descubrió que inhibían una amplia variedad de bacterias patógenas, incluyendo resistentes a metilicina *Staphylococcus aureus*. Los extractos de té eran bactericidas para los estafilococos y *Yersinia enterocolitica* a muy por debajo de las concentraciones de "taza de té". La actividad se limitó a una de cuatro fracciones obtenidas a partir de un extracto de té verde mediante cromatografía de partición. El ensayo de compuestos de té puro y productos químicos estrechamente relacionados sugería que la actividad antibacteriana de extractos de té verde puede explicarse por su contenido de epigallocatequina, galato de epigallocatequina y galato de epicatequina. En los extractos de té negro, la teoflavina y sus galatos son componentes antibacterianamente activos adicionales.

La WO 2009/031041 informa de una composición que comprende (a) un compuesto antimicrobiano que tiene una fórmula estructural química dada, (b) un material antimicrobiano seleccionado de bacteriocinas de lantionina, té [*Camellia sinensis*] extracto de lúpulo [*Humulus lupulus* L], extracto de piel de uva, extracto de semilla de uva, extracto de Uva Ursi [*Arcostaphylos uva-ursi*] y combinaciones de los mismos.

La WO 99/20289 informa de una solución de extracto de hierbas transparente que comprende un extracto de hierbas concentrado y un líquido de relleno. Se informa que el extracto de hierbas concentrado se selecciona de una larga lista de extractos de plantas, donde dicha lista incluye *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* y *Arcostaphylos uva-ursi*. Sin embargo, la WO 99/20289 no menciona ningún uso terapéutico o médico específico de la solución herbaria reivindicada.

La US 2015/0056255 informa de un producto para uso medicinal, cosmético, colorante o dermatológico, el producto contiene una capa de un producto vegetal fibroso y un extracto vegetal aplicado a la capa del producto vegetal fibroso. Se dice que el extracto vegetal incluye sustancias de una o más partes específicas de una o más plantas, en donde las plantas se seleccionan de al menos una de una larga lista de plantas.

Azanida NN (Med. Aromat. Plants, 4:3, p.1-6, 2015) publicó una revisión, que presenta una descripción y una comparación de los métodos más comúnmente usados para preparar extractos de plantas medicinales. Los autores concluyen su artículo afirmando que "ningún método de extracción universal es el método ideal y cada procedimiento de extracción es único para las plantas" (véase "Conclusiones", líneas 5-7).

Selman A. Wachsman et al. (Bacteriology, 31, p. 157-164, 1945) informa que diferentes cepas de la misma especie bacteriana pueden variar en gran medida en su resistencia a la estreptomycin. En dicho artículo se usan diferentes cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* para ensayar la actividad de la estreptomycin. Sin embargo, ningún extracto de planta se prueba en las mismas cepas y por lo tanto no se puede extraer ninguna orientación clara de dicho artículo.

Los efectos biológicos, tales como los contemplados en los ejemplos anteriores, pueden ser inducidos por una sola entidad química, tal como en fármacos estándar, o por efectos sinérgicos de diferentes entidades químicas, tal como en extractos. En algunos casos, el efecto biológico es atribuible casi completamente a una única entidad química contenida en el extracto. En este caso, el extracto puede ser reemplazado por la entidad química activa purificada.

Los efectos biológicos de una entidad química pueden deberse a reacciones químicas (transformaciones) con las entidades químicas que constituyen el organismo o deberse a la unión transitoria o permanente a las entidades químicas, en particular las macromoléculas, que constituyen el organismo. Tal unión modulará la actividad de las entidades químicas del organismo, en particular las macromoléculas, por ejemplo, aumentará o disminuirá la actividad de una enzima.

Desafortunadamente, las entidades químicas nunca tienen un único efecto sobre un organismo. En particular, las interacciones con los constituyentes macromoleculares son numerosas. De hecho, está bien establecido que cualquier entidad química, ya sea natural o resultante de la síntesis química, tendrá efectos perjudiciales sobre organismos (seres humanos, animales, plantas, microflora, etc.) de una manera relacionada con la dosis. Finalmente, también se puede observar un efecto positivo o terapéutico relacionado con la dosis. Para que la entidad química sea de interés industrial, es obvio que la dosis requerida para observar el efecto positivo o terapéutico debe ser menor que la dosis para la que los efectos perjudiciales se vuelven inaceptables.

Las entidades químicas que difieren en su composición o estructura química tendrán diferentes afinidades (o constantes de unión) con las diferentes macromoléculas que constituyen el organismo, y por tanto diferentes modos de acciones que dan como resultado los efectos nocivos, positivos y terapéuticos observados.

En muchos casos las macromoléculas implicadas en efectos nocivos y las implicadas en efectos positivos o terapéuticos son diferentes. Las entidades químicas que difieren en su composición química tendrán en la mayoría de los casos afinidades (o constantes de unión) muy diferentes con las numerosas macromoléculas que constituyen el organismo.

En la mayoría de los casos, diferentes entidades químicas tendrán diferentes afinidades (o constantes de unión) con una macromolécula dada. En casos raros, diferentes entidades químicas tendrán afinidades (o constantes de unión) similares con la misma macromolécula o conjuntos de macromoléculas implicadas en un efecto positivo o terapéutico. Entre estos casos, será raro que estas diferentes entidades químicas tengan afinidades (o constantes de unión) comparables con las macromoléculas implicadas en un efecto perjudicial dado.

Las mezclas de diferentes entidades químicas pueden tener por tanto un efecto sinérgico positivo o terapéutico sin un efecto perjudicial dado acumulativo. Por lo tanto, para un efecto positivo o terapéutico dado, la dosis requerida para cada entidad química diferente individual en una mezcla será menor que la dosis requerida por cada una de las entidades químicas consideradas individualmente para obtener ese efecto positivo o terapéutico dado. En aquellos casos en los que los efectos perjudiciales inducidos por cada compuesto químico diferente son diversos o tienen una etiología macromolecular diferente, cada efecto perjudicial de la mezcla será menor que el efecto perjudicial de la entidad química considerada individualmente porque se usa a una dosis menor en la mezcla.

Obsérvese que la situación sinérgica de la administración simultánea de dosis reducidas de diferentes entidades químicas es diferente de la coadministración de diferentes fármacos (entidades químicas) que tienen diferentes efectos terapéuticos administrados a sus dosis estándar. En la última situación, son bien conocidos los efectos secundarios aumentados debido a interacciones con fármacos. Una de las causas de los efectos secundarios es la posible interacción química de los diferentes fármacos (entidades químicas). En la situación sinérgica, cada entidad química está presente a una concentración reducida y, por lo tanto, con velocidades mucho menores de interacciones químicas. Con fines ilustrativos, una mezcla sinérgica de 10 entidades químicas (fármacos) diferentes administradas cada una a $1/10^a$ de la concentración (dosis) necesaria para una entidad química (fármaco) administrada individualmente, la tasa de reacciones químicas interfármacos se reducirá en un factor de 100 como implica la ley universal de acción de la masa.

Por lo tanto, es de interés usar mezclas sinérgicas de diferentes entidades químicas para obtener un efecto positivo o terapéutico dado con efectos perjudiciales reducidos, o para obtener un efecto positivo o terapéutico aumentado con un nivel dado de diferentes efectos perjudiciales. De hecho, se conocen varios extractos que tienen actividades sinérgicas en relación con entidades químicas aisladas (véase, por ejemplo, Deharo E. et al., Malar. J. 15 de marzo de 2011;10 Suppl 1:S5).

Los extractos naturales compuestos de una mezcla de entidades químicas sinérgicas pueden descubrirse, por ejemplo, por medio de pruebas sistemáticas de numerosos extractos naturales de polvos vegetales individuales o composiciones herbarias que contienen al menos dos o más polvos vegetales diferentes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Ahora se ha descubierto que un extracto de una composición herbaria que contiene al menos dos plantas secas seleccionadas entre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* y *Arcostaphylos uva-ursi* es útil como agente antimicrobiano y/o antibiopelícula en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas causadas por bacterias, tales como, por ejemplo *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* o *Staphylococcus*, o por hongos, tales como por ejemplo *Candida*. También se ha descubierto que en dicho extracto, los ingredientes activos ejercen sus efectos biológicos de una manera sinérgica.

En el presente documento se describe el tratamiento o prevención de las infecciones microbianas mencionadas anteriormente que comprende administrar una cantidad eficaz de un extracto de una composición herbaria que contiene al menos dos plantas secas seleccionadas entre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* y *Arctostaphylos uva-ursi*, un liofilizado de dicho extracto, o una composición farmacéutica o veterinaria que comprende dicho extracto o dicho liofilizado, a un sujeto que lo necesite.

Un objeto de la presente invención es un extracto de una composición herbaria, que contiene al menos dos plantas secas seleccionadas entre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* y *Arcostaphylos uva-ursi* y al menos una planta seleccionada entre *Vitis vinifera* var. *tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* y *Desmodium adscendens*.

Dicha composición herbaria puede comprender además una o más plantas secas adicionales seleccionadas entre: *Achillea millefolium*, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alcanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrago officinalis*, *Buuxus sempervirens*, *Calamintha officinalis*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Carum carvi*, *Cassia anquistifolia*, *Cen to urea cyanus*, *Centaurium erythraea*, *Centella asiática*, *Cetraria islandica*, *Chamaemelum nobile*, *Chamomilla recutita*, *Chrysanthelum americanum*, *Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Combretum micranthum*, *Crataegus oxiacanta*, *Cunum cuminum*, *Cupresus sempervirens*, *Curcuma zedoaria*, *Cynara scolymus*, *Cytisus scoparius*, *Elettaria cardamomum*, *Eleutherococcus senticosus*, *Epilobium parviflorum*, *Erysimum officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Eupatorium cannabinum*, *Foeniculum vulgare*, *Fraxinus excelsior*, *Fucus vesiculosus*, *Fumaric officinalis*, *Galium odoratum*,

Gentiana lutea, Geranium robertianum, Ginkgo biloba, Glechoma hederacea, Glycyrrhiza glabra, Handroanthus impetiginosus, Harpachophytum procumbens, Hieracium pilosella, Humulus lupulus, Hypericum perforatum, Hyssopus officinalis, Illicium verum, Inula helenium, Juglans regia, Juniperus communis, Lamium album, Lavandula angustifolia, Leviticum officinale, Lippia citridora, Lotus corniculatus, Lythrum salicaria, Malva sylvestris, Marrubium vulgare, Medicago sativa, Melissa officinalis, Mentha x piperita, Morus nigra, Myrtus communis, Olea europaea, Origanum maiorana, Panax qinseng, Papaver rhoeas, Parietaria officinalis, Passiflora incarnata, Petroselinum crispum, Peumus boldus, Phaseolus vulgaris, Pimpinella anisum, Plantago lanceolata, Plantago ovata, Potentilla anserina, Quercus robur, Rhamnus frangula, Rheumatum, Rosa centifolia, Rosmarinus officinalis, Rubia tinctorum, Rubus idaeus, Salix alba, Salvia officinalis, Sambucus nigra, Satureja montana, Silybum marianum, Solanum dulcamara, Tabebuia impetiginosa, Tanacetum vulgare, Taraxacum officinalis, Thymus serpyllum, Thymus vulgaris, Tilia tomentosa, Tilia cordata, Trigonella foenum-graecum, Tussilago farfara, Vaccinium myrtillus, Valeriana officinalis, Verbascum thapsus, Verbena officinalis, Viscum album, Zea mays y Zingiber officinale.

Un objeto adicional de la invención es un extracto de una composición herbaria que comprende de tres a siete plantas secas seleccionadas entre *Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Arctostaphylos uva-ursi, Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Vitis vinifera tinctoria, Desmodium adscendens, Eugenia caryophyllus y Eucalyptus Globulus*, en la que al menos dos de tales plantas se seleccionan entre *Filipendula ulmaria, Camellia sinensis y Arctostaphylos uva-ursi* y al menos una de tales plantas se selecciona entre *Vitis vinifera tinctoria, Desmodium adscendens y Eugenia caryophyllus*.

Otro objeto de la invención es un extracto de una composición herbaria que comprende las siguientes plantas secas: *Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria y Arctostaphylos uva-ursi*.

Otro objeto de la invención es un extracto de una composición herbaria que comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum, Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria y Arctostaphylos uva-ursi*.

Otro objeto de la invención es un extracto de una composición herbaria que comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Eugenia caryophyllus y Arctostaphylos uva-ursi*.

Un objeto adicional de la invención es un extracto de una composición herbaria que comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Eucalyptus globulus, Arctostaphylos uva-ursi, Mentha spicata y Rubia tinctoria*.

Otro objeto de la invención es un extracto de una composición herbaria que comprende al menos catorce o quince plantas secas seleccionadas entre las dieciséis siguientes: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Satureja montana, Valeriana officinalis, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Fucus vesiculosus, Foeniculum vulgare, Arctostaphylos uva-ursi, Arbutus unedo, Eugenia caryophyllus, Juniperus communis, Combretum micranthum, Lippia citrodora y Tanacetum vulgare*.

Otro objeto de la invención es un extracto de una composición herbaria que comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Satureja montana, Valeriana officinalis, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Fucus vesiculosus, Foeniculum vulgare, Arctostaphylos uva-ursi, Arbutus unedo, Eugenia caryophyllus, Juniperus communis, Combretum micranthum y Lippia citrodora*.

Otro objeto de la invención es un extracto de una composición herbaria que comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum, Rosmarinus officinalis, Filipendula ulmaria, Satureja montana, Valeriana officinalis, Camellia sinensis, Vitis vinifera tinctoria, Fucus vesiculosus, Foeniculum vulgare, Arctostaphylos uva-ursi, Arbutus unedo, Eugenia caryophyllus, Juniperus communis, Combretum micranthum, Lippia citrodora y Tanacetum vulgare*.

Todas las composiciones herbarias mencionadas anteriormente también son un objeto de la invención, como productos intermedios en la preparación de los extractos correspondientes.

El extracto puede constituir el principio activo de un suplemento alimenticio, una composición nutracéutica, farmacéutica o cosmética o un alimento funcional o un aditivo alimenticio.

El extracto de la invención puede utilizarse tal cual o en forma seca o liofilizada.

Un suplemento alimenticio, una composición nutracéutica, farmacéutica, veterinaria o cosmética o un alimento funcional o un aditivo alimenticio que contiene el extracto definido anteriormente junto con excipientes adecuados son objetos adicionales de la invención.

Dicho suplemento alimenticio, una composición nutracéutica, farmacéutica, veterinaria o cosmética o un alimento funcional o un aditivo alimenticio se puede formular en cualquier forma adecuada, por ejemplo, para administración oral, incluyendo formas sólidas tales como polvos, gránulos, cápsulas, píldoras, comprimidos (de

liberación normal o controlada), gomas de mascar, o formas líquidas tales como jarabes, gotas, elixires, soluciones y suspensiones en general.

Además, el extracto según la invención puede ser incorporado en otras formulaciones, tales como cremas, pomadas, geles, leches, pastas, cremas a base de agua, emulsiones, sueros, máscaras, bálsamos, fluidos, pulverizaciones, supositorios, supositorios vaginales, parches transdérmicos y pastas dentífricas, geles periodontales, enjuagues bucales.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "composición herbaria" se refiere a un polvo que contiene una o más plantas secas molidas diferentes. El polvo de una única planta seca puede haber sido obtenido de toda la planta o formar una parte específica de la misma, por ejemplo, flores, brotes, frutos, tallos, hojas, semillas, raíces u otras.

De acuerdo con la invención, un extracto puede obtenerse mediante incubación simple de una composición herbaria con un disolvente de extracción (con o sin la adición de un azúcar) a temperatura ambiente.

Los disolventes de extracción adecuados de acuerdo con la invención son agua y todos los disolventes no acuosos autorizados para su uso en la producción de productos alimentarios e ingredientes alimentarios. Por ejemplo, de acuerdo con la Directiva 2009/32/EC, una lista de tales disolventes no acuosos incluye propano, butano, acetato de etilo, etanol, dióxido de carbono, acetona, óxido nitroso. De acuerdo con realizaciones específicas de la invención, el disolvente de extracción se selecciona entre agua, etanol, acetato de etilo y cualquier mezcla de los mismos.

De acuerdo con otra realización alternativa, un extracto puede obtenerse mediante incubación de una composición herbaria con un disolvente de extracción (con o sin la adición de un azúcar) y posterior calentamiento, con o sin centrifugación y filtración.

De acuerdo con una realización alternativa, un extracto acuoso puede obtenerse mediante incubación de una composición herbaria con agua (con o sin la adición de un azúcar) y posterior calentamiento (por ejemplo, calentando la preparación líquida resultante a una temperatura que varía de 60° C a 134° C, preferentemente de 119° C a 121° C, durante un tiempo que varía de 5 a 60 minutos, preferentemente de 20 a 30 minutos).

Pretendemos que con el término "azúcar", se entienda un azúcar de calidad farmacéutica o alimentaria, tal como por ejemplo dextrosa, lactosa, lactosa anhidra, manitol, sorbitol, maltosa, galactosa o sacarosa.

Según una realización particular de la invención, dicho azúcar es sacarosa.

Dicho azúcar puede utilizarse a concentraciones que varían de 1 a 100 g/l, opcionalmente de 50 a 75 g/l.

Con el término "suplemento alimenticio" se entiende un producto alimenticio destinado a suplementar la dieta común y que es una fuente concentrada de nutrientes, tales como vitaminas y minerales, u otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico, en forma de dosis unitaria (véase también la Directiva 2002/46/CE del 10 de junio de 2002).

Se pretende que la expresión "alimento funcional" incluya alimentos caracterizados por efectos adicionales debidos a la presencia de componentes (generalmente no nutrientes) presentes o añadidos de manera natural, que interactúan más o menos selectivamente con una o más funciones fisiológicas del organismo (biomodulación) que conducen a un efecto positivo en el mantenimiento de la salud y/o la prevención de enfermedades. Un alimento puede considerarse "funcional", si se demuestra suficientemente su influencia beneficiosa en una o más funciones del cuerpo, además de efectos nutricionales adecuados, para ser relevante para un estado de bienestar y salud, o para la reducción del riesgo de una enfermedad. Los efectos beneficiosos podrían incluirse tanto en el mantenimiento como en la promoción de un estado de bienestar o salud y/o una reducción en el riesgo de un proceso de enfermedad o enfermedad (véase AT Diplock et al: Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document, British Journal of Nutrition 1999, 81 (Supl. 1), S1-S27).

De acuerdo con la presente invención se pretende que la expresión "composición nutracéutica" signifique un producto, que no solo complementa la dieta, sino que también debería ayudar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos. Esta expresión fue consignada en 1989 por Stephen L. DeFelice (MD, fundador y presidente de la Fundación para Innovación en Medicina (FIM)) que se une a los conceptos de "nutrición" y "farmacéutico".

Se pretende que el término "excipiente", se refiera en la presente memoria a excipientes convencionales, es decir, compuestos inertes hacia el principio activo de una composición.

Los excipientes pueden dividirse en diversas clasificaciones funcionales, dependiendo del papel que se pretenda que desempeñen en la formulación resultante, por ejemplo, en formas de dosificación sólidas, pueden actuar

como diluyentes (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina), disgregantes (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica), aglutinantes (por ejemplo, PVP, HPMC), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio), deslizantes (por ejemplo, SiO₂ coloidal) o agentes aromatizantes (por ejemplo, menta, aceites de limón). En formas de dosificación líquidas pueden actuar como disolventes, codisolventes o solubilizantes (por ejemplo, propilenglicol, glicerol, etanol, sorbitol, dextrosa), agentes tamponantes (por ejemplo, fosfato sódico), agentes antimicrobianos (por ejemplo, sorbato potásico), agentes humectantes (por ejemplo, polisorbatos o Tweens), agentes antiespumantes (por ejemplo, polidimetilsiloxano-dióxido de silicio), agentes espesantes (por ejemplo, metilcelulosa o hidroxietilcelulosa) o agentes edulcorantes (por ejemplo, sorbitol, acesulfamo-K).

Como ya se ha dicho, el extracto de la invención es un agente antimicrobiano y/o antibiopelícula y se utiliza ventajosamente en el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de infecciones microbianas en seres humanos y animales.

Otro objeto de la invención es por tanto el uso del extracto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o diagnóstico de infecciones microbianas. Tal medicamento puede ser útil para seres humanos o animales.

De acuerdo con la presente invención, las expresiones "tratamiento" o "tratar" están destinadas a actividades diseñadas para curar, mitigar los síntomas o retrasar la progresión de una enfermedad o una afección patológica.

Se pretende que las expresiones "prevención" o "prever" se refieran a actividades diseñadas para minimizar la incidencia o efectos de una enfermedad o una afección patológica. Por ejemplo, en el caso de infecciones microbianas, la prevención específicamente en el presente documento significa prevenir la adhesión y colonización de microbios patógenos a células, tejidos y órganos.

Se pretende que las expresiones "diagnóstico" o "diagnosticar" se refieran a actividades diseñadas para identificar una serie de parámetros fisiológicos con el fin de evaluar la presencia y el alcance de una enfermedad o afección patológica determinada.

La expresión "agente antimicrobiano" se usará aquí para que signifique un agente que es capaz de inhibir el crecimiento de células microbianas. Si las células microbianas son células microbianas patógenas, el agente antimicrobiano puede usarse como principio activo de una composición farmacéutica o veterinaria para el tratamiento de infecciones microbianas en seres humanos o animales.

La expresión "agente antibiopelícula" se usará en el presente documento para que signifique un agente que es capaz de inhibir la formación de biopelículas por células microbianas y/o facilitar la dispersión de biopelículas preformadas. Al contrario que los agentes antimicrobianos convencionales, un agente antibiopelícula no afecta directamente a la supervivencia microbiana y, por lo tanto, la expectativa es que no se produzca fácilmente resistencia a estos agentes.

De acuerdo con la presente invención, se entiende que el término "sinérgico" se refiere a un efecto o actividad biológica (en el presente documento antimicrobiano o antibiopelícula), presentado por el extracto de una composición herbaria de la invención (es decir, que comprende al menos dos plantas secas seleccionadas entre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* y *Arcostaphylos uva-ursi*), que es mayor que la suma de los efectos o actividades de los extractos de las plantas secas individuales correspondientes.

Tal efecto o actividad biológica mayor puede ilustrarse, por ejemplo, en términos de inhibición del crecimiento planctónico (actividad antimicrobiana), en términos de inhibición de la formación de biopelículas (actividad antibiopelícula) o en términos de número de cepas, en las que se pueden identificar una o ambas de estas actividades.

Según una realización particular de la invención, las infecciones microbianas son causadas por bacterias, tales como, por ejemplo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus equi* subsp. zooepidemicus, *Streptococcus pyogenes*, o por hongos, tales como por ejemplo *Candida albicans*.

Según otra realización particular de la invención, las infecciones microbianas son causadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* o *Staphylococcus pseudintermedius*.

El *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram-positiva comensal es un patógeno líder que puede causar una amplia variedad de enfermedades en seres humanos que van desde infecciones de piel y tejidos blandos a septicemia grave, shock tóxico o neumonía. El *Staphylococcus aureus* es una causa importante de infecciones asociadas a hospital, y muchas cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* han adquirido resistencia a los antibióticos, más particularmente a la meticilina. No hay vacunas disponibles todavía, pero se están realizando esfuerzos importantes para desarrollar inmunoterapia activa y pasiva contra diversas dianas de *Staphylococcus aureus*.

Para evaluar tales actividades biológicas para el extracto de la invención y para muestras comparativas, se han usado muchas cepas diferentes y se mencionarán en la sección de Ejemplos.

En particular, para ensayar tanto la actividad antimicrobiana como antibiopelícula de los extractos de la invención se han usado las siguientes cepas bacterianas.

La ATCC 25923, también conocida como Sealle 1945, es una cepa de *Staphylococcus aureus* ampliamente utilizada en la investigación académica (se cita en 627 publicaciones a partir del octubre de 2016 (véase NIH-NCBI-Pubmed)). Su comportamiento de resistencia a antibióticos se ha caracterizado a fondo (véase, por ejemplo, Reimer L.G. et al., Antimicrob. Agents Chemother. 1981 Jun; 19(6):1050-5).

La ATCC 29213 también es una cepa de *Staphylococcus aureus* ampliamente utilizada en la investigación académica (citada en 327 publicaciones a octubre de 2016 (véase NIH-NCBI-Pubmed)). Se ha usado en la investigación de biopelículas (véase, por ejemplo, Ceri H. et al., J. Clin. Microbiol. 1999 Jun; 37(6):1771-6).

La ATCC 12228 es una cepa de *Staphylococcus epidermidis* (citada en 101 publicaciones a partir de octubre de 2016 (véase NIH-NCBI-Pubmed)). El Código de Regulaciones Federales (CRF) enumera tales cepas como el organismo de ensayo preferido para neomicina (véase también Robertson J.H. et al., Appl. Microbiol. 1971 Dec; 22(6):1164-5).

La ATCC 43300 es una cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de un estudio clínico (citado en 81 publicaciones a octubre de 2016 (véase NIH-NCBI-Pubmed)), incluyendo Lubrenko et al., J. Antimicrob. Chemother. 2008 Nov; 62(5):1065-9).

La cepa de *Staphylococcus aureus* Newman se aisló en 1952 de una infección humana y se ha usado ampliamente en modelos animales de infecciones estafilocócicas debido a su fenotipo de virulencia robusto (véase Baba T. et al., Journal of bacteriology, 190:300-310 (2008)). Al contrario que con MRSA adquirido en hospital (resistente a metilicina *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus aureus* Newman porta un puerto sólo un pequeño número de secuencias de inserción (SI) y carece de determinantes de resistencia a antibióticos conocidos.

Otras cepas usadas en los ejemplos también se usan comúnmente en investigación académica o en la industria para el control de calidad (CC). La mayoría de ellos también son resistentes a la metilicina.

Para referencia a ATCC 33591, véase Reyes N. y col., J. Antimicrob. Chemother. Agosto de 2006; 58(2):462-5, Epub 30 de mayo de 2006. Para referencia a ATCC 33592, véase Teka A. y col., BMC Complement Altern Med. Agosto de 2015 18; 15:286. Para referencia a NCTC 12493, véase Carey B.E. y col., J. Antimicrob. Chemother. Agosto de 2006; 58(2):455-7, Epub 20 de junio de 2006. Para referencia a ATCC 700698, véase Kirker K.R. y col., Int. J. Antimicrob Agents, octubre de 2015; 46(4):451-5, epub 9 de julio de 2015. Para referencia a ATCC 700699, véase Sy C.L. y col., J. Clin. Microbiol. Marzo de 2016; 54(3):565-8, Epub 16 de diciembre de 2015. Para referencia a ATCC 9144, véase Carson C.F. y col., Antimicrob. Agents Chemother. 2002 Jun; 46(6):1914-20. Para referencia a ATCC BAA-44, véase Monecke S. y col., PLoS One. 2011 Apr 6; 6(4):e17936. Para referencia a ATCC 14990, véase Bernardo T.H. y col., Scientific World Journal. 2015; 751791, Epub 2015, 3 de junio). Para referencia a ATCC 49444, véase Ramsey KJ y col., J Food Prot. (2010).). Para referencia a ATCC 60193, véase Petrikaite V y col., Medica (Kaunas). 2007; 43(8):657-63. Para referencia a ATCC 11775, véase Usman H y col., Afr J Tradit Complement Altern Med. 10 de junio de 2007; 4(4):488-94. Para referencia a ATCC 13883, véase Supardy NA y col., J Microbiol Biotechnol. 2012 Jun; 22(6):872-81. Para referencia a ATCC 33090, véase Le Marc Y y col., Int J Food Microbiol. Marzo 2002; 73(2-3):219-37. Para referencia a ATCC 19115, véase Vodnar DC., Chem Cent J. 28 de julio de 2012; 6(1):74. doi: 10.1186/1752-153X-6-74. Para referencia a ATCC 27853, véase Reimer LG y col., Antimicrob Agents Chemother. 1981 Jun; 19(6):1050-5. Para referencia a ATCC 13076, véase Fioretto F y col., Braz J Med Biol Res. agosto de 2005; 38(8):1259-65. Epub 30 de julio de 2005. Para referencia a ATCC 13311, véase Leguérinel I y col., Int J Food Microbiol. 1 de mayo de 2007; 116(1):88-95. Epub 13 de enero de 2007. Para referencia a ATCC 27336, véase Chen S y col., Appl Environ Microbiol. 2013 Jul; 79(13):4015-23. doi: 10.1128/AEM.00704-13. Epub 2013 Apr 19. Para referencia a ATCC 43079, véase Faarrow JA y Collins MD., Syst. Appl. Microbiol. 5: 483-493, 1984. Para referencia a ATCC BAA-1323, véase Svensson Mikael D y col., Microbiology 148: 3933-3945, 2002.

El suplemento alimenticio, la composición nutracéutica, farmacéutica o cosmética de la invención se puede formular adecuadamente para diferentes vías de administración. Tales vías de administración incluyen: auricular, bucal, cutánea, dental, nasal, oftálmica, oral, orofaríngeo rectal, respiratoria (inhalación), sublingual, tópica o vaginal.

Generalmente, las composiciones que comprenden los extractos de la invención se administran en una "cantidad terapéuticamente eficaz".

Para el objetivo de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, el término "que comprende" también incluye los términos "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

La cantidad de la composición administrada realmente se determinará típicamente por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que se va a tratar, la vía de administración elegida, la composición real administrada, la edad, el peso corporal y la respuesta del sujeto individual, la gravedad de los síntomas del sujeto y similares. Para cualquier composición, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, normalmente ratones, ratas, cobayas, conejos, perros o cerdos.

El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración apropiados. Dicha información puede usarse entonces para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos. En el cálculo de la Dosis Equivalente Humana (DEH) se recomienda usar la tabla de conversión proporcionada en Guidance for Industry y Reviewers document (2005, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, USA).

De acuerdo con la invención, la dosis del extracto que se va a administrar a seres humanos puede regularse en referencia a la composición herbaria usada para prepararla y, en consecuencia, la cantidad de plantas secas individuales molidas presentes en la composición herbaria. Normalmente, se usan de 0,001 a 500 g de cada planta seca molida para preparar el extracto final, opcionalmente de 0,01 a 100 g. Dicho extracto puede usarse como tal o en una forma liofilizada, seca o liofilizada en la composición final para uso humano o animal o puede diluirse adicionalmente.

La dosis eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la enfermedad o condición, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, otras terapias simultáneas, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse por experimentación rutinaria y está dentro del criterio del clínico.

El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

Otro objeto de la invención es el procedimiento de preparación del extracto de la invención. Tal procedimiento comprende esquemáticamente las siguientes etapas:

- a) triturar o moler por separado o en una mezcla al menos dos plantas secas individuales para obtener los polvos vegetales correspondientes;
- b) mezclar al menos dos polvos vegetales diferentes para obtener una composición herbaria;
- c) añadir un disolvente de extracción a dicha composición herbaria para obtener una preparación (o extracto) líquida correspondiente;
- d) incubar dicha preparación líquida a temperatura ambiente durante un tiempo que varía entre 5 y 15 minutos;
- e) calentar dicha preparación líquida a una temperatura que varía entre 60° C a 134° C durante un tiempo entre 5 a 60 minutos; opcionalmente,
- f) centrifugar, recoger el sobrenadante y filtrar el sobrenadante recogido; y, opcionalmente,
- g) concentrar y/o secar o liofilizar la preparación líquida obtenida de la etapa e) o f).

De acuerdo con la presente solicitud, la palabra "liofilizado" se referirá tanto a extractos liofilizados (deshidratados) como secados de acuerdo con la invención.

Las plantas secas individuales son productos comerciales que pueden adquirirse como parte de las colecciones de plantas secas de farmacias o tiendas de hierbas. Las listas de colecciones de plantas secas están disponibles en cada farmacia de la planta de hierbas de elección y las plantas secas disponibles en tales colecciones pueden variar de país a país.

Por ejemplo, Bélgica, Francia e Italia, decidieron en 2012 unir fuerzas para desarrollar una lista común de plantas, cuyo uso podría permitirse, siempre que los fabricantes cumplan los requisitos de calidad de la ley europea (EC Regulation 852/2004). Gracias al trabajo duro de tres expertos reconocidos (Robert Anton, Luke Delmule y Mauro Serafini) el proyecto dio como resultado el establecimiento de una lista de 1.029 plantas y 11 setas (vease la lista BelFrit en http://www.economie.gouv.fr/files/files/additions_services/dgccrf/imgs/breve/2014/documents/ha_rmonized_list_Section_A.pdf)

La invención se describirá ahora haciendo referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Lista de plantas usadas en los Ejemplos

Las plantas y partes de plantas en la siguiente lista se han usado en los diferentes Ejemplos. Por razones de concisión, cada planta se identifica mediante un código usado en todos los Ejemplos. También se indica el peso correspondiente a 200 µl (volumen de la cuchara calibrada) de polvo vegetal (Tabla 0-1). Las plantas secas de grado farmacéutico PA00 a PB12 se obtuvieron de "Pharmacie Fontgiève" (Clermont-Ferrand, Francia) y las plantas secas

de grado farmacéutico PB13 a PD08 se obtuvieron de "Pharmacie St Herem" (Clermont-Ferrand, Francia). Cuando se indica en el Ejemplo, las plantas también se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia) o de Siccarapam (Aubiat, Francia).

Tabla 0-1: Lista de plantas con códigos asociados y pesos de los polvos secos para una cuchara calibrada

Código planta	Nombre botánico	Parte usada	Peso (g)	Código planta	Nombre Botánico	Parte usada	Peso (g)
PA00	<i>Sambucus nigra</i>	Flor	0.0684	PB32	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Corteza	0.0775
PA01	<i>Piantaaga afra</i>	Semilla	0.1357	PB33	<i>Glechoma hederacea</i>	Parte aérea	0.0601
PA02	<i>Equisetum arvense</i>	Parte aérea	0.0578	PB35	<i>Cetraria islandica</i>	Parte aérea	0.0776
PA05	<i>Aloysia citrodora</i>	Hoja	0.0712	PB36	<i>Rubusidaeus</i>	Hoja	0.0553
PA06	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Raíz	0.0774	PB38	<i>Fraxinus excelsior</i>	Hoja	0.1241
PA07	<i>Camellia sinensis</i>	Hoja	0.07	PB39	<i>Lavandula angustifolia</i>	Flor	0.0207
PA08	<i>Solidago virg aurea</i>	Parte aérea	0.0394	PB41	<i>Cassia angustifolia</i>	Fruto	0.0568
PA10	<i>Taraxacum officinale</i>	Raíz	0.0585	PB42	<i>Fragaria vesca</i>	Hoja	0.0692
PA11	<i>Rheum palmatum</i>	Raíz y rizoma	0.1016	PB45	<i>Aspalathus linearis</i>	Hoja	0.0684
PA12	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hoja	0.0545	PB46	<i>Trigonella foenum graecum-</i>	Semilla	0.1342
PA13	<i>Filipendula ulmaria</i>	Flor	0.095	PB47	<i>Foeniculum vulgare</i>	Fruto	0.0818
PA14	<i>Satureja montana</i>	Hoja	0.0619	PB48	<i>Alkanna tinctoria</i>	Raíz	0.0606
PA15	<i>Calendula officinalis</i>	Pétalo	0.0383	PB49	<i>Mentha spicata</i>	Hoja	0.0694
PA16	<i>Salvia officinalis</i>	Hoja	0.0415	PB50	<i>Eupatorium cannabinum</i>	Parte aérea	0.0529
PA17	<i>Passiflora incarnata</i>	Parte aérea	0.0423	PB51	<i>Echinacea purpurea</i>	Raíz	0.0915
PA18	<i>Piantaago lanceolata</i>	Hoja	0.0626	PB55	<i>Eucalyptus globulus</i>	Hoja	0.0666
PA19	<i>Tussilago farfara</i>	Inflorescencia	0.0494	PB57	<i>Rosaxcentifolia</i>	Brote	0.0819
PA20	<i>Valeriana officinalis</i>	Raíz	0.1142	PB58	<i>Solanum dulcamara</i>	Tallo	0.0709
PA21	<i>Camellia sinensis</i>	Hoja	0.135	PB60	<i>Arbutus unedo</i>	Hoja	0.0891
PA22	<i>Vitis vinifera var. tinctoria</i>	Hoja	0.0762	PB61	<i>Borrigo officinalis</i>	Parte aérea	0.0754
PA23	<i>Thymus vulgoris</i>	Hoja	0.0373	PB76	<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Raíz	0.0571
PA24	<i>Cassia angustifolia</i>	Hoja	0.0648	PB77	<i>Cupressus sempervirens</i>	Nuez	0.0862
PA25	<i>Tilia cordata</i>	Alburno	0.0391	PB78	<i>Curcuma longa</i>	Raíz	0.0946
PA26	<i>Thymus serpyllum</i>	Parte aérea	0.0442	PB79	<i>Cuminum cyminum</i>	Fruto	0.1109

(continuación)

	Código planta	Nombre botánico	Parte usada	Peso (g)	Código planta	Nombre Botánico	Parte usada	Peso (g)
5	PA27	<i>Tilia tomentosa</i>	Bráctea	0.0775	PB81	<i>Salvia officinalis</i>	Hoja	0.0536
	PA28	<i>Rubus idaeus</i>	Hoja	0.0463	PB82	<i>Salix alba</i>	Corteza	0.0522
10	PA29	<i>Fucus vesiculosus</i>	Lámina	0.1702	PB83	<i>Saponaria officinalis</i>	Parte aérea	0.0602
	PA30	<i>Lavandula angustifolia</i>	Flor	0.0216	PB85	<i>Lythrum salicaria</i>	Parte aérea	0.0581
15	PA31	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Semilla	0.1043	PB86	<i>Citrus limon (L) Burn.f.</i>	Piel	0.098
	PA32	<i>Lotus corniculatus</i>	Parte aérea	0.0497	PB88	<i>Centella asiatica</i>	Parte aérea	0.0685
20	PA33	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Corteza	0.0814	PB92	<i>Piantaago ovata</i>	Semilla	0.1266
	PA34	<i>Viscum album</i>	Hoja	0.0783	PB97	<i>Agropyrum repens</i>	Rizoma	0.0555
25	PA35	<i>Fumaria officinalis</i>	Parte superior florecida	0.0661	PB98	<i>Cichorium intybus</i>	Hoja	0.0715
	PA36	<i>Humulus lupulus</i>	Fruto	0.0307	PB99	<i>Potentilla anserina</i>	Hoja	0.0298
	PA37	<i>Fraxinus excelsior</i>	Hoja	0.0647	PC01	<i>Quercus robur</i>	Corteza	0.06
30	PA38	<i>Cytisus scoparius</i>	Flor	0.0253	PC02	<i>Chelidonium majus</i>	Parte aérea	0.0608
	PA39	<i>Foeniculum vulgare</i>	Fruto	0.081	PC04	<i>Prunus cerasus</i>	Pedúnculo	0.0199
	PA40	<i>Origanum majorana</i>	Hoja	0.0345	PC06	<i>Asparagus officinalis</i>	Raíz	0.0812
35	PA41	<i>Citrus aurantium var. dulcis</i>	Hoja	0.0574	PC08	<i>Medicago sativa</i>	Semilla	0.113
	PA44	<i>Hyssopus officinalis</i>	Parte superior florecida	0.0677	PC11	<i>Juglans regia</i>	Hoja	0.0641
40	PA45	<i>Mentha x piperita</i>	Hoja	0.07	PC12	<i>Olea europaea</i>	Hoja	0.0561
	PA46	<i>Melissa officinalis</i>	Hoja	0.0747	PC14	<i>Myrtus communis</i>	Hoja	0.0716
	PA47	<i>Fragaria vesca</i>	Toda la planta	0.0692	PC15	<i>Trifolium rubens</i>	Flor	0.0484
45	PA48	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fruto	0.0608	PC17	<i>Curcuma zedoaria</i>	Rizoma	0.077
	PA51	<i>Morrubium vulgore</i>	Parte aérea	0.0457	PC19	<i>Vitis vinifera var. tinctoria</i>	Hoja	0.0695
50	PA52	<i>Malva sylvestris</i>	Flor	0.0355	PC20	<i>Eugenia caryophyllus</i>	Clavo de olor	0.0852
	PA53	<i>Citrus aurantium var. dulcis</i>	Pétalo	0.0851	PC21	<i>Althaea officinalis</i>	Raíz	0.0642
55	PA55	<i>Ginkgo biloba</i>	Hoja	0.0701	PC22	<i>Alpinia officinarum</i>	Rizoma	0.0658
	PA57	<i>Lamium album</i>	Flor	0.0591	PC23	<i>Ginkgo biloba</i>	Hoja	0.0775
	PA60	<i>Olea europaea</i>	Hoja	0.0572	PC24	<i>Panax ginseng</i>	Raíz lateral	0.1782
	PA61	<i>Ilex paraguariensis</i>	Hoja	0.0598	PC25	<i>Zingiber officinale</i>	Rizoma	0.078
60	PA62	<i>Artemisia vulgaris</i>	Hoja	0.0447	PC26	<i>Juniperus communis</i>	Fruto	0.0505
	PA67	<i>Epilobium parviflorum</i>	Parte aérea	0.0549	PC27	<i>Geranium robertianum</i>	Parte aérea	0.0639

65

(continuación)

	Código planta	Nombre botánico	Parte usada	Peso (g)	Código planta	Nombre Botánico	Parte usada	Peso (g)
5	PA69	<i>Chamomilla recutita</i>	Inflorescencia	0.0399	PC28	<i>Gentiana lutea</i>	Raíz	0.0992
10	PA70	<i>Sisymbrium officinale</i>	Parte aérea	0.0334	PC29	<i>Rubia tinctorium</i>	Raíz	0.0868
	PA72	<i>Asparagus officinalis</i>	Raíz	0.0523	PC32	<i>Jasminum officinale</i>	Flor	0.0616
15	PA73	<i>Pimpinella anisum</i>	Fruto	0.0993	PC33	<i>Combretum micranthum</i>	Hoja	0.0769
	PA74	<i>Ribes nigrum</i>	Fruto	0.0769	PC34	<i>Satureja montana</i>	Hoja	0.0715
	PA75	<i>Crataegus oxyacantha</i>	Parte florecida superior	0.0656	PC35	<i>Cassia angustifolia</i>	Hoja	0.0881
20	PA76	<i>Chamaemelum nobile</i>	Inflorescencia	0.0193	PC36	<i>Verbena officinalis</i>	Parte aérea	0.0603
	PA79	<i>Eucalyptus globulus</i>	Hoja	0.0703	PC37	<i>Lippia citrodora</i>	Hoja	0.0813
25	PA80	<i>Prunus cerasus</i>	Pedúnculo	0.0141	PC38	<i>Veronica officinalis</i>	Toda la planta	0.0781
	PA81	<i>Acorus calamus</i>	Rizoma	0.0631	PC41	<i>Calendula officinalis</i>	Pétalo	0.0523
	PA82	<i>Calluna vulgaris</i>	Flor	0.0493	PC42	<i>Sambucus nigra</i>	Corteza	0.0593
30	PA83	<i>Papaver rhoeas</i>	Pétalo	0.0278	PC45	<i>Solidago gigantea</i>	Parte aérea	0.0612
	PA85	<i>Cuminum cyminum</i>	Fruto	0.102	PC49	<i>Tanacetum vulgare</i>	Parte aérea	0.0577
	PA86	<i>Centaurea erythraea</i>	Parte aérea	0.0591	PC50	<i>Galium odoratum</i>	Parte aérea	0.041
35	PA88	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Fruto	0.0939	PC51	<i>Rhamnus frangula</i>	Corteza	0.0726
	PA89	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Hoja	0.0711	PC52	<i>Betula alba</i>	Corteza	0.0806
40	PA90	<i>Angelica archangelica</i>	Fruto	0.0388	PC53	<i>Verbascum thapsus</i>	Corteza	0.0435
	PA92	<i>Borago officinalis</i>	Flor	0.067	PC54	<i>Peumus boldus</i>	Hoja	0.0695
	PA93	<i>Alchemilla vulgaris</i>	Parte aérea	0.0588	PC55	<i>Centaurea cyanus</i>	Pétalo	0.0456
45	PA94	<i>Artemisia pontica</i>	Parte florecida superior	0.431	PC57	<i>Illicium verum</i>	Fruto	0.1027
	PA95	<i>Illicium verum</i>	Fruto	0.0793	PC58	<i>Mula helenium</i>	Raíz	0.0904
50	PA96	<i>Chrysanthellum americanum</i>	Parte aérea	0.0768	PC60	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Corteza	0.1374
	PA97	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Raíz	0.0853	PC61	<i>Chamaemelum nobile</i>	Flor	0.0316
55	PA98	<i>Betula pendula</i>	Hoja	0.0633	PC62	<i>Calamintha officinalis</i>	Parte aérea	0.0726
	PA99	<i>Piantaago lanceolata</i>	Parte aérea	0.0718	PC63	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Hoja	0.088
60	PB00	<i>Agropyrum repens</i>	Rizoma	0.0646	PC64	<i>Ononis spinosa</i>	Raíz	0.0832
	PB01	<i>Carum carvi</i>	Fruto	0.1089	PC65	<i>Calluna vulgaris</i>	Flor	0.0446

65

(continuación)

	Código planta	Nombre botánico	Parte usada	Peso (g)	Código planta	Nombre Botánico	Parte usada	Peso (g)
5	PB02	<i>Buxus sempervirens</i>	Hoja	0.0631	PC66	<i>Morus nigra</i>	Hoja	0.1032
10	PB03	<i>Cichorium endivia</i>	Raíz	0.1513	PC67	<i>Hypericum perforatum</i>	Parte florecida superior	0.0829
	PB04	<i>Rosa canina</i>	Fruto	0.1227	PC68	<i>Achillea millefolium</i>	Parte florecida superior	0.0332
15	PB05	<i>Silybum marianum</i>	Parte aérea	0.0502	PC70	<i>Mentha x piperita</i>	Hoja	0.071
	PB06	<i>Asperula odorata</i>	Parte aérea	0.062	PC71	<i>Melissa officinalis</i>	Hoja	0.0847
20	PB07	<i>Desmodium adscendens</i>	Hoja	0.0493	PC72	<i>Cochlearia officinalis</i>	Flor	0.0497
	PB08	<i>Combretum micranthum</i>	Hoja	0.0709	PC73	<i>Malva sylvestris</i>	Flor	0.0615
25	PB09	<i>Peumus boldus</i>	Hojas	0.0574	PC74	<i>Cynara scolymus</i>	Hoja	0.0458
	PB10	<i>Rhamnus frangula</i>	Corteza	0.0682	PC75	<i>Arnica montana</i>	Flor	0.0254
	PB11	<i>Arctium lappa</i>	Raíz	0.1166	PC76	<i>Artemisia vulgaris</i>	Parte aérea	0.0289
30	PB12	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Hoja	0.122	PC78	<i>Angelica archangelica</i>	Tutta la pianta	0.0909
	PB13	<i>Cichorium intybus</i>	Raíz	0.0924	PC79	<i>Anethum graveolens</i>	Fruto	0.1335
	PB14	<i>Fragaria vesca</i>	Rizoma	0.0529	PC82	<i>Ballota nigra</i>	Parte aérea	0.0368
35	PB15	<i>Citrus aurantium var. dulcis.</i>	Piel	0.0817	PC83	<i>Origanum majorana</i>	Hoja	0.0539
	PB16	<i>Elettaria cardamomum</i>	Fruto	0.0606	PC84	<i>Zea mays</i>	Estigma	0.0632
40	PB17	<i>Althaea officinalis</i>	Hoja	0.0302	PC86	<i>Agrimonia eupatoria</i>	Parte aérea	0.0721
	PB18	<i>Malvasylvestris</i>	Hoja	0.0809	PC88	<i>Levisticum officinale</i>	Parte aérea	0.0848
	PB19	<i>Althaea officinalis</i>	Hoja	0.0322	PC94	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fruto	0.0686
45	PB20	<i>Tilia cordata</i>	Parte florecida superior	0.0596	PC97	<i>Hieracium pilosella</i>	Parte aérea	0.0406
	PB22	<i>Betula pendula</i>	Hoja	0.0609	PC98	<i>Parietaria officinalis</i>	Parte aérea	0.0349
50	PB24	<i>Tilia cordata</i>	Alburno	0.0368	PC99	<i>Passiflora incarnata</i>	Parte aérea	0.0817
	PB25	<i>Fucus vesiculosus</i>	Lámina	0.1119	PD00	<i>Rumex patientia</i>	Raíz	0.1208
	PB26	<i>Borago officinalis</i>	Flor	0.0342	PD02	<i>Petroselinum crispum</i>	Fruto	0.1084
55	PB27	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Fruto	0.1553	PD05	<i>Urtica dioica</i>	Parte aérea	0.0584
	PB28	<i>Verbascum thapsus</i>	Flor	0.045	PD06	<i>Cola acuminata</i>	Nuez	0.1556
60	PB29	<i>Citrus aurantium</i>	Pétalo	0.0477	PD07	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Parte aérea	0.0535
	PB31	<i>Galega officinalis</i>	Parte aérea	0.0678	PD08	<i>Centaurea erythraea</i>	Parte aérea	0.058

Método para preparar las composiciones herbarias (Método A)

Cada planta seca se molió usando un molino de granos de café (Tipo 8100, SEB, Francia). El polvo obtenido (polvo vegetal) se tamizó usando un tamiz de malla de 2 mm, y se conservaba en recipientes de 60 ml (Labbox, Francia).

Se prepararon mezclas de diferentes plantas secadas molidas (o polvos vegetales) recogiendo un volumen fijo de polvo vegetal con una cuchara calibrada que permitió recoger 200 µl de polvo. El peso del volumen recogido depende del polvo vegetal específico (véase la Tabla 0-1).

Tales mezclas de diferentes plantas secas molidas (o polvos vegetales) así como plantas secas individuales se denominarán en el presente documento también como "composiciones herbarias".

Método para preparar los extractos acuosos (también denominado en esta sección de Ejemplos "muestras procesadas", "extractos" o "mezclas de extractos") (Método B)

Tales composiciones herbarias se colocaron en tubos falcon de 50 ml (Falcon, EE.UU.) y se añadieron 20 ml o 40 ml (como se indica en los Ejemplos) de solución de agua de manantial de calidad alimentaria (Volvic, Francia) que contenía 100 g/l de sacarosa de calidad alimentaria (Daddy, Francia). La elección de sacarosa y agua de calidad alimentaria en lugar de sus homólogos de calidad científica fue dictada con el objetivo de obtener una composición comestible que entra en la clase de "aromatizantes" que pueden consumirse directamente según la Regulación (CE) No 1334/2008 del 16 de diciembre de 2008 en aromatizantes y ciertos ingredientes alimenticios con propiedades aromatizantes para su uso en y sobre alimentos.

Cada tubo falcon que contenía tales preparaciones líquidas se agitó usando un mezclador vorticial (ThermoFisher, EE.UU.) durante 10 segundos, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se colocó en un autoclave (MED 12, JP Selecta, España) y se sometió a un ciclo de esterilización de 20 minutos a 119° o 121° C, como se indica. Después de enfriarse, la preparación esterilizada se mantuvo a -20° C hasta su uso.

El día de la manipulación, la preparación se descongeló a 37° C. La preparación se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min (Multifuge 35-R, Heraeus, Alemania) o se incubó a temperatura ambiente para la decantación (como se indica en los Ejemplos). Se recogieron 2 ml del sobrenadante con una jeringa de 10 ml y se filtraron usando filtros 0,2 µm (Minisart Jeringa Filters, Sartorius, Alemania) y se recogieron en un tubo Eppendorf de 2 ml. La preparación esterilizada restante se mantiene a -20° C para su uso posterior.

Las muestras así obtenidas se denominarán en el presente documento también "muestras procesadas" y se identificarán por el mismo nombre o código dado a la composición herbaria correspondiente (por ejemplo, el nombre "Mezcla[2P]-1" se utilizará para identificar una composición herbaria y el extracto correspondiente (o muestra procesada), para el que se determina una actividad biológica).

Método para determinar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula (Método C)

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó usando las cepas indicadas en cada experimento (o Ejemplo). Para cada medición, cada bacteria almacenada a -80° C en crioperlas (Servicio Técnico, Reino Unido) se coloca en placa en una placa de agar TS (caldo de soja triptico, Sigma, EE.UU.; agar, Fisherbrand, EE.UU.) y se incuba a 37° C durante la noche. Se recogen varias colonias utilizando un asa de inoculación y se suspenden en solución salina. Se mide la densidad óptica y se realiza una dilución en caldo TS para obtener una concentración de $2 \cdot 10^{5.5}$ bacterias/ml para cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius*, $2 \cdot 10^5$ bacterias/ml para *Staphylococcus epidermidis*.

La actividad biológica de cada muestra procesada se midió en placas de 96 pocillos, usando las cepas indicadas en cada experimento (o Ejemplo) y un control sin bacterias. Cada pocillo contiene 190 µl de caldo TS inoculado con $10^{5.5}$ bacterias/ml para cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius*, 10^5 bacterias/ml para *Staphylococcus epidermidis* (o a la concentración indicada en los Ejemplos para todas las demás especies) o sin bacterias para el control y la muestra procesada diluida o el control negativo (solución de sacarosa a 100 g/l sin ninguna planta) a una concentración final de 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 o a una concentración final de 1:20, 1:63 y 1:200 (como se indica en los Ejemplos).

Cada placa se incubó durante 17 horas a 37° C en una incubadora (HettCube 400, Hettich, Alemania).

Las mediciones se realizaron en base al análisis con imágenes del software ImageJ (NIH, EE.UU.) (pero se puede usar cualquier otro software equivalente) de las placas obtenidas usando un escáner de documentos comercial (V 220, Epson, Japón). Las imágenes de la placa colocada en el área de escaneo se adquieren a 600 dpi usando el software provisto del escáner. Para cada placa, se adquirieron 3 imágenes: la primera, antes de la incubación (T0), la segunda después de 17 h de incubación (Tf) y la tercera después de la tinción con cristal violeta (CV) como se describe

en Optimización del ensayo de placa de microtitulación para el ensayo de la capacidad de formación de biopelículas en diferentes serotipos de *Salmonella* (Agarwal, R.K. et al., International Food Research Journal 18(4):1493-1498, 2011).

Para cada pocillo de interés, a partir respectivamente de la primera, segunda y tercera imagen, se caracterizaron regiones circulares de diámetro, respectivamente, 14, 14 y 76 píxeles, centradas con respecto al pocillo, usando una macro ImageJ para calcular, respectivamente, el promedio de M1 y M2 de los píxeles menos intensos del 1% de la región y el promedio M3 de todos los píxeles de la región. La turbidez de la solución bacteriana en el pocillo se dedujo a partir de M1 y M2 usando una curva de referencia obtenida en un experimento independiente en el que se midió el promedio de los píxeles menos intensos del 1% de la región de 14 píxeles de diámetro de pocillos que contenían soluciones bacterianas de turbidez conocida. La densidad óptica de la solución de cristal violeta en el pocillo se dedujo a partir de M3 usando una curva de referencia obtenida en un experimento independiente en el que se midió el promedio de los píxeles de la región de 76 píxeles de diámetro a partir de pocillos que contenían soluciones de cristal violeta de densidad óptica conocida.

Para cada muestra procesada y una bacteria dada, se determinó la CIM a partir de la dilución inhibidora más alta (HID) entre las 4 ensayadas (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) de muestra procesada que evita la aparición de crecimiento visible en 17 h. "0" se asignó cuando ninguna de las diluciones analizadas estaba previniendo el crecimiento bacteriano.

Para cada pocillo que contiene la muestra procesada y una bacteria dada, el porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico de las bacterias se estableció de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Inhibición del crecimiento planctónico (\%)} = \left[1 - \frac{Tf \text{ (muestra procesada)} - T0 \text{ (muestra procesada)}}{Tf \text{ (control negativo)} - T0 \text{ (control negativo)}} \right] * 100$$

donde Tf (muestra procesada) es la turbidez de la segunda imagen del pocillo de muestra, T0 (muestra procesada) es la turbidez de la primera imagen del mismo pocillo, Tf (control negativo) es la turbidez de la segunda imagen de un pocillo que contiene las mismas bacterias sin muestra procesada, T0 (control negativo) es la turbidez de la primera imagen del mismo pocillo.

Para cada pocillo que contiene la muestra procesada y una bacteria dada, el porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas (IBF) se estableció de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la formación de biopelículas (\%)} = \left[1 - \frac{CV \text{ (muestra procesada)} - CF \text{ (muestra procesada)}}{CV \text{ (control negativo)} - CF \text{ (muestra de control)}} \right] * 100$$

donde CV (muestra procesada) es la DO de la tercera imagen del pocillo de muestra, CV (control negativo) es la DO de la tercera imagen de un pocillo que contiene las mismas bacterias sin muestra procesada, CV (muestra de control) es la DO de la tercera imagen de un pocillo que contiene la misma muestra o el control negativo a la misma dilución sin ninguna bacteria. Un valor negativo de IBF significa que la mezcla ensayada está promoviendo la formación de biopelícula.

Ejemplo 1

En este Ejemplo ilustramos actividades antimicrobianas y antibiopelículas simultáneas contra *Staphylococcus aureus* - de la composición divulgada de 2 plantas entre 3: *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Arctostaphylos uva-ursi*. Las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia).

Partiendo de estos tres polvos vegetales diferentes se prepararon seis composiciones herbarias según el método A indicado anteriormente, cuyo contenido se indica en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: composiciones herbarias de muestras procesadas

Composiciones herbarias	PA13 (cuchara sin tratar)	PA21 (cuchara sin tratar)	PB12 (cuchara sin tratar)
PA13	1		
PA21		1	
PB12			1
Mezcla [2P]-1	1	1	
Mezcla [2P]-2		1	1
Mezcla [2P]-3	1		1

Como se muestra en la Tabla 1-1, las tres primeras composiciones herbarias solo contienen un único polvo vegetal, mientras que las tres últimas composiciones contienen dos de los tres polvos vegetales diferentes.

Partiendo de cada composición herbaria indicada en la Tabla 1-1, se prepararon muestras procesadas correspondientes de acuerdo con el Método B indicado antes de usar 20 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua y que incluía la etapa de centrifugación antes de la filtración.

El porcentaje de crecimiento planctónico bacteriano y de inhibición de la formación de antibiopelículas de las muestras procesadas de las 2 mezclas de plantas y las plantas separadas asociadas de este Ejemplo 1 a una dilución 1:10 se determinaron usando las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923 y ATCC 29213, según el método C indicado anteriormente y se proporcionan en la tabla 1-2.

Tabla 1-2: Inhibición del crecimiento planctónico y la formación de biopelículas (IBF) de 2 muestras procesadas con mezcla de plantas y muestras procesadas con plantas individuales a una dilución de 1:10

		PA13	PA21	Mezcla [2P]-1
ATCC 25923	Inhibición del crecimiento planctónico	20%	26%	82%
	Inhibición de la formación de biopelículas	32%	44%	78%
ATCC 29213	Inhibición del crecimiento planctónico	16%	27%	100%
	Inhibición de la formación de biopelículas	33%	17%	85%
		PA21	PB12	Mezcla [2P]-2
ATCC 25923	Inhibición del crecimiento planctónico	26%	17%	104%
	Inhibición de la formación de biopelículas	44%	51%	88%
ATCC 29213	Inhibición del crecimiento planctónico	27%	8%	100%
	Inhibición de la formación de biopelículas	17%	28%	83%
		PA13	PB12	Mezcla [2P]-3
ATCC 25923	Inhibición del crecimiento planctónico	20%	17%	82%
	Inhibición de la formación de biopelículas	32%	51%	93%
ATCC 29213	Inhibición del crecimiento planctónico	16%	8%	66%
	Inhibición de la formación de biopelículas	33%	28%	78%

PA13, PA21 y PB12 tienen un efecto antibiótico conocido. Se midió la inhibición limitada del crecimiento planctónico (< 27 %) y la formación de biopelículas (< 51 %) a una dilución 1:10, mientras que las 3 preparaciones aromáticas de 2 extractos de mezcla de plantas muestran efectos antimicrobianos (> 66 %) y efectos antibiopelícula (> 78 %) en ambas cepas analizadas, ATCC 25923 y ATCC 29213.

Para todas las mezclas (mezcla [2P]-1, mezcla [2P]-2, mezcla [2P]-3), se observa un efecto sinérgico de las 2 plantas para los efectos antimicrobianos sobre las 2 cepas analizadas.

Ejemplo comparativo 1

Como ejemplo comparativo, se ilustra la actividad de algunas muestras procesadas, que se ha descubierto que no tienen ninguna o tienen escasas actividades antimicrobianas y antibiopelículas contra *Staphylococcus aureus* y que se obtuvieron a partir de composiciones herbarias correspondientes que contenían 2 polvos vegetales diferentes.

Se prepararon cinco muestras procesadas usando 2 polvos vegetales adicionales: PA74 (polvo de fruta de *Ribes nigrum*) y PC72 (flores en polvo de *Cochlearia officinalis*).

Los polvos vegetales secos individuales se trataron como se describe en el Ejemplo 1 y se prepararon cinco composiciones herbarias siguiendo el protocolo descrito en el Método A descrito anteriormente. Estas cinco composiciones herbarias tenían el contenido indicado en la Tabla 1-3.

Tabla 1-3: composiciones herbarias de muestras procesadas

Composiciones herbarias	PA74 (cuchara sin tratar)	PC72 (cuchara sin tratar)	PA13 (cuchara sin tratar)	PA21 (cuchara sin tratar)
PA74	1			
PC72		1		
Mezcla 1	1	1		
Mezcla 2	1		1	
Mezcla 3		1		1

Cada composición herbaria se trató siguiendo el protocolo descrito en el Método B para llegar a la muestra procesada correspondiente usando 20 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e

incluyendo la etapa de centrifugación antes de la filtración.

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó usando las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923 y ATCC 29213, según el método C descrito anteriormente.

El porcentaje de inhibición de crecimiento planctónico bacteriano y de formación de antibiopelículas de las muestras procesadas de las 2 mezclas de plantas y las plantas separadas asociadas a una dilución 1:10 se proporcionan en la Tabla 1-4.

Tabla 1-4: inhibición del crecimiento planctónico y la formación de biopelículas (IBF) de 2 muestras procesadas de mezclas de plantas y muestras procesadas de plantas individuales a una dilución de 1:10

		PC72	PA74	Mezcla 1
ATCC 25923	Inhibición del crecimiento planctónico	-9%	0%	-3%
	Inhibición de la formación de biopelículas	12%	36%	24%
ATCC 29213	Inhibición del crecimiento planctónico	-10%	-7%	-6%
	Inhibición de la formación de biopelículas	13%	5%	-2%
		PA13	PA74	Mezcla 2
ATCC 25923	Inhibición del crecimiento planctónico	20%	0%	19%
	Inhibición de la formación de biopelículas	32%	36%	48%
ATCC 29213	Inhibición del crecimiento planctónico	16%	-7%	13%
	Inhibición de la formación de biopelículas	33%	5%	37%
		PA21	PC72	Mezcla 3
ATCC 25923	Inhibición del crecimiento planctónico	26%	-9%	25%
	Inhibición de la formación de biopelículas	44%	12%	51%
ATCC 29213	Inhibición del crecimiento planctónico	27%	-10%	18%
	Inhibición de la formación de biopelículas	17%	13%	29%

PC72 y PA74 y la Mezcla 1 asociada no mostraron actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula limitada en ambas cepas probadas a una dilución 1:10. En cada caso, no se observó efecto sinérgico.

Para todas las mezclas que contenían PA13 y PA21 (Mezcla 2 y 3), no se observó ningún efecto sinérgico para los efectos antimicrobianos en las 2 cepas probadas a una dilución 1:10, cuando tales mezclas contenían también PC72 o PA74.

Es interesante observar que se sabía que ambas *Ribes nigrum* y *Cochlearia officinalis* tenían efecto antimicrobiano.

Este ejemplo comparativo ilustra que no cualquier combinación aleatoria entre plantas secas individuales que tienen actividad antimicrobiana y/o antibiopelícula conocida permite obtener un extracto acuoso, en el que se observa una actividad sinérgica.

Ejemplo 2

En este Ejemplo ilustramos actividades antimicrobianas y antibiopelículas simultáneas contra *Staphylococcus aureus* de diferentes extractos acuosos obtenidos a partir de composiciones herbarias que contienen 2 plantas entre las 3 indicadas en el ejemplo 1, cuando tales extractos acuosos se preparan de acuerdo con diferentes métodos.

Las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia).

Se prepararon veinte composiciones herbarias, cuyo contenido se indica en la Tabla 2-1, de acuerdo con el Método A indicado anteriormente.

Tabla 2-1: composiciones herbarias de muestras procesadas

Composiciones herbarias	PA13 (cuchara sin tratar)	PA21 (cuchara sin tratar)	PB12 (cuchara sin tratar)
Mezcla 1		1	1
Mezcla 2	1		1

Para cada composición herbaria, se prepararon 20 preparaciones líquidas (agua) como sigue: Los polvos recogidos se colocaron en veinte tubos falcon de 50 ml (Falcon, EE.UU.). Se añadieron 20 ml de solución de agua de manantial de calidad alimentaria (Volvic, Francia) que contenía 0, 25, 50, 75 o 100 g/l de sacarosa de calidad alimentaria (Daddy, Francia) a 4 tubos de Falcon por condición. Cada tubo falcon que contenía tales preparaciones líquidas se agitó usando un mezclador vortical (ThermoFisher, EE.UU.) durante 10 segundos, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se aplicaron 4 tratamientos de calentamiento diferentes a cada

condición:

- Infusión fría (sin calentamiento antes de la centrifugación y filtración):

Después de la incubación a temperatura ambiente, las preparaciones se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos (Multifuge 35-R, Heraeus, Alemania), se recogieron 2 ml del sobrenadante con una jeringa de 10 ml y se filtraron usando filtros 0,2 µM (Minisart Jeringa Filters, Sartorius, Alemania) y se recogieron en un tubo Eppendorf de 2 ml y se mantuvieron a -20° C hasta su uso. El día de la manipulación, la preparación se descongeló a 37° C.

- Calentamiento a 60° C durante 30 minutos:

Después de la incubación a temperatura ambiente, las preparaciones se colocaron en un autoclave (VWR, EE.UU.) y se sometieron a un ciclo de 20 minutos a 60° C. Después de enfriar, las preparaciones tratadas se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min (Multifuge 35-R, Heraeus, Alemania), se recogieron 2 ml del sobrenadante con una jeringa de 10 ml y se filtraron usando filtros de 0,2 µM (Minisart Syring Filters, Sartorius, Alemania) y se recogieron en un tubo Eppendorf de 2 ml y se mantuvieron a -20° C hasta su uso. El día de la manipulación, la preparación se descongeló a 37° C.

- Calentamiento a 119° C durante 20 minutos:

Después de la incubación a temperatura ambiente, las preparaciones se colocaron en un autoclave (VWR, EE.UU.) y se sometieron a un ciclo de esterilización de 20 minutos a 119° C. Después de enfriar, las preparaciones tratadas se mantuvieron a -20° C hasta su uso. El día de la manipulación, la preparación se descongeló a 37° C, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min (Multifuge 35-R, Heraeus, Alemania), se recogió 1 ml del sobrenadante con una jeringa de 10 ml y se filtró usando filtros 0,2 µM (Minisart Jeringa Filters, Sartorius, Alemania) y se recogió en un tubo Eppendorf de 2 ml.

Estas muestras se denominarán en el presente documento "muestra procesada".

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó usando la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, según el método C descrito anteriormente.

En la Tabla 2-2 se proporcionan el porcentaje de crecimiento planctónico bacteriano de 20 muestras procesadas, preparadas a partir de las composiciones herbarias después de cada uno de los diferentes tratamientos de calentamiento presentados anteriormente, a una dilución 1:10.

Tabla 2-2: Crecimiento planctónico de ATCC 25923 con 20 muestras procesadas a una dilución 1:10 preparadas a partir de las composiciones herbarias (Mezcla 1 y Mezcla 2 de la Tabla 2-1)

Tratamiento de temperatura	Concentración de sacarosa (g/l)	Muestras procesadas de Mezcla 1	Muestras procesadas de Mezcla 2
Infusión fría	100	-4%	48%
	75	-3%	52%
	50	-4%	31%
	25	-4%	31%
	0	1%	0%
60° C 30 min	100	0%	82%
	75	4%	83%
	50	1%	83%
	25	1%	86%
	0	-4%	16%
119° C 20min	100	103%	92%
	75	103%	91%
	50	70%	94%
	25	103%	99%
	0	96%	99%

Todas las muestras procesadas preparadas a partir de la Mezcla 1 mostraron efectos antimicrobianos sobre la ATCC 25923, solo después del tratamiento con temperatura a 119°, mientras que la Mezcla 2 mostró efectos antimicrobianos limitados (del 31 al 52% de inhibición) después de la infusión en frío para toda la concentración de sacarosa excepto para la afección sin sacarosa y después de todos los tratamientos con temperatura probados (> 82 % de inhibición) excepto para la condición sin adición de sacarosa tratada a 60° C, para la que la muestra procesada mostró solo un 16% de inhibición del crecimiento planctónico. Los tratamientos de temperatura potenciaron los efectos antimicrobianos de la Mezcla 2. El tratamiento de temperatura óptima entre los tratamientos probados para la Mezcla 1 y la Mezcla 2 fue de 119° C durante 20 minutos.

La influencia de la concentración de sacarosa sobre el efecto antimicrobiano depende del tratamiento térmico aplicado. Para la Mezcla 1 tratada a 119° C durante 20 min, se obtuvo el mismo efecto antimicrobiano con 100, 75, 25

y 0 g/l de sacarosa, se observó una menor actividad con 50 g/l. Para la Mezcla 2, se obtuvo el mismo efecto antimicrobiano independientemente de la concentración de sacarosa para el tratamiento a 119° C de temperatura.

En la Tabla 2-3 se proporciona el porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas (IFB) de 20 muestras procesadas, preparadas a partir de las composiciones herbarias después de cada uno de los diferentes tratamientos de calentamiento presentados anteriormente, a una dilución de 1:10.

Tabla 2-3: inhibición de la formación de biopelículas (IFB) de ATCC 25923 con 20 muestras procesadas a una dilución 1:10 preparadas a partir de las composiciones herbarias (Mezcla 1 y Mezcla 2 de la Tabla 2-1)

Tratamiento de temperatura	Concentración de sacarosa (g/l)	Muestras procesadas de Mezcla 1	Muestras procesadas de Mezcla 2	Tratamiento de temperatura	Concentración de sacarosa (g/l)	Muestras procesadas de Mezcla 1	Muestras procesadas de Mezcla 2
Infusión fría	100	34%	74%	119° C 20min	100	91%	89%
	75	29%	72%		75	91%	88%
	50	22%	60%		50	75%	89%
	25	30%	55%		25	92%	87%
	0	54%	50%		0	90%	89%
60° C 30 min	100	48%	91%				
	75	34%	94%				
	50	26%	91%				
	25	26%	88%				
	0	48%	78%				

En todas las condiciones probadas, las muestras procesadas mostraron algún efecto antibiopelícula.

Para la Mezcla 1, se observó actividad antibiopelícula limitada para toda la concentración de sacarosa con infusión fría y con tratamiento a temperatura de 60° C (22 a 55% de inhibición). Se observó una alta actividad antibiopelícula (>90% de inhibición) con un tratamiento a 119° C de temperatura para todas las concentraciones de sacarosa excepto para 50 g/l que mostró un 75 % de inhibición.

Para la Mezcla 2, se obtuvieron actividades antibiopelícula equivalentes independientemente de las concentraciones de sacarosa para tratamientos de temperatura de 60° C y 119° C (> 77 % de inhibición). Después de la infusión fría, la Mezcla 2 mostró un efecto antibiopelícula de medio a bueno (del 50% al 74% de inhibición) dependiendo de las concentraciones de sacarosa: cuanto más alta era la concentración de sacarosa, más activa era la preparación.

Ejemplo 3

En este Ejemplo ilustramos actividades antimicrobianas y antibiopelículas simultáneas contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* de 12 mezclas que contienen 2 a 7 plantas.

Las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia).

Se prepararon composiciones herbarias que comprendían de 2 a 7 polvos vegetales recogiendo un volumen fijo de polvo vegetal con una cuchara calibrada que permitió recoger 200 pl de polvo. Se prepararon doce composiciones herbarias como se indica a continuación (Tabla 3-1) de acuerdo con el Método A descrito previamente.

Tabla 3-1: composiciones herbarias de muestras procesadas

Composiciones herbarias	PA13 (cuchara sin tratar)	PA21 (cuchara sin tratar)	PB12 (cuchara sin tratar)	PA11 (cuchara sin tratar)	PA12 (cuchara sin tratar)	PA22 (cuchara sin tratar)	PA79 (cuchara sin tratar)
Mezcla [2P]-1	1	1					
Mezcla [2P]-2		1	1				
Mezcla [2P]-3	1		1				
Mezcla [3P]-1	1	1	1				
Mezcla [4P]-1	1	1	1	1			
Mezcla [4P]-2	1	1	1		1		
Mezcla [4P]-3	1	1	1			1	
Mezcla [5P]-1	1	1	1		1	1	
Mezcla [5P]-2	1	1	1	1		1	
Mezcla [5P]-3	1	1	1	1	1		
Mezcla [6P]-1	1	1	1	1	1	1	
Mezcla [7P]-1	1	1	1	1	1	1	1

Se prepararon doce muestras procesadas correspondientes a partir de cada composición herbaria de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 20 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de centrifugación antes de la filtración.

La actividad biológica de la muestra procesada se determinó usando las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 29213, NCTC 12493, ATCC 33591, ATCC 33592, ATCC 43300, ATCC 700698, ATCC 700699, ATCC 9144 y ATCC BAA-44 y las siguientes cepas de *Staphylococcus epidermidis*: ATCC 12228, ATCC 700296, ATCC 49461 y ATCC 14990, según el método C descrito anteriormente.

La concentración inhibidora mínima (CIM) observada con las 12 muestras procesadas se da en la Tabla 3-2 en forma de HID, así como la eficacia promedio sobre todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 3-2: HID de 12 muestras procesadas sobre 10 cepas de *Staphylococcus aureus* y 4 cepas de *Staphylococcus epidermidis*

		Mezcla[2P]-1	Mezcla[2P]-2	Mezcla[2P]-3	Mezcla[3P]-1	Mezcla[4P]-1	Mezcla[4P]-2	Mezcla[4P]-3	Mezcla[5P]-1	Mezcla[5P]-2	Mezcla[5P]-3	Mezcla[6P]-1	Mezcla[7P]-1
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	10	10	10	10	10	10	10	10	10	20	10	20
	ATCC 29213	10	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	NCTC 12493	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20
	ATCC33591	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20
	ATCC 33592	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC 43300	10	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	20
	ATCC 700698	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC 700699	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	ATCC 9144	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	10	20
	ATCC BAA-44	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20
	Promedio	10.0	10.0	8.0	11.0	11.0	13.0	13.0	17.0	17.0	18.0	14.0	19.0
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	40
	ATCC 700296	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	40
	ATCC 49461	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	ATCC 14990	10	20	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Promedio	12.5	15	15	20	20	20	20	20	20	20	20	30
	Promedio total	10.7	11.4	10.0	13.6	13.6	15.0	15.0	17.9	17.9	18.6	15.7	22.1

Dado que en este Ejemplo los HID observados están en la mayoría de los casos entre 1:10 y 1:20, se eligió 1:20 como la dilución de referencia para el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas. El porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano de las 12 muestras procesadas a una dilución 1:20 se da en la Tabla 3-3, así como la eficacia promedio sobre todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 3-3: inhibición del crecimiento planctónico de las 12 muestras procesadas en 10 cepas de *Staphylococcus aureus* y 4 cepas de *Staphylococcus epidermidis* a dilución 1:20

		Mezcla[2P]-1	Mezcla[2P]-2	Mezcla[2P]-3	Mezcla[3P]-1	Mezcla[4P]-1	Mezcla[4P]-2	Mezcla[4P]-3	Mezcla[5P]-1	Mezcla[5P]-2	Mezcla[5P]-3	Mezcla[6P]-1	Mezcla[7P]-1
S. aureus	ATCC 25923	12%	12%	9%	11%	20%	11%	20%	34%	41%	35%	21%	96%
	ATCC 29213	11%	11%	7%	11%	19%	11%	11%	33%	33%	33%	29%	45%
	NCTC 12493	19%	8%	5%	25%	21%	101%	97%	98%	108%	108%	96%	100%
	ATCC 33591	12%	8%	8%	12%	19%	16%	34%	104%	107%	111%	83%	98%
	ATCC 33592	19%	15%	12%	18%	26%	23%	26%	86%	105%	98%	38%	100%
	ATCC 43300	18%	11%	11%	15%	18%	18%	18%	33%	34%	37%	16%	97%
	ATCC 700698	11%	8%	8%	11%	11%	11%	16%	107%	97%	73%	40%	98%
	ATCC 700699	43%	36%	38%	87%	98%	99%	99%	100%	108%	112%	116%	98%
	ATCC 9144	12%	7%	8%	12%	24%	17%	24%	80%	97%	73%	43%	94%
	ATCC BAA-44	30%	11%	12%	32%	28%	83%	102%	100%	107%	110%	114%	103%
	Promedio	19%	13%	12%	23%	28%	39%	45%	78%	84%	79%	60%	93%
S. epidermidis	ATCC 12228	49%	49%	66%	94%	99%	99%	98%	99%	99%	104%	114%	97%
	ATCC 700296	87%	83%	78%	94%	99%	99%	95%	101%	98%	102%	105%	92%
	ATCC 49461	68%	68%	70%	93%	101%	101%	97%	102%	102%	106%	112%	93%
	ATCC 14990	38%	71%	61%	92%	103%	100%	95%	102%	102%	106%	107%	93%
	Promedio	61%	68%	69%	94%	100%	100%	96%	101%	100%	104%	109%	94%
	Promedio total	31%	28%	28%	43%	49%	56%	59%	84%	88%	86%	74%	93%

En la Tabla 3-4 se informa del porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas (IFB) de las 12 muestras tratadas en la dilución 1:20, así como la eficacia promedio en todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. La eficacia promedio de la inhibición del crecimiento planctónico de las bacterias y el porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en todas las cepas probadas es un buen indicador de la actividad antimicrobiana y la eficacia antibiopelícula en diversas cepas bacterianas.

Tabla 3-4: inhibición de la formación de biopelícula de 12 muestras tratadas sobre 10 cepas de *Staphylococcus aureus* y 4 cepas de *Staphylococcus epidermidis* con dilución 1:20

		Mezcla[2P]-1	Mezcla[2P]-2	Mezcla[2P]-3	Mezcla[3P]-1	Mezcla[4P]-1	Mezcla[4P]-2	Mezcla[4P]-3	Mezcla[5P]-1	Mezcla[5P]-2	Mezcla[5P]-3	Mezcla[6P]-1	Mezcla[7P]-1
S. aureus	ATCC 25923	37%	14%	22%	18%	29%	36%	35%	51%	41%	40%	38%	90%
	ATCC 29213	49%	12%	38%	27%	33%	38%	25%	35%	38%	34%	38%	41%
	NCTC 12493	49%	-6%	47%	36%	35%	88%	87%	92%	92%	89%	47%	93%
	ATCC 33591	38%	-21%	30%	16%	20%	25%	19%	92%	91%	89%	57%	93%
	ATCC 33592	51%	-10%	26%	25%	43%	47%	31%	60%	78%	70%	43%	91%
	ATCC 43300	33%	-19%	24%	2%	18%	26%	2%	-15%	-22%	-18%	-19%	68%
	ATCC 700698	27%	-8%	20%	10%	25%	23%	13%	62%	61%	39%	24%	88%
	ATCC 700699	61%	34%	63%	64%	79%	78%	86%	89%	87%	86%	87%	90%
	ATCC 9144	33%	-10%	22%	16%	21%	10%	16%	37%	59%	28%	0%	81%
	ATCC BAA-44	50%	22%	47%	40%	39%	48%	89%	92%	90%	87%	91%	93%
	Promedio	43%	1%	34%	25%	34%	42%	40%	59%	62%	54%	41%	83%
S. epidermidis	ATCC 12228	62%	-32%	78%	84%	95%	92%	92%	92%	91%	93%	96%	96%
	ATCC 700296	61%	39%	78%	73%	85%	86%	84%	80%	75%	76%	79%	87%
	ATCC 49461	18%	15%	72%	84%	90%	90%	90%	88%	88%	86%	90%	94%
	ATCC 14990	68%	39%	68%	88%	94%	91%	92%	90%	90%	89%	91%	90%
	Promedio	52%	15%	74%	82%	91%	90%	89%	87%	86%	86%	89%	92%
Promedio total		45%	5%	45%	42%	50%	56%	54%	67%	69%	63%	54%	85%

Los extractos de mezclas de 2 plantas mostraron actividad antimicrobiana completa a una dilución de 1:10 sobre 10 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas excepto para la Mezcla [2P]-3 que no tenía agente antimicrobiano a la dilución ensayada en 2 de las 10 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas (ATCC 29213 y ATCC 43300) (véase la Tabla 3-2).

Los tres extractos de mezclas de 2 plantas mostraron diferente actividad antimicrobiana en las 4 cepas de *Staphylococcus epidermidis* probadas. La mezcla [2P]-1 tenía una HID de 1:10 en 3 cepas (ATCC 12228, ATCC 49461 y ATCC 14990) y una HID de 1:20 en la cepa ATCC 700296. La mezcla [2P]-2 tenía una HID de 1:10 en 2 cepas (ATCC 12228 y ATCC 49461) y una HID de 1:20 en las otras 2 cepas (ATCC 700296 y ATCC 14990). Mientras que la Mezcla[2P]-3 tenía una HID de 1:10 en 2 cepas (ATCC 12228 y ATCC 14990) y una HID de 1:20 en las otras 2 cepas (ATCC 700296 y ATCC 49461) (véase la Tabla 3-2).

La Mezcla[3P]-1 obtenida de las 3 plantas que se incluyen en la Mezcla[2P]-1, la Mezcla[2P]-2 y la Mezcla[2P]-3, mostró una actividad antimicrobiana más amplia que las 3 mezclas de dos plantas (HID de 1:10 en 9 cepas de *Staphylococcus aureus* y HID de 1:20 sobre ATCC 700699, HID de 1:20 sobre las 4 *Staphylococcus epidermidis* probadas) (véase la Tabla 3-2). La ganancia de actividad antimicrobiana se confirma mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico de cada mezcla de plantas (véase la Tabla 3-3).

A la mezcla de 3 plantas Mezcla[3P]-1 se agregaron plantas diferentes, PA11, PA12 y PA22, para obtener tres extractos de mezclas de 4 plantas, Mezcla[4P]-1, Mezcla[4P]-2 y Mezcla[4P]-3, respectivamente. Estos extractos de mezclas de 4 plantas mostraron la misma HID o mejor HID que el extracto de mezcla de 3 plantas Mezcla[3P]-1 (véase la Tabla 3-2), y un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico: se obtiene un promedio del 28 % al 45 % con extractos de mezclas de 4 plantas en las 10 cepas de *Staphylococcus aureus* en comparación con el 23% con el extracto de mezcla de 3 plantas (véase la tabla 3-3). También mostraron un mayor porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas: se obtuvo un promedio del 34% al 42% con extractos de mezclas de 4 plantas en las 10 cepas de *Staphylococcus aureus* en comparación con el 25% con el extracto de mezcla de 3 plantas (véase la tabla 3-4).

Se prepararon 5 mezclas de plantas añadiendo 2 plantas entre las 3 plantas adicionales seleccionadas. Los

tres extractos de mezclas de 5 plantas mostraron una actividad antimicrobiana y antibiopelícula superior a la de los extractos de mezclas de 4 plantas (véanse las Tablas 3-2, 3-3 y 3-4).

La mezcla [6P]-1 consiste en las 6 plantas que se usaron para la preparación de las muestras procesadas previamente analizadas. Curiosamente, el extracto de mezcla de 6 plantas mostró menos actividad antimicrobiana y antibiopelícula que los extractos de mezclas de 5 plantas pero mayor efecto antimicrobiano y mayor a los efectos antibiopelícula equivalentes que los extractos de mezclas de 4 plantas. La actividad antimicrobiana y antibiopelícula se recuperó y mejoró mediante la adición de una nueva planta (PA79) (véanse las Tablas 3-2, 3-3 y 3-4).

El aumento del número de plantas en las mezclas permitió preparar extractos acuosos correspondientes que tenían actividad antimicrobiana y antibiopelícula mejorada y aumentó el número de cepas, en las que se pueden identificar una o ambas de estas actividades.

Ejemplo 4

En este Ejemplo ilustramos actividades antimicrobianas y antibiopelículas simultáneas contra *Staphylococcus aureus* de 196 extractos de agua obtenidos a partir de composiciones herbarias que incluyen al menos 2 plantas entre las 3 plantas descritas en el ejemplo 1 y plantas adicionales para formar mezclas de 3 a 10 plantas.

Las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Pharmacie Fontgiève"(Clermont-Ferrand Francia, plantas PA00 a PB12) y "Pharmacie St Herem" (Clermont-Ferrand, Francia, plantas PB13 a PD08).

Las 4 composiciones herbarias de referencia Mezcla[2P]-1, Mezcla[2P]-2, Mezcla[2P]-3, Mezcla[3P]-1 y las 196 nuevas composiciones herbarias se prepararon de acuerdo con el Método A descrito previamente y tenían el contenido informado en la Lista 4-1.

Lista 4-1: composiciones herbarias de muestras procesadas

Mezcla[2P]-1: PA13; PA21;
 Mezcla[2P]-2: PA21; PB12;
 Mezcla[2P]-3: PA13; PB12;
 Mezcla[3P]-1: PA13; PA21; PB12;
 Mezcla[3P]-2: PA11; PA13; PA21;
 Mezcla[3P]-3: PA21; PB12; PC63;
 Mezcla[3P]-4: PA13; PB12; PC63;
 Mezcla[3P]-5: PA13; PA21; PC63;
 Mezcla[3P]-6: PA13; PA21; PB12;
 Mezcla[3P]-7: PA21; PB12; PC29;
 Mezcla[3P]-8: PA13; PB12; PC29;
 Mezcla[3P]-9: PA13; PA21; PB12;
 Mezcla[4P]-1: PA11; PA13; PA21; PB12;
 Mezcla[4P]-2: PA12; PA13; PA21; PB12;
 Mezcla[4P]-3: PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mezcla[4P]-4: PA11; PA13; PA21; PA22;
 Mezcla[4P]-5: PA13; PA21; PB12; PC63;
 Mezcla[4P]-6: PA11; PA12; PA21; PB12;
 Mezcla[4P]-7: PA11; PA12; PA13; PB12;
 Mezcla[4P]-8: PA11; PA13; PA21; PB12;
 Mezcla[4P]-9: PA12; PA13; PA21; PB12;
 Mezcla[4P]-10: PA13; PA21; PB12; PC29;
 Mezcla[5P]-1: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mezcla[5P]-2: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mezcla[5P]-3: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12;
 Mezcla[5P]-4: PA11; PA12; PA21; PA22; PB12;
 Mezcla[5P]-5: PA11; PA12; PA13; PA22; PB12;
 Mezcla[5P]-6: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22;
 Mezcla[5P]-7: PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mezcla[5P]-8: PA13; PA21; PB12; PC29; PC63;
 Mezcla[6P]-1: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
 Mezcla[6P]-2: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mezcla[6P]-3: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mezcla[6P]-4: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12; PC63;
 Mezcla[6P]-5: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mezcla[6P]-6: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 Mezcla[6P]-7: PA11; PA12; PA21; PA22; PB12; PC63;

Mezcla[6P]-8: PA11; PA12; PA13; PA22; PB12; PC63;
 Mezcla[6P]-9: PA11; PA12; PA13; PA21; PB12; PC63;
 Mezcla[6P]-10: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PC63;
 Mezcla[6P]-11: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
 5 Mezcla[7P]-1: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PA79;
 M[7P]-2: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49;
 M[7P]-3: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC29;
 M[7P]-4: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PC63;
 M[9P]-11: PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 10 M[9P]-12: PA11; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-13: PA11; PA12; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-14: PA11; PA12; PA13; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-15: PA11; PA12; PA13; PA21; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-16: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49; PC29; PC63;
 15 M[9P]-17: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB49; PC29; PC63;
 M[9P]-18: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PC29; PC63;
 M[9P]-19: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC63;
 M[9P]-20: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29;
 M[10P]-40: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
 20 M[10P]-44: PA13; PA40; PA41; PA62; PA75; PB18; PC22; PC63; PC64; PD05;
 M[10P]-71: PA21; PA85; PB14; PB18; PB85; PC19; PC61; PC63; PD05; PD08;
 M[10P]-75: PA02; PA10; PA12; PA13; PA18; PA21; PA27; PA79; PB86; PC26;
 M[10P]-84: PA10; PA21; PA27; PB12; PB15; PC26; PC68; PD05; PD06; PD08;
 M[10P]-98: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA27; PB16; PB18; PD06;
 25 M[10P]-102: PA12; PA13; PA19; PA21; PA41; PA79; PB10; PC26; PC61; PC64;
 M[10P]-103: PA13; PA17; PA21; PA24; PB08; PB49; PB85; PC15; PC29; PD05;
 M[10P]-105: PA10; PA11; PA12; PA18; PA19; PA21; PA22; PB12; PC63; PD08;
 M[10P]-109: PA10; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PB14; PB16; PC45; PC63;
 M[10P]-112: PA08; PA13; PA15; PA17; PA18; PA21; PA27; PB18; PB41; PB81;
 30 M[10P]-115: PA13; PA20; PA21; PA22; PA62; PA79; PB08; PB19; PC15; PC61;
 M[10P]-119: PA11; PA13; PA14; PA24; PB12; PB41; PB49; PC51; PD06; PD08;
 M[10P]-123: PA10; PA13; PA15; PA20; PA21; PA75; PB12; PB18; PB49; PC63;
 M[10P]-124: PA08; PA13; PA21; PA24; PA27; PB08; PB41; PB49; PC64; PD05;
 M[10P]-125: PA13; PA14; PA19; PA21; PA75; PB12; PC15; PC26; PC61; PC63;
 35 M[10P]-129: PA08; PA12; PA18; PA21; PA41; PB08; PB85; PC63; PC64; PD08;
 M[10P]-130: PA12; PA13; PA21; PA24; PA27; PB10; PB41; PB49; PC15; PC61;
 M[10P]-132: PA12; PA20; PA21; PA24; PC15; PC26; PC61; PC63; PC64; PD08;
 M[10P]-134: PA21; PA22; PA24; PA27; PB10; PB12; PB49; PC15; PC29; PD05;
 M[10P]-136: PA10; PA11; PA12; PA13; PA18; PA21; PB16; PB18; PC26; PC29;
 40 M[10P]-140: PA13; PA15; PA21; PA24; PA62; PA79; PB10; PB12; PC63; PC64;
 M[10P]-142: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PB12; PB85; PC15; PC26; PC64;
 M[10P]-144: PA13; PA15; PA21; PA24; PA75; PB49; PC51; PC61; PC64; PD05;
 M[10P]-145: PA12; PA13; PA17; PA20; PA21; PA79; PB08; PB16; PB85; PC63;
 M[10P]-148: PA10; PA13; PA20; PA24; PB08; PB12; PB49; PC26; PC51; PC64;
 45 M[10P]-149: PA13; PA14; PA15; PA19; PA21; PB08; PB10; PB41; PC15; PC61;
 M[10P]-150: PA10; PA12; PA13; PA14; PA21; PA62; PB10; PC26; PC64; PD06;
 M[10P]-151: PA10; PA13; PA21; PA22; PA24; PA41; PB49; PC15; PC61; PC63;
 M[10P]-152: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA27; PA75; PB12; PB49; PB85;
 M[10P]-154: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC29; PC63;
 50 M[10P]-156: PA15; PA21; PA22; PB10; PB85; PC26; PC29; PC61; PC63; PC64;
 M[10P]-157: PA11; PA13; PA15; PA19; PA21; PB18; PB41; PC15; PC51; PD08;
 M[10P]-158: PA10; PA17; PA21; PA24; PA27; PA41; PB49; PC26; PC61; PC63;
 M[10P]-160: PA10; PA12; PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA24; PB12; PC26;
 M[10P]-162: PA12; PA13; PA21; PA27; PA79; PB12; PB16; PB18; PC63; PC64;
 55 M[10P]-164: PA12; PA13; PA15; PA19; PA21; PA27; PB08; PB12; PB49; PD05;
 M[10P]-165: PA13; PA15; PA22; PA75; PA79; PB12; PB18; PC15; PC26; PC29;
 M[10P]-167: PA12; PA13; PA75; PB08; PB12; PB85; PC15; PC51; PC61; PC63;
 M[10P]-168: PA11; PA13; PA17; PA21; PA27; PA62; PA79; PB16; PB49; PC64;
 M[10P]-169: PA12; PA17; PA21; PA24; PA75; PA79; PB10; PB12; PB85; PC15;
 60 M[10P]-170: PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PC26; PC29; PC63; PC64;
 M[10P]-172: PA13; PA20; PA21; PA75; PB10; PB12; PB18; PB49; PC29; PC61;
 M[10P]-173: PA10; PA12; PA13; PA14; PA19; PA20; PA21; PA79; PC15; PC63;
 M[10P]-174: PA11; PA12; PA13; PA27; PA62; PB12; PB16; PB49; PB85; PC26;
 M[10P]-175: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA75; PB10; PB49; PC15; PC63;
 65 M[10P]-176: PA11; PA13; PA21; PA24; PA62; PB12; PC15; PC26; PC61; PC64;

	M[10P]-178: PA11; PA14; PA15; PA18; PA19; PA21; PA22; PB16; PC15; PC63;
	M[10P]-180: PA08; PA11; PA12; PA13; PA15; PA17; PA21; PA62; PB12; PC63;
	M[10P]-181: PA13; PA19; PA21; PA22; PA79; PB08; PB10; PB18; PC15; PC29;
5	M[10P]-182: PA11; PA15; PA20; PA21; PA22; PA75; PB12; PC29; PC63; PC64;
	M[10P]-183: PA11; PA12; PA13; PA27; PA79; PB16; PB18; PB49; PC15; PC63;
	M[10P]-184: PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PC29;
	M[10P]-186: PA11; PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA27; PB10; PB12; PB85;
	M[10P]-188: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PA75; PA79; PB49; PC15; PC63;
	M[10P]-190: PA11; PA13; PA21; PA22; PA27; PA75; PB10; PB12; PB49; PC63;
10	M[10P]-191: PA13; PA19; PA20; PA21; PA79; PB10; PB18; PB85; PC29; PC61;
	M[10P]-192: PA12; PA13; PA19; PA21; PA27; PA75; PB12; PB49; PC63; PC64;
	M[10P]-193: PA13; PA15; PA20; PA21; PA79; PB16; PC15; PC26; PC29; PC61;
	M[10P]-194: PA11; PA17; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49; PC15; PC63; PC64;
	M[10P]-196: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB10; PB18; PC51; PC63;
15	M[10P]-197: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA24; PA79; PB49; PC61; PC64;
	M[10P]-198: PA12; PA15; PA21; PA22; PB12; PB16; PB85; PC15; PC26; PC29;
	M[10P]-199: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB12; PC15; PC63; PC64;
	M[10P]-201: PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB49; PC64;
20	M[10P]-202: PA11; PA21; PA75; PB10; PB12; PB61; PC26; PC29; PC42; PC63;
	M[10P]-205: PA11; PA13; PA19; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB41; PC63;
	M[10P]-207: PA11; PA13; PA21; PA75; PB10; PB12; PB41; PB51; PC45; PC63;
	M[10P]-209: PA12; PA13; PA21; PA24; PA75; PB12; PB16; PB49; PB60; PC15;
	M[10P]-210: PA13; PA15; PA20; PA22; PA27; PB08; PB10; PB12; PB18; PC63;
25	M[10P]-212: PA11; PA13; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB16; PC15; PC63;
	M[10P]-214: PA11; PA12; PA15; PA21; PA22; PA75; PB12; PB49; PC15; PC61;
	M[10P]-215: PA11; PA12; PA13; PA21; PA25; PB12; PC02; PC29; PC51; PC64;
	M[10P]-216: PA11; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PA85; PB18; PB49; PC49;
	M[10P]-217: PA18; PA20; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PB16; PB85; PC64;
	M[10P]-218: PA10; PA13; PA15; PA20; PA22; PA27; PB18; PB49; PC51; PC63;
30	M[10P]-219: PA12; PA13; PA15; PA19; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PC26;
	M[10P]-220: PA11; PA12; PA13; PA19; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49; PC63;
	M[10P]-221: PA13; PA15; PA19; PA20; PA21; PA41; PA75; PB12; PC15; PC60;
	M[10P]-222: PA05; PA13; PA21; PA22; PA75; PA79; PB49; PC26; PC29; PC63;
35	M[10P]-223: PA11; PA12; PA13; PA22; PA25; PA75; PB12; PB49; PC61; PC64;
	M[10P]-225: PA12; PA13; PA21; PA27; PB10; PB12; PC29; PC63; PC64; PD08;
	M[10P]-226: PA11; PA12; PA21; PA39; PA79; PB18; PB49; PB85; PC61; PC63;
	M[10P]-227: PA11; PA12; PA15; PA20; PA21; PA22; PB12; PB42; PC15; PC26;
	M[10P]-229: PA13; PA20; PA62; PA79; PB12; PB46; PB85; PC29; PC64; PD08;
40	M[10P]-230: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PB58; PC61;
	M[10P]-232: PA12; PA13; PA15; PA22; PA27; PA83; PB12; PB49; PC26; PC63;
	M[10P]-235: PA12; PA13; PA15; PA20; PA21; PA22; PC29; PC51; PC63; PC65;
	M[10P]-236: PA12; PA13; PA20; PA21; PA27; PA75; PB50; PB85; PC29; PC64;
	M[10P]-237: PA11; PA13; PA15; PA21; PA27; PA75; PB10; PB12; PC63; PC70;
45	M[10P]-239: PA10; PA11; PA12; PA20; PA21; PB10; PB41; PB49; PC63; PD08;
	M[10P]-240: PA11; PA12; PA15; PA21; PA27; PA79; PB46; PC29; PC51; PC63;
	M[10P]-241: PA11; PA14; PA20; PA21; PA22; PA75; PB12; PB18; PC15; PC29;
	M[10P]-242: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA79; PB18; PB49; PC51; PC63;
	M[10P]-244: PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA27; PB10; PB12; PC63; PC64;
	M[10P]-246: PA11; PA12; PA13; PA21; PA61; PA79; PB10; PB12; PB18; PB85;
50	M[10P]-247: PA11; PA12; PA21; PA27; PB16; PB49; PC21; PC51; PC61; PC63;
	M[10P]-248: PA11; PA13; PA14; PA19; PA21; PA75; PA79; PB14; PB49; PC15;
	M[10P]-250: PA11; PA12; PA15; PA20; PA21; PA41; PA75; PB49; PC26; PC63;
	M[10P]-251: PA12; PA13; PA21; PA22; PA27; PA79; PB10; PB12; PB13; PB16;
	M[10P]-252: PA11; PA13; PA20; PA21; PA44; PB08; PB12; PB18; PB88; PD06;
55	M[10P]-253: PA10; PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA22; PA27; PA79; PC63;
	M[10P]-255: PA11; PA13; PA21; PA75; PB12; PB18; PB49; PC15; PC26; PC63;
	M[10P]-256: PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA75; PA79; PC29; PC64;
	M[10P]-257: PA13; PA20; PA21; PA27; PB12; PB49; PB83; PC29; PC63; PD00;
	M[10P]-258: PA12; PA13; PA20; PA21; PA22; PA75; PB10; PB12; PC15; PC63;
60	M[10P]-262: PA11; PA12; PA21; PA31; PA75; PB49; PB85; PC61; PC63; PC64;
	M[10P]-264: PA21; PA24; PA27; PA31; PA79; PB10; PB18; PB49; PC15; PC63;
	M[10P]-267: PA11; PA12; PA21; PA22; PA75; PC29; PC51; PC52; PC61; PC63;
	M[10P]-268: PA11; PA12; PA13; PA15; PA27; PA75; PB10; PB12; PB45; PC64;
	M[10P]-269: PA13; PA20; PA21; PA22; PA79; PB10; PB11; PB49; PC61; PC63;
65	M[10P]-270: PA11; PA12; PA13; PA15; PA21; PA75; PB12; PB14; PB18; PC49;

M[10P]-271: PA11; PA13; PA20; PA22; PA27; PA45; PB08; PB12; PB49; PC64;
 M[10P]-272: PA13; PA21; PA24; PA79; PB10; PB12; PB41; PC15; PC29; PC63;
 M[10P]-273: PA11; PA15; PA21; PA22; PA27; PA75; PB12; PB14; PC64; PD00;
 M[10P]-274: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12; PB49; PC26; PC51; PC63; PC64;
 M[10P]-278: PA13; PA15; PA21; PA22; PA75; PA79; PB10; PB12; PB49; PC63;
 M[10P]-280: PA11; PA12; PA15; PA21; PB08; PB12; PB18; PB49; PB58; PC51;
 M[10P]-281: PA11; PA12; PA20; PA21; PA22; PA27; PA29; PA75; PB16; PC63;
 M[10P]-282: PA10; PA13; PA21; PA22; PA27; PA79; PB12; PC15; PC29; PC61;
 M[10P]-284: PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA27; PA95; PC15; PC29; PC63;
 M[10P]-285: PA11; PA13; PA14; PA21; PA79; PB10; PB12; PB18; PB49; PB82;
 M[10P]-286: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA79; PC51; PC64; PC82;
 M[10P]-287: PA12; PA13; PA19; PA20; PA75; PB10; PB12; PC26; PC63; PD08;
 M[10P]-289: PA12; PA13; PA15; PA19; PA20; PA21; PB10; PB12; PC29; PC51;
 M[10P]-290: PA11; PA12; PA13; PA22; PA27; PA75; PB85; PC29; PC63; PD07;
 M[10P]-292: PA12; PA13; PA15; PA75; PA79; PB10; PB12; PC29; PC45; PC63;
 M[10P]-293: PA00; PA11; PA12; PA13; PA21; PA27; PA75; PB18; PB85; PC26;
 M[10P]-294: PA12; PA13; PA15; PA21; PA22; PA79; PB12; PB49; PC51; PC63;
 M[10P]-296: PA11; PA13; PA15; PA17; PA21; PA62; PA79; PB10; PB12; PC63;
 M[10P]-300: PA12; PA13; PA17; PA48; PB10; PB12; PB16; PC26; PC29; PC63;
 M[10P]-301: PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA75; PB08; PC15; PC35; PC51;
 M[10P]-302: PA11; PA12; PA13; PA21; PA70; PB12; PB16; PB18; PC26; PC63;
 M[10P]-303: PA11; PA12; PA15; PA21; PA75; PA79; PB10; PB12; PC29; PC64;
 M[10P]-307: PA12; PA13; PA21; PB10; PB12; PB18; PB78; PC51; PC63; PD08;
 M[10P]-308: PA17; PA21; PA22; PA27; PB12; PB49; PB85; PC15; PC26; PC29;
 M[10P]-309: PA13; PA22; PA27; PA53; PA62; PA75; PB10; PC51; PC63; PD06;
 M[10P]-311: PA12; PA15; PA19; PA21; PA79; PB12; PB49; PC26; PC63; PC83;
 M[10P]-312: PA00; PA11; PA13; PA21; PA22; PA29; PA75; PB10; PB85; PC29;
 M[10P]-313: PA13; PA15; PA21; PA22; PA27; PA75; PB49; PC51; PC61; PC63;
 M[10P]-314: PA08; PA12; PA13; PA21; PB10; PB12; PB49; PC15; PC32; PC64;
 M[10P]-315: PA11; PA13; PA21; PA47; PA75; PB16; PB83; PC15; PC51; PC63;
 M[10P]-317: PA11; PA12; PA19; PA21; PA22; PA79; PB10; PB16; PC29; PC63;
 M[10P]-319: PA12; PA13; PA22; PA75; PA79; PA98; PB08; PB10; PB85; PC63;
 M[10P]-321: PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA22; PB49; PB85; PC55; PC63.

Los extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de tales composiciones herbarias se prepararon de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 20 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de centrifugación antes de la filtración.

La actividad biológica de la muestra procesada se determinó usando las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 y ATCC 14775, con las siguientes diluciones finales de muestras procesadas: 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 para muestras procesadas que contienen menos de 10 cucharas de polvo vegetal (M[2P] a M[9P]) o 1:20, 1:63 y 1:200 para muestras procesadas que contienen 10 cucharas de polvo vegetal (M[10P]), de acuerdo al Método C descrito previamente.

En la Tabla 4-1 se proporcionan el promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas obtenidas de las 2 plantas de Mezcla[2P]-1 a una dilución de 1:20.

Tabla 4-1: promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y de la inhibición de la formación de biopelícula, así como el porcentaje de eficacia en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas basado en Mezcla[2P]-1 a una dilución de 1:20.

(A)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-1	22%	36%
M[10P]-124	28%	47%
M[10P]-236	24%	50%
M[10P]-193	27%	54%
M[10P]-286	45%	38%
Mezcla[5P]-6	39%	45%
M[10P]-197	32%	55%
M[10P]-112	40%	49%
M[10P]-157	41%	52%
M[10P]-136	39%	55%
M[10P]-144	45%	52%
M[10P]-191	39%	57%
M[10P]-168	44%	53%
M[10P]-115	44%	54%
M[10P]-98	48%	51%
M[10P]-102	51%	54%
M[10P]-150	49%	59%
M[10P]-103	51%	58%
M[10P]-130	57%	61%
M[10P]-149	56%	63%
M[10P]-181	65%	70%

(B)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-1	22%	36%
M[10P]-75	23%	40%
M[10P]-216	22%	41%
M[10P]-256	19%	47%
M[10P]-248	14%	48%

(C)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-1	22%	36%
Mezcla[3P]-2	27%	26%
Mezcla[4P]-4	27%	29%
M[10P]-293	28%	32%
M[10P]-301	28%	28%
M[10P]-312	40%	37%

Se descubrió que 20 muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 5 o 10 plantas tenían una actividad antimicrobiana y antibiopelícula más alta que el extracto de mezcla de referencia Mezcla[2P]-1 (Tabla 4-1 A). Se descubrió que cuatro extractos de mezclas de 10 plantas tenían una mayor actividad antibiopelícula y una actividad antimicrobiana equivalente o menor (Tabla 4-1 B). Se descubrió que cinco muestras procesadas que contenían 3, 4 o 10 plantas tenían una actividad antimicrobiana superior y una actividad antibiopelícula equivalente o inferior (Tabla 4-1C).

En la Tabla 4-2 se proporcionan el promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas obtenidas de composiciones herbarias que contienen las 2 plantas de Mezcla[2P]-2 a una dilución de 1:20.

Tabla 4-2: Promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas de la muestra procesada sobre la base de Mezcla[2P]-2 a una dilución de 1:20. A) Extractos de mezclas que muestran una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula. (B) Extractos de mezclas que muestran actividad antibiopelícula y actividad antimicrobiana equivalente o inferior. (C) Extractos de mezclas que muestran actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula equivalente o inferior.

(A)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-2	12%	-3%
M[10P]-308	16%	13%
Mezcla[3P]-7	23%	9%
M[10P]-264	15%	29%
M[10P]-317	36%	9%
M[10P]-217	17%	28%
M[10P]-280	21%	27%
Mezcla[6P]-7	36%	16%
M[10P]-267	17%	36%
Mezcla[3P]-3	27%	28%
M[10P]-247	16%	40%
M[10P]-214	23%	33%
M[10P]-303	35%	22%
M[10P]-281	17%	42%
M[10P]-273	19%	41%
Mezcla[5P]-4	34%	27%
M[10P]-198	16%	46%
M[10P]-241	26%	38%
M[10P]-132	23%	41%
M[10P]-239	28%	44%
M[10P]-262	25%	48%
M[10P]-129	28%	46%
M[10P]-186	31%	44%
M[10P]-311	40%	38%
M[10P]-134	32%	48%
M[10P]-182	40%	44%
M[10P]-178	39%	45%
M[10P]-202	37%	50%
M[10P]-156	40%	48%
M[10P]-194	41%	49%
M[10P]-105	47%	44%
M[10P]-240	42%	61%
M[10P]-169	53%	57%
M[9P]-13	100%	86%

(B)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla [2P]-2	12%	-3%
M[10P]-84	9%	27%
M[10P]-158	12%	30%
M[10P]-071	11%	35%
M[10P]-227	12%	42%
M[10P]-250	11%	44%
M[10P]-226	13%	51%

(C)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-2	12%	-3%
Mezcla[4P]-6	19%	-5%

Se descubrió que 33 de las muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 3, 5, 9 o 10 plantas tenían una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula que el extracto de mezcla

de referencia Mezcla[2P]-2 (Tabla 4-2 A). Se descubrió que seis extractos de mezclas de 10 plantas tenían una actividad antibiopelícula superior y una actividad antimicrobiana equivalente o inferior (Tabla 4-2 B). Se descubrió que un extracto de mezcla de 4 plantas tenía una actividad antimicrobiana más alta y una actividad antibiopelícula equivalente (Tabla 4-2 C).

En la Tabla 4-3 se proporcionan el promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas obtenidas de composiciones herbarias que contienen las 2 plantas de Mezcla[2P]-3 a una dilución de 1:20.

Tabla 4-3: Promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y de la inhibición de la formación de biopelícula con una eficacia porcentual del 10% en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas, basado en Mezcla[2P]-3 a una dilución de 1:20. (A) Extractos de mezclas que muestran una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula. (B) Extractos de mezclas que muestran actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula equivalente o inferior.

(A)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula	(B)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-3	12%	28%	Mezcla[2P]-3	12%	28%
M[10P]-44	15%	35%	Mezcla[4P]-7	17%	5%
M[10P]-271	13%	47%	Mezcla[3P]-8	19%	14%
M[10P]-218	19%	42%	M[10P]-300	20%	15%
M[10P]-268	16%	46%	M[10P]-309	33%	2%
Mezcla[3P]-4	17%	47%			
M[10P]-210	22%	42%			
M[10P]-165	22%	42%			
Mezcla[5P]-5	29%	36%			
M[10P]-287	34%	31%			
M[10P]-148	28%	41%			
M[10P]-290	31%	39%			
M[10P]-229	15%	56%			
M[6P]-8	34%	40%			
M[10P]-319	38%	37%			
M[10P]-244	21%	56%			
M[10P]-223	23%	55%			
M[10P]-232	25%	61%			
M[10P]-119	42%	48%			
M[10P]-183	39%	51%			
M[10P]-292	47%	48%			
M[10P]-174	47%	59%			
M[10P]-167	80%	71%			
M[9P]-14	90%	83%			

Se descubrió que 23 de las muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 3, 5, 9 o 10 plantas tenían una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula que el extracto de mezcla de referencia Mezcla[2P]-3 (Tabla 4-3 A). Se descubrió que cuatro muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 3, 4 o 10 plantas tenían una actividad antibiopelícula superior y una actividad antimicrobiana equivalente o inferior (Tabla 4-3 B).

En la Tabla 4-4 se proporcionan el promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas

de las muestras procesadas obtenidas de composiciones herbarias que contienen las 3 plantas de Mezcla[3P]-1 a una dilución de 1:20.

Tabla 4-4: Promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y de la inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas, basado en Mezcla[3P]-1 a una dilución de 1:20. (A) Extractos de mezclas que muestran una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula. (B) Extractos de mezclas que muestran actividad antibiopelícula y actividad antimicrobiana equivalente o inferior. (C) Extractos de mezclas que muestran actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula equivalente o inferior.

(A)		Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
	Mezcla[3P]-1	31%	15%
	Mezcla [4P]-8	37%	20%
	Mezcla [6P]-10	33%	25%
	M[10P]-314	34%	24%
	Mezcla [4P]-2	37%	22%
	Mezcla [6P]-11	35%	27%
	Mezcla [4P]-3	41%	24%
	M[10P]-315	39%	27%
	M[10P]-284	41%	31%
	M[10P]-321	37%	39%
	M[10P]-109	36%	43%
	M[10P]-302	44%	35%
	Mezcla [5P]-8	43%	40%
	M[6P]-9	51%	35%
	M[10P]-160	35%	52%
	M[10P]-212	43%	45%
	M[10P]-274	38%	51%
	M[10P]-246	34%	56%
	M[10P]-205	42%	48%
	M[10P]-285	52%	39%
	M[10P]-201	37%	54%
	M[10P]-222	32%	59%
	Mezcla [4P]-10	52%	40%
	M[10P]-230	38%	54%
	M[10P]-220	43%	50%
	Mezcla [5P]-2	51%	42%
	Mezcla [5P]-1	50%	44%
	M[10P]-215	38%	55%
	Mezcla [6P]-6	56%	38%
	M[10P]-235	40%	54%
	M[10P]-207	43%	53%
	Mezcla[5P]-3	51%	48%

(B)		Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
	Mezcla[3P]-1	31%	15%
	Mezcla [3P]-6	16%	20%
	Mezcla [4P]-9	30%	21%
	Mezcla [3P]-9	19%	23%
	M[10P]-282	24%	26%
	Mezcla [3P]-5	29%	36%
	M[10P]-269	14%	37%
	M[10P]-278	18%	40%
	M[10P]-219	30%	42%
	M[10P]-255	20%	43%
	M[10P]-270	15%	43%
	M[10P]-251	13%	44%
	M[10P]-258	20%	44%
	M[10P]-209	21%	45%
	M[10P]-221	17%	49%
	M[10P]-253	21%	49%
	M[10P]-252	18%	50%
	M[10P]-257	18%	51%
	M[10P]-242	29%	54%

(C)		Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
	Mezcla [3P]-1	31%	15%
	Mezcla [4P]-1	37%	15%
	M[10P]-313	38%	12%

ES 2 986 293 T3

5	M[10P]-307	58%	43%
	M[10P]-289	60%	41%
	M[10P]-272	40%	62%
	M[10P]-184	48%	55%
	M[10P]-151	48%	57%
10	M[10P]-123	51%	55%
	M[6P]-1	60%	50%
	M[6P]-5	61%	51%
15	M[7P]-3	61%	54%
	M[10P]-192	57%	60%
	M[10P]-164	58%	59%
	M[7P]-1	62%	57%
20	M[10P]-296	63%	60%
	M[6P]-4	73%	51%
	Mezcla [5P]-7	64%	60%
25	M[6P]-2	68%	57%
	M[10P]-225	60%	66%
	M[10P]-188	65%	61%
30	Mezcla[4P]-5	61%	66%
	M[10P]-125	66%	62%
	M[10P]-173	65%	67%
	M[10P]-237	69%	63%
	M[7P]-3	71%	64%
35	M[10P]-294	71%	65%
	M[10P]-199	70%	69%
	M[10P]-142	71%	69%
40	Mezcla [6P]-3	72%	68%
	M[10P]-145	72%	69%
	M[10P]-180	72%	70%
	M[10P]-140	72%	71%
	M[10P]-162	73%	70%
45	M[10P]-176	74%	70%
	M[10P]-172	72%	73%
	M[10P]-152	71%	74%
	M[10P]-40	77%	68%
50	M[7P]-4	72%	76%
	M[10P]-170	80%	74%
	M[10P]-196	78%	77%
	M[10P]-190	82%	76%
55	M[10P]-154	80%	79%
	M[10P]-175	84%	77%
	M[9P]-20	93%	81%
60	M[9P]-17	95%	84%
65			

M[9P]-19	95%	86%
M[9P]-11	96%	91%
M[9P]-18	98%	89%
M[9P]-12	103%	91%
M[9P]-15	106%	88%
M[9P]-16	106%	91%

Se descubrió que 80 de las muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 4, 5, 6, 7, 9 o 10 plantas tenían una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula que el extracto de mezcla de referencia Mezcla[3P]-1 (Tabla 4-4 A). Se descubrió que 18 muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 3, 4 o 10 plantas tenían una actividad antibiopelícula superior y una actividad antimicrobiana equivalente o inferior (Tabla 4-4 B). Se descubrió que dos muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias de 4 y 10 plantas tenían una mayor actividad antimicrobiana y una actividad antibiopelícula equivalente (Tabla 4-4 C).

Ejemplo comparativo 2

Como ejemplo comparativo, se ilustran varios extractos de mezclas de 3 o 10 obtenidos de composiciones herbarias que contienen solo una planta entre las 3 plantas del Ejemplo 1 (PA13, PA21, PB12), que se ha descubierto que no tienen ninguna o tienen escasas actividades antimicrobianas y antibiopelículas contra las mismas *Staphylococcus aureus*.

Se prepararon diez composiciones herbarias, cuyo contenido se informa en la Lista 4-8, de acuerdo con el Método A descrito previamente.

Lista 4-8: composiciones herbarias de muestras procesadas

M[3P]-31: PA21; PA05; PB06;
M[3P]-35: PA21; PA76; PB50;
M[3P]-37: PA21; PB06; PB50;
M[3P]-43: PB12; PA05; PC34;
M[3P]-45: PB12; PA76; PB50;
M[10P]-65: PA01; PA08; PA25; PA29; PA37; PB12; PB50; PC15; PC37; PD05;
M[10P]-70: PA10; PA16; PA21; PA25; PA37; PA75; PB18; PB45; PC04; PC57;
M[10P]-72: PA08; PA21; PA62; PA70; PA85; PB19; PB31; PB45; PB49; PC26;
M[10P]-89: PA10; PA13; PA18; PA19; PA37; PA41; PA75; PB49; PC21; PC67;
M[10P]-306: PA15; PA21; PA22; PA62; PA75; PB18; PB49; PB85; PC49; PC61;

Se prepararon diez extractos acuosos (o muestras procesadas) a partir de las composiciones herbarias correspondientes.

El promedio en porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio en porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas para tales muestras procesadas a una dilución de 1:20 se determinaron de acuerdo con el Método C informado previamente y se proporcionan en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5: Promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas de las muestras tratadas a una dilución de 1:20.

	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-1	22%	36%
Mezcla[2P]-2	12%	-3%
Mezcla[2P]-3	12%	28%
M[3P]-45	-4%	-5%
M[3P]-35	0%	-8%

(continuación)

M[3P]-37	2%	-9%
M[3P]-31	2%	-9%
M[3P]-43	1%	-1%
M[10P]-72	3%	1%
M[10P]-70	1%	15%
M[10P]-306	10%	6%
M[10P]-65	3%	17%
M[10P]-89	10%	27%

Todas las muestras procesadas probadas, obtenidas de composiciones herbarias compuestas de 3 o 10 plantas, que incluían una planta entre las 3 plantas del Ejemplo 1 (PA13, PA21, PB12), mostraron una actividad antimicrobiana menor que los tres extractos de mezclas de 2 plantas de la Mezcla [2P]-1 de referencia (obtenida de PA13 y PA21), la Mezcla [2P]-2 (obtenida de PA21 y PB12) y la Mezcla [2P]-3 (obtenida de PA13 y PB12) y una actividad antibiopelícula menor que la Mezcla [2P]-1 y la Mezcla [2P]-3.

Ejemplo 5

En este Ejemplo, ilustramos actividades antimicrobianas y antibiopelículas simultáneas contra *Staphylococcus aureus* de 390 extractos mixtos obtenidos a partir de composiciones herbarias que comprenden al menos 2 plantas entre las 3 plantas descritas en el Ejemplo 1 (véase la tabla 1-1) y plantas adicionales para ensamblar mezclas de 9 a 20 plantas.

Las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Pharmacie Fontgieve" (Clermont-Ferrand, Francia, plantas PA00 a PB12) y "Pharmacie St Herem" (Clermont-Ferrand, Francia, plantas PB13 a PD02).

Se prepararon composiciones herbarias que contenían de 9 a 20 polvos vegetales según el Método A descrito previamente.

Las 4 composiciones herbarias de referencia Mezcla[2P]-1, Mezcla [2P]-2, Mezcla [2P]-3, Mezcla [3P]-1 y 390 nuevas composiciones herbarias se prepararon teniendo el contenido mostrado a continuación (Lista 5-3).

Lista 5-3 : composiciones herbarias de muestras procesadas Mezcla[2P]-1: PA13; PA21;

Mezcla[2P]-1: PA13; PA21;
 Mezcla[2P]-2: PA21; PB12;
 Mezcla[2P]-3: PA13; PB12;
 Mezcla[3P]-1: PA13; PA21; PB12;
 M[09P]-1: PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
 M[09P]-2: PA11; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
 M[09P]-3: PA11; PA13; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
 M[09P]-4: PA11; PA13; PA14; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
 M[09P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA23; PA67; PB12; PC27; PC60;
 M[09P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA67; PB12; PC27; PC60;
 M[09P]-7: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PB12; PC27; PC60;
 M[09P]-8: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PC27; PC60;
 M[09P]-9: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC60;
 M[09P]-10: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA23; PA67; PB12; PC27;
 M[09P]-21: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12;
 M[10P]-41: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20;
 M[10P]-303: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33;
 M[11P]-1: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA11;
 M[11P]-2: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA14;
 M[11P]-3: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA25;
 M[11P]-4: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA26;
 M[11P]-5: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA28;
 M[11P]-6: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA29;
 M[11P]-7: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA67;
 M[11P]-8: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PA75;
 M[11P]-9: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49;

M[11P]-10: PA13; PA20; PA21; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC60;
 M[11P]-11: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39;
 M[11P]-12: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21;
 5 M[12P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22;
 M[12P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29;
 M[13P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20;
 M[13P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20;
 M[14P]-1: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26;
 M[14P]-2: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49;
 10 M[15P]-1: PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA23; PA26; PA33; PB08; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
 M[15P]-5: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26; PC20;
 M[16P]-1: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55;
 PC67;
 M[16P]-2: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37;
 15 PC49;
 M[16P]-3: PA11; PA12; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37;
 PC49;
 M[16P]-5: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26; PC20;
 PA12;
 20 M[16P]-6: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49; PA14;
 PA14;
 M[17P]-1: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51;
 PC55; PC67;
 M[17P]-2: PA11; PA12; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33;
 25 PC37; PC49;
 M[17P]-3: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33;
 PC37; PC49;
 M[17P]-5: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51;
 PC55; PC67;
 30 M[17P]-4: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88;
 PC12; PC20;
 M[17P]-6: PA10; PA11; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52;
 PC60; PC71;
 M[17P]-8: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49; PA14;
 35 PA14; PA22;
 M[17P]-9: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12; PC26; PB60; PA39; PC33; PC20; PA14;
 PA14; PA21;
 M[18P]-1: PA10; PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11;
 PC52; PC60; PC71;
 40 M[18P]-2: PA11; PA11; PA12; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-3: PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-4: PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 45 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-5: PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-6: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 50 M[18P]-7: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-9: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-9: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 55 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-10: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-11: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PB12; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 60 M[18P]-12: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB60; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-13: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PC20; PC26;
 PC33; PC37; PC49;
 M[18P]-14: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC26;
 65 PC33; PC37; PC49;

M[18P]-15: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC33; PC37; PC49;
M[18P]-16: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC37; PC49;
5 M[18P]-17: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC49;
M[18P]-18: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37;
10 M[18P]-23: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[18P]-19: PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[18P]-20: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
15 M[18P]-21: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
M[18P]-22: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB60; PB88; PC12; PC20;
20 M[18P]-24: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
M[18P]-25: PA10; PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[18P]-31: PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
25 M[18P]-33: PA11; PA11; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[18P]-34: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
30 M[18P]-34: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[18P]-35: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26; PC20; PA12; PA14; PA14;
M[18P]-36: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49; PA14; PA14; PA22; PA20;
35 M[18P]-37: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12; PC26; PB60; PA39; PC33; PC20; PA14; PA14; PA21; PA29;
M[19P]-1: PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
40 M[19P]-2: PA11; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-3: PA11; PA13; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-4: PA11; PA13; PA14; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
45 M[19P]-5: PA11; PA13; PA14; PA20; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-6: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-7: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
50 M[19P]-8: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-9: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
55 M[19P]-10: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-11: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-12: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
60 M[19P]-13: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-14: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
65 M[19P]-15: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB60;

PB88; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-16: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33;
PB88; PC20; PC49; PC60;
5 M[19P]-17: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33;
PB60; PC20; PC49; PC60;
M[19P]-18: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33;
PB60; PB88; PC49; PC60;
M[19P]-19: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33;
PB60; PB88; PC20; PC60;
10 M[19P]-20: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33;
PB60; PB88; PC20; PC49;
M[19P]-21: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC12;
PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-22: PA10; PA11; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77;
15 PC11; PC52; PC60; PC71;
M[19P]-23: PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20;
PC26; PC33; PC37; PC49;
M[19P]-24: PA11; PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20;
PC26; PC33; PC37; PC49;
20 M[19P]-25: PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-26: PA10; PA10; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-27: PA10; PA10; PA11; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12;
25 PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-28: PA10; PA10; PA11; PA13; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-29: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
30 M[19P]-30: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-31: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-32: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12; PB12;
35 PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-33: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PB08; PB12; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-34: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB12; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
40 M[19P]-35: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB60; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-36: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB88; PC12; PC20;
M[19P]-37: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
45 PB12; PB60; PC12; PC20;
M[19P]-38: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC20;
M[19P]-39: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
PB12; PB60; PB88; PC12;
50 M[19P]-40: PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12;
PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-41: PA00; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12;
PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-42: PA00; PA10; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12;
55 PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-44: PA00; PA10; PA20; PA21; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12;
PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-45: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12;
PC20; PC51; PC55; PC67;
60 M[19P]-46: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12;
PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-47: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12;
PC20; PC51; PC55; PC67;
M[19P]-48: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12;
65 PC20; PC51; PC55; PC67;

[illegible]

PB38; PB60; PC37; PC52;
 M[19P]-98: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB28;
 PB38; PB60; PC37; PC52;
 5 M[19P]-100: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27;
 PB38; PB60; PC37; PC52;
 M[19P]-100: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27;
 PB28; PB60; PC37; PC52;
 M[19P]-101: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27;
 PB28; PB38; PC37; PC52;
 10 M[19P]-102: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27;
 PB28; PB38; PB60; PC52;
 M[19P]-103: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27;
 PB28; PB38; PB60; PC37;
 M[19P]-104: PC49; PC37; PA13; PA13; PA13; PA11; PA29; PA21; PB12; PC33; PA39; PA22; PA20; PC26; PC20;
 15 PA12; PA14; PA14; PB60;
 M[19P]-105: PA11; PC37; PC33; PA39; PB60; PC26; PB12; PA13; PA13; PA13; PA21; PA29; PC20; PC49; PA14;
 PA14; PA22; PA20; PA12;
 M[19P]-106: PA13; PA13; PA13; PC49; PC37; PA11; PA20; PA22; PA12; PC26; PB60; PA39; PC33; PC20; PA14;
 PA14; PA21; PA29; PB12;
 20 M[20P]-29: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA16; PA17; PA18; PA19; PA20; PA21; PA22; PA23; PA24;
 PA25; PA26; PA27; PA28; PA29;
 M[20P]-240: PA21; PA24; PA26; PA33; PA37; PA39; PA67; PB00; PB10; PB12; PB26; PB28; PB33; PB82; PB88;
 PC20; PC21; PC52; PC60; PC97;
 M[20P]-296: PA00; PA11; PA13; PA15; PA21; PA22; PA24; PA26; PA28; PA33; PA39; PA94; PB08; PB12; PB20;
 25 PB28; PB33; PB99; PC26; PC52;
 M[20P]-297: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12;
 PB60; PC20; PC37; PC49; PC98;
 M[20P]-335: PA00; PA10; PA11; PA21; PA26; PA27; PA31; PA34; PA67; PA69; PA81; PA89; PB01; PB10; PB12;
 PB25; PB58; PC11; PC86; PC97;
 30 M[20P]-340: PA11; PA13; PA15; PA18; PA21; PA26; PA34; PA36; PA69; PA79; PA95; PB00; PB05; PB07; PB25;
 PB48; PB60; PC35; PC74; PC84;
 M[20P]-349: PA10; PA11; PA13; PA16; PA20; PA33; PA69; PA94; PB07; PB08; PB12; PC01; PC27; PC28; PC49;
 PC50; PC53; PC55; PC60; PC67;
 M[20P]-371: PA05; PA14; PA15; PA21; PA22; PA23; PA25; PA27; PA32; PA34; PA35; PA57; PA72; PA89; PB12;
 35 PB39; PB88; PC20; PC55; PC74;
 M[20P]-374: PA06; PA13; PA21; PA24; PA25; PA26; PA27; PA57; PB12; PB24; PB28; PB29; PB35; PB38; PB61;
 PC11; PC37; PC54; PC74; PC86;
 M[20P]-375: PA11; PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA28; PA29; PA67; PA81; PB10; PB12; PB26; PB28; PC23;
 PC52; PC58; PC60; PC73; PC98;
 40 M[20P]-377: PA07; PA10; PA11; PA13; PA14; PA21; PA22; PA24; PA29; PA32; PA33; PA35; PA57; PB10; PB28;
 PB36; PB82; PC49; PC52; PC94;
 M[20P]-380: PA13; PA15; PA16; PA21; PA24; PA28; PA33; PA38; PA40; PA72; PB12; PB26; PB27; PB82; PC14;
 PC33; PC55; PC57; PC58; PC98;
 M[20P]-382: PA00; PA12; PA13; PA16; PA21; PA24; PA25; PA26; PA28; PA29; PA35; PA57; PA75; PB33; PB88;
 45 PC14; PC24; PC36; PC58; PC66;
 M[20P]-383: PA10; PA21; PA22; PA23; PA25; PA27; PA81; PA85; PB12; PB26; PB28; PB39; PB77; PB82; PC01;
 PC17; PC37; PC50; PC52; PC67;
 M[20P]-386: PA13; PA14; PA28; PA29; PA33; PA35; PA40; PA57; PA67; PA79; PA88; PB00; PB01; PB07; PB12;
 PB33; PB77; PB85; PC50; PC66;
 50 M[20P]-387: PA00; PA05; PA10; PA21; PA23; PA24; PA29; PA40; PA94; PA99; PB12; PB82; PB88; PB99; PC11;
 PC20; PC24; PC34; PC37; PC61;
 M[20P]-388: PA12; PA13; PA14; PA15; PA20; PA21; PA26; PA29; PA35; PA40; PA67; PA89; PA98; PB12; PB33;
 PC01; PC14; PC58; PC68; PC88;
 M[20P]-392: PA11; PA14; PA21; PA23; PA26; PA29; PA30; PA57; PA81; PA85; PA94; PB03; PB07; PB12; PB29;
 55 PC33; PC51; PC53; PC71; PC73;
 M[20P]-396: PA05; PA14; PA15; PA17; PA21; PA28; PA29; PA35; PA37; PA39; PA40; PA69; PA72; PA89; PB10;
 PB12; PC34; PC67; PC71; PC97;
 M[20P]-401: PA13; PA15; PA16; PA23; PA26; PA29; PA33; PA34; PA85; PB12; PB26; PB33; PC21; PC50; PC52;
 PC53; PC55; PC58; PC67; PC71;
 60 M[20P]-403: PA13; PA14; PA20; PA22; PA24; PA26; PA33; PA35; PB08; PB12; PB26; PB33; PB50; PB61; PC21;
 PC27; PC37; PC52; PC54; PC58;
 M[20P]-407: PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA48; PA51; PA57; PA67; PA75; PA94; PB07; PB12; PC21; PC34;
 PC41; PC51; PC53; PC55; PC97;
 M[20P]-408: PA11; PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA21; PA22; PA25; PA26; PA27; PA28; PA29; PB10; PB26;
 65 PC20; PC21; PC24; PC25; PC58;

M[20P]-409: PA10; PA15; PA21; PA28; PA35; PA69; PA89; PA94; PA98; PB07; PB12; PB28; PB35; PB36; PC11;
 PC23; PC49; PC52; PC73; PC98;
 M[20P]-416: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33;
 PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
 5 M[20P]-418: PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA24; PA26; PA39; PB07; PB12; PB38; PC11; PC12;
 PC20; PC23; PC24; PC49; PC55;
 M[20P]-420: PA10; PA14; PA21; PA22; PA23; PA29; PA30; PA33; PA37; PB01; PB12; PB26; PB33; PB99; PC20;
 PC21; PC36; PC37; PC73; PC98;
 M[20P]-421: PA13; PA15; PA21; PA25; PA26; PA29; PA39; PA40; PA75; PA94; PB20; PB55; PB82; PC06; PC20;
 10 PC24; PC49; PC71; PC74; PC99;
 M[20P]-422: PA10; PA11; PA13; PA18; PA21; PA23; PA25; PA29; PA33; PA57; PA70; PB01; PB07; PB12; PB88;
 PC11; PC27; PC33; PC55; PC97;
 M[20P]-427: PA06; PA13; PA15; PA21; PA24; PA25; PA27; PA29; PA33; PA75; PA98; PB00; PB28; PB60; PC11;
 PC20; PC26; PC50; PC55; PC74;
 15 M[20P]-429: PA11; PA19; PA21; PA23; PA26; PA33; PA40; PA75; PB00; PB03; PB12; PB60; PC11; PC21; PC24;
 PC26; PC36; PC37; PC68; PC98;
 M[20P]-430: PA00; PA07; PA13; PA23; PA26; PA27; PA34; PA40; PA75; PB07; PB12; PB18; PB28; PB88; PC20;
 PC41; PC66; PC67; PC71; PC97;
 M[20P]-431: PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA15; PA18; PA21; PA22; PA25; PA28; PA33; PA81; PB09; PB32;
 20 PB33; PB38; PC11; PC33; PC52;
 M[20P]-432: PA12; PA14; PA19; PA21; PA24; PA26; PA33; PA67; PB05; PB09; PB12; PB28; PB32; PB46; PB60;
 PC20; PC49; PC58; PC71; PC73;
 M[20P]-435: PA10; PA13; PA14; PA15; PA21; PA28; PA33; PA40; PA55; PA57; PB07; PB12; PB58; PB88; PB99;
 PC12; PC21; PC29; PC66; PC67;
 25 M[20P]-439: PA10; PA13; PA16; PA21; PA24; PA27; PA29; PA34; PA40; PA60; PA75; PB12; PB27; PB35; PB38;
 PC25; PC26; PC36; PC51; PC55;
 M[20P]-443: PA00; PA10; PA13; PA15; PA17; PA20; PA29; PA33; PA35; PA40; PB07; PB12; PB26; PB27; PB82;
 PC12; PC24; PC50; PC60; PD02;
 M[20P]-444: PA11; PA13; PA14; PA18; PA21; PA24; PA28; PA39; PA40; PA57; PA60; PA67; PA88; PB20; PB85;
 30 PB88; PC06; PC52; PC57; PC58;
 M[20P]-445: PA11; PA13; PA17; PA20; PA21; PA29; PA30; PA33; PA35; PA40; PA57; PB00; PB12; PB28; PB60;
 PC11; PC20; PC35; PC50; PC51;
 M[20P]-446: PA13; PA15; PA16; PA21; PA22; PA23; PA25; PA26; PA27; PA29; PA39; PA67; PA75; PB12; PB26;
 PB27; PC36; PC49; PC60; PC98;
 35 M[20P]-447: PA11; PA13; PA17; PA19; PA24; PA28; PA30; PA33; PA39; PA40; PA57; PA92; PB07; PB08; PB12;
 PB33; PB61; PB85; PC58; PC94;
 M[20P]-449: PA10; PA11; PA13; PA14; PA15; PA20; PA21; PA24; PA28; PA40; PA67; PA75; PA95; PB12; PB20;
 PB35; PC14; PC20; PC52; PC60;
 M[20P]-453: PA10; PA13; PA15; PA18; PA21; PA25; PA29; PA34; PA35; PA67; PA93; PB06; PB07; PB09; PB12;
 40 PB20; PB26; PB35; PB99; PC55;
 M[20P]-455: PA00; PA00; PA11; PA11; PA13; PA14; PA18; PA20; PA25; PA28; PA33; PA70; PA75; PB00; PB12;
 PC20; PC23; PC26; PC67; PC67;
 M[20P]-456: PA14; PA21; PA33; PA34; PA39; PB00; PB07; PB07; PB12; PB27; PB28; PB38; PB88; PC20; PC23;
 PC26; PC49; PC58; PC67; PC71;
 45 M[20P]-457: PA00; PA10; PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA29; PA29; PA57; PA67; PB02; PB07; PB09; PB12;
 PB38; PC11; PC60; PC97; PC98;
 M[20P]-458: PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA18; PA21; PA26; PA33; PA57; PA75; PA98; PB12; PB33; PB33;
 PB38; PB82; PC20; PC55; PC73;
 M[20P]-459: PA00; PA06; PA21; PA26; PA26; PA29; PA33; PA75; PB10; PB10; PB12; PB18; PB32; PB85; PC20;
 50 PC24; PC49; PC55; PC66; PC98;
 M[20P]-461: PA06; PA21; PA29; PA29; PA33; PA33; PA39; PA57; PA67; PB07; PB07; PB12; PB26; PB32; PB32;
 PB85; PC20; PC27; PC52; PC58;
 M[20P]-465: PA11; PA11; PA13; PA16; PA21; PA22; PA27; PA29; PA33; PA69; PB07; PB26; PB28; PB32; PB77;
 PB88; PB88; PC23; PC60; PC73;
 55 M[20P]-467: PA00; PA06; PA21; PA21; PA23; PA26; PA33; PA33; PA40; PA67; PB12; PB38; PB88; PC11; PC23;
 PC23; PC27; PC55; PC71; PC97;
 M[20P]-469: PA00; PA12; PA13; PA13; PA21; PA29; PA33; PA33; PA34; PA57; PB07; PC11; PC11; PC20;
 PC23; PC23; PC55; PC74; PC97;
 M[20P]-470: PA13; PA14; PA21; PA21; PA22; PA23; PA24; PA24; PA27; PA29; PA33; PA67; PA75; PB07; PB07;
 60 PB33; PB33; PB77; PC37; PC52;
 M[20P]-472: PA10; PA10; PA11; PA13; PA21; PA25; PA25; PA28; PA33; PA39; PB07; PB12; PB88; PC12; PC12;
 PC20; PC20; PC24; PC55; PC71;
 M[20P]-474: PA00; PA13; PA20; PA21; PA26; PA28; PA29; PA33; PA57; PA67; PA81; PA81; PA98; PB02; PB12;
 PB38; PB60; PB88; PC11; PC20;
 65 M[20P]-475: PA11; PA12; PA12; PA13; PA28; PA28; PA29; PA29; PA32; PA52; PA52; PA75; PA81; PB12; PB20;

PB33; PB60; PC21; PC49; PC51;
 M[20P]-478: PA15; PA16; PA21; PA21; PA21; PA23; PA25; PA32; PA34; PA39; PB12; PB77; PB85; PB88; PB88;
 PB88; PB88; PC11; PC33; PC37;
 M[20P]-479: PA10; PA11; PA13; PA13; PA18; PA20; PA21; PA28; PA32; PA40; PA67; PA69; PB07; PB07; PB10;
 5 PB12; PB20; PC55; PC60; PC98;
 M[20P]-480: PA00; PA06; PA13; PA22; PA23; PA26; PA26; PA27; PA29; PA40; PA81; PB07; PB10; PB10; PB12;
 PB12; PB18; PB32; PC49; PC71;
 M[20P]-481: PA11; PA13; PA26; PA29; PA29; PA35; PA69; PA75; PA75; PB02; PB12; PB33; PC20; PC23; PC23;
 PC37; PC41; PC50; PC52; PC98;
 10 M[20P]-482: PA06; PA10; PA11; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA25; PA26; PA28; PA39;
 PA67; PB12; PC11; PC24; PC74;
 M[20P]-484: PA11; PA13; PA23; PA28; PA29; PA29; PA35; PA39; PA40; PA60; PA75; PA98; PB02; PB12; PB38;
 PB38; PB82; PC20; PC35; PC50;
 M[20P]-485: PA13; PA14; PA14; PA21; PA21; PA21; PA26; PA26; PA26; PA26; PA29; PA29; PA52; PA57; PB00;
 15 PC11; PC11; PC21; PC51; PC67;
 M[20P]-486: PA11; PA13; PA23; PA24; PA35; PA35; PA35; PA69; PA69; PA75; PB07; PB12; PB27; PC20; PC20;
 PC21; PC23; PC50; PC55; PC73;
 M[20P]-490: PA10; PA11; PA11; PA14; PA21; PA24; PA26; PA26; PA39; PA40; PA69; PA75; PB00; PB01; PB12;
 PB12; PB18; PB28; PB60; PC20;
 20 M[20P]-493: PA06; PA14; PA20; PA21; PA21; PA28; PA29; PA33; PA69; PA81; PA98; PB12; PB38; PB60; PC11;
 PC12; PC49; PC55; PC71; PD02;
 M[20P]-494: PA06; PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA15; PA23; PA26; PA35; PB01; PB12; PB60; PC12; PC20;
 PC37; PC41; PC49; PC49; PC52;
 M[20P]-495: PA10; PA10; PA13; PA14; PA18; PA20; PA21; PA26; PA29; PA29; PA57; PB02; PC11; PC11; PC20;
 25 PC20; PC24; PC33; PC49; PC49;
 M[20P]-496: PA00; PA18; PA21; PA24; PA26; PA27; PA29; PA39; PA39; PA52; PA69; PA70; PA98; PB00; PB02;
 PB12; PC12; PC24; PC55; PC67;
 M[20P]-497: PA11; PA11; PA13; PA13; PA15; PA21; PA23; PA24; PA25; PA26; PA28; PA39; PA52; PA67; PB00;
 PB12; PB27; PB28; PC12; PC37;
 30 M[20P]-499: PA13; PA21; PA21; PA21; PA29; PA30; PA69; PA75; PB07; PB07; PB07; PB60; PC20; PC20; PC21;
 PC37; PC37; PC49; PC55; PD02;
 M[20P]-503: PA06; PA06; PA10; PA10; PA13; PA13; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA39; PA70; PB28;
 PC11; PC20; PC23; PC49; PC97;
 M[20P]-506: PA11; PA16; PA21; PA23; PA29; PA39; PA57; PB12; PB27; PB32; PB88; PB88; PB88; PC12; PC20;
 35 PC21; PC37; PC71; PD02; PD02;
 M[20P]-510: PA13; PA21; PA25; PA26; PA27; PA33; PA39; PA40; PA69; PA81; PB01; PB28; PB60; PB85; PB88;
 PC27; PC41; PC41; PC50; PC55;
 M[20P]-514: PA11; PA12; PA13; PA13; PA21; PA21; PA28; PA29; PA33; PA35; PA39; PA40; PA40; PA67; PA67;
 PB12; PC14; PC20; PC41; PC55;
 40 M[20P]-516: PA07; PA10; PA13; PA14; PA17; PA21; PA28; PA29; PA39; PA40; PA40; PA69; PB07; PB12; PC21;
 PC21; PC27; PC37; PD02; PD02;
 M[20P]-520: PA11; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA29; PA33; PA33; PA57; PA67; PA70; PA98; PB12; PC20;
 PC23; PC33; PC52; PC55; PD02;
 M[20P]-523: PA10; PA11; PA18; PA20; PA21; PA33; PA39; PA67; PA67; PA69; PB07; PB12; PB28; PB88; PB88;
 45 PC21; PC33; PC35; PC49; PC50;
 M[20P]-524: PA00; PA11; PA11; PA12; PA13; PA20; PA29; PA40; PB07; PB12; PB28; PB38; PB60; PB60; PB77;
 PC20; PC20; PC49; PC49; PC98;
 M[20P]-525: PA11; PA11; PA13; PA15; PA21; PA26; PA26; PA27; PA28; PA29; PA29; PA30; PA40; PA52; PA75;
 PB07; PB07; PC11; PC33; PC37;
 50 M[20P]-527: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26; PA26; PA26; PA33; PB08; PB12;
 PB12; PB60; PB88; PC12; PC20;
 M[20P]-532: PA14; PA20; PA20; PA21; PA22; PA25; PA26; PA27; PA28; PA29; PA33; PA40; PA75; PB00; PB12;
 PB12; PB60; PB85; PC12; PC51;
 M[20P]-533: PA13; PA21; PA26; PA27; PA27; PA28; PA32; PA60; PA70; PA75; PB18; PB32; PB38; PC23; PC41;
 55 PC50; PC50; PC51; PC52; PC97;
 M[20P]-535: PA11; PA21; PA26; PA28; PA29; PA29; PA29; PA34; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB33; PB60;
 PC20; PC20; PC51; PC55; PC67;
 M[20P]-536: PA00; PA10; PA11; PA12; PA12; PA13; PA14; PA23; PA29; PA29; PA35; PA40; PA81; PB07; PB07;
 PB12; PB27; PB33; PB60; PC20;
 60 M[20P]-538: PA21; PA23; PA25; PA26; PA27; PA28; PA75; PB07; PB12; PB27; PB32; PB88; PC11; PC11; PC12;
 PC20; PC33; PC49; PC55; PC97;
 M[20P]-541: PA10; PA11; PA13; PA20; PA24; PA28; PA29; PA67; PA70; PB10; PB12; PB77; PC20; PC20; PC23;
 PC41; PC51; PC52; PC52; PC97;
 M[20P]-548: PA10; PA13; PA14; PA14; PA22; PA27; PA27; PA28; PA29; PA29; PA33; PA39; PB10; PB12; PB60;
 65 PB88; PC20; PC37; PC50; PC55;

M[20P]-551: PA12; PA13; PA13; PA20; PA22; PA23; PA24; PA24; PA26; PA33; PA33; PA39; PA67; PB07; PB07; PB12; PB33; PC20; PC55; PC98;
M[20P]-552: PA06; PA11; PA11; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA21; PA21; PA24; PA35; PB00; PB02; PB12; PB60; PB60; PC12; PC21; PC98;
5 M[20P]-555: PA00; PA10; PA11; PA18; PA20; PA20; PA21; PA25; PA26; PA26; PA39; PA39; PA39; PA89; PB12; PB12; PC20; PC20; PC49; PC74;
M[20P]-557: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12; PB12; PB12; PB12; PC11; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
10 M[20P]-559: PA00; PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA24; PA25; PA25; PA26; PA28; PA57; PA70; PA70; PB07; PB12; PB88; PB88; PC11; PC60;
M[20P]-560: PA10; PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA25; PA28; PA28; PA29; PA67; PB12; PB38; PB60; PC24; PC35; PC41; PC51; PC97;
M[20P]-563: PA12; PA13; PA20; PA20; PA21; PA24; PA25; PA25; PA29; PA29; PA33; PA81; PB33; PB60; PB60; PB88; PB88; PC11; PC41;
15 M[20P]-564: PA07; PA13; PA13; PA21; PA26; PA37; PA39; PA67; PA67; PB02; PB07; PB07; PB12; PB12; PB28; PC12; PC37; PC97; PC97; PC97;
M[20P]-565: PA07; PA11; PA13; PA20; PA29; PA29; PA32; PA75; PA95; PA98; PB02; PB12; PB32; PB33; PB60; PB85; PC20; PC24; PC35; PC41;
20 M[20P]-567: PA10; PA13; PA14; PA16; PA21; PA26; PA28; PA75; PA81; PB07; PB07; PB12; PB88; PC23; PC24; PC24; PC33; PC52; PC55; PC67;
M[20P]-569: PA13; PA14; PA21; PA26; PA27; PA39; PA57; PA67; PB02; PB07; PB12; PB28; PC12; PC21; PC49; PC55; PC55; PC67; PC67; PC98;
M[20P]-572: PA13; PA14; PA21; PA27; PA29; PA33; PA67; PA69; PA79; PB00; PB01; PB12; PB33; PB38; PC37; PC41; PC49; PC51; PC55; PD02;
25 M[20P]-573: PA10; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
M[20P]-574: PA13; PA21; PA22; PA23; PA25; PA29; PA35; PA67; PB01; PB12; PB12; PB35; PB88; PC24; PC37; PC37; PC51; PC52; PC52; PC66;
30 M[20P]-575: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA26; PA26; PA28; PA52; PA67; PB00; PB12; PB27; PB28; PB38; PB60; PC37; PC52;
M[20P]-576: PA11; PA11; PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
M[20P]-577: PA06; PA13; PA13; PA14; PA22; PA22; PA23; PA26; PA28; PA69; PA70; PB07; PB12; PB12; PB32; PC12; PC20; PC24; PC24; PC98;
35 M[20P]-579: PA12; PA13; PA13; PA13; PA14; PA26; PA26; PA28; PA57; PA81; PB02; PB07; PB12; PC11; PC12; PC20; PC51; PC55; PD02; PD02;
M[20P]-580: PA00; PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA21; PA25; PA26; PA26; PA33; PA75; PA75; PA75; PB28; PB88; PC20; PC76; PC98; PC98;
40 M[20P]-581: PA10; PA11; PA13; PA21; PA22; PA25; PA29; PA67; PB07; PB60; PB88; PB88; PC20; PC21; PC24; PC37; PC41; PC55; PC66; PC98;
M[20P]-582: PA10; PA11; PA12; PA13; PA20; PA21; PA23; PA25; PA39; PA75; PB07; PB07; PB38; PB38; PB60; PB60; PC20; PC24; PC41; PC66;
45 M[20P]-583: PA11; PA13; PA14; PA23; PA25; PA25; PA26; PA26; PA28; PA67; PB12; PB18; PB88; PC24; PC24; PC37; PC41; PC49; PC55; PC60;
M[20P]-584: PA00; PA14; PA21; PA26; PA26; PA28; PA39; PA39; PA67; PA75; PB12; PB12; PB27; PB33; PB60; PC11; PC41; PC49; PC55; PC97;
M[20P]-588: PA07; PA13; PA14; PA21; PA26; PA26; PA26; PA26; PA32; PA67; PA67; PA75; PB12; PB27; PB33; PB60; PC20; PC20; PC23; PC24;
50 M[20P]-589: PA13; PA13; PA22; PA25; PA25; PA27; PA29; PA29; PA35; PA39; PA52; PA75; PB12; PB32; PB38; PB85; PB88; PC11; PC23; PC98;
M[20P]-590: PA11; PA13; PA13; PA14; PA25; PA29; PA33; PA35; PA35; PA35; PA39; PB02; PB12; PC11; PC20; PC20; PC21; PC27; PC55; PC55;
60 M[20P]-592: PA10; PA10; PA11; PA11; PA13; PA14; PA21; PA21; PA26; PA26; PA27; PA29; PA30; PA75; PB07; PB07; PB12; PB38; PC20; PC24;
M[20P]-594: PA13; PA21; PA21; PA21; PA23; PA27; PA28; PA39; PA60; PA69; PA70; PB02; PB09; PB12; PB12; PB88; PC24; PC49; PC97; PC98;
45 M[20P]-595: PA11; PA13; PA22; PA23; PA25; PA28; PA28; PA28; PA29; PA29; PA39; PA67; PA69; PB12; PB60; PC12; PC20; PC24; PC49; PC55;
M[20P]-596: PA11; PA11; PA13; PA13; PA14; PA21; PA22; PA23; PA26; PA26; PA67; PB12; PB60; PC11; PC20; PC20; PC37; PC50; PC55; PC60;
60 M[20P]-599: PA13; PA13; PA14; PA16; PA26; PA29; PA75; PA75; PB07; PB12; PB60; PB60; PB60; PB60; PC12; PC20; PC20; PC37; PC37; PC52;
M[20P]-601: PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA23; PA26; PA29; PA29; PA35; PB02; PB10; PB12; PB33; PC20; PC21; PC41; PC49; PC60; PC67;
65 M[20P]-602: PA00; PA10; PA14; PA14; PA14; PA21; PA25; PA26; PA29; PA29; PB07; PB07; PB07; PB12;

PB12; PC20; PC52; PC55; PD02;
 M[20P]-603: PA11; PA13; PA16; PA20; PA21; PA23; PA23; PA26; PA26; PA28; PA33; PA39; PA39; PA67; PB60;
 PB60; PC20; PC23; PC49; PC55;
 5 M[20P]-604: PA10; PA13; PA14; PA14; PA18; PA21; PA22; PA23; PA26; PA28; PA28; PA29; PB12; PB33; PC11;
 PC11; PC51; PC51; PC60; PC71;
 M[20P]-605: PA11; PA11; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA20; PA25; PA29; PA39; PA39; PA69; PA81; PB07;
 PB12; PB88; PC20; PC41; PC55;
 M[20P]-607: PA10; PA11; PA11; PA13; PA13; PA13; PA22; PA22; PA26; PA33; PA35; PA75; PA75; PA81; PB12;
 PB88; PC20; PC49; PC55; PC97;
 10 M[20P]-608: PA00; PA13; PA13; PA13; PA18; PA26; PA27; PA29; PA35; PA57; PA69; PA75; PA98; PB12; PB60;
 PC11; PC20; PC20; PC55; PC60;
 M[20P]-609: PA11; PA14; PA21; PA22; PA23; PA26; PA34; PA52; PA67; PA69; PA69; PB07; PB12; PB12; PB27;
 PB77; PC12; PC20; PC55; PC97;
 15 M[20P]-612: PA11; PA13; PA14; PA14; PA14; PA21; PA22; PA23; PA52; PA81; PB00; PB07; PB12; PB33; PB38;
 PB60; PC12; PC24; PC33; PC37;
 M[20P]-613: PA10; PA13; PA13; PA14; PA21; PA21; PA22; PA23; PA26; PA28; PA28; PA29; PB12; PB12; PB27;
 PB60; PC20; PC21; PC21; PC60;
 M[20P]-616: PA13; PA26; PA28; PA29; PA39; PA57; PA67; PB07; PB12; PB38; PB60; PB77; PB77; PB88; PC33;
 PC49; PC52; PC52; PC98; PC98;
 20 M[20P]-618: PA11; PA12; PA13; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA23; PA26; PA29; PA67; PA79; PB88; PC11;
 PC20; PC20; PC37; PC41; PC55;
 M[20P]-620: PA12; PA13; PA20; PA22; PA23; PA26; PA26; PA28; PA39; PA69; PA95; PB12; PB60; PB77;
 PC20; PC21; PC52; PC60; PC98;
 25 M[20P]-621: PA10; PA13; PA14; PA24; PA24; PA26; PA27; PA29; PA32; PA35; PA67; PB12; PB12; PB12; PB27;
 PB33; PB33; PB38; PB38; PB38;
 M[20P]-622: PA10; PA12; PA14; PA14; PA15; PA20; PA21; PA26; PA27; PA32; PA40; PB10; PB12; PB12; PB88;
 PC20; PC20; PC21; PC52; PC60;
 M[20P]-623: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA24; PA25; PA26; PA26; PA28; PA39; PA81; PB09; PB12; PB28;
 PB88; PC24; PC41; PC52; PC98;
 30 M[20P]-626: PA11; PA11; PA13; PA13; PA20; PA21; PA21; PA25; PA27; PA27; PA28; PA39; PA39; PA40; PA57;
 PB12; PB60; PC20; PC37; PC41;
 M[20P]-631: PA10; PA13; PA20; PA21; PA21; PA23; PA23; PA26; PA29; PA39; PA39; PA67; PB10; PB38; PB60;
 PC11; PC20; PC37; PC49; PC66;
 35 M[20P]-632: PA10; PA11; PA18; PA21; PA22; PA23; PA28; PA29; PA33; PA34; PA69; PB07; PB12; PB60; PC20;
 PC20; PC20; PC37; PC41; PC55;
 M[20P]-633: PA10; PA11; PA13; PA20; PA34; PA39; PB00; PB07; PB12; PB12; PB60; PB88; PB88; PC11;
 PC12; PC23; PC35; PC49; PC52;
 M[20P]-634: PA13; PA13; PA13; PA21; PA22; PA22; PA25; PA25; PA28; PA28; PA29; PA67; PA81; PB00; PB12;
 PB12; PB27; PB33; PC11; PC98;
 40 M[20P]-635: PA00; PA14; PA17; PA20; PA21; PA23; PA26; PA27; PA75; PA81; PB00; PB12; PB82; PC11; PC20;
 PC26; PC51; PC52; PC55; PC71;
 M[20P]-638: PA00; PA14; PA17; PA21; PA22; PA24; PA28; PA33; PA52; PA57; PA75; PB00; PB07; PB12; PB28;
 PB88; PC20; PC37; PC41; PC97;
 45 M[20P]-649: PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA24; PA30; PA33; PA98; PB10; PB12; PB28;
 PB32; PB60; PC11; PC20; PC66;
 M[20P]-654: PA00; PA11; PA15; PA20; PA21; PA26; PA32; PA34; PA35; PA39; PA57; PB10; PB12; PB18; PC11;
 PC20; PC21; PC50; PC55; PC66;
 M[20P]-655: PA11; PA13; PA14; PA20; PA22; PA26; PA28; PA30; PA40; PA52; PA57; PA81; PB12; PB32; PB85;
 PC41; PC50; PC55; PC66; PC71;
 50 M[20P]-658: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA17; PA20; PA21; PA28; PA29; PA52; PA67; PB10; PB12;
 PB18; PB60; PC20; PC41; PC66;
 M[20P]-659: PA00; PA11; PA21; PA22; PA24; PA26; PA27; PA28; PA29; PA33; PA35; PA81; PB07; PB12; PB18;
 PB28; PB85; PC37; PC49; PC74;
 55 M[20P]-663: PA06; PA13; PA20; PA25; PA26; PA27; PA28; PA40; PA67; PA81; PB00; PB12; PB18; PB33; PB61;
 PC20; PC24; PC37; PC41; PC52;
 M[20P]-666: PA06; PA13; PA21; PA23; PA27; PA28; PA30; PA40; PA75; PB00; PB07; PB10; PB12; PB18; PB28;
 PB33; PC20; PC49; PC52; PC71;
 M[20P]-668: PA10; PA16; PA17; PA21; PA24; PA27; PA28; PA33; PA40; PA57; PA75; PA79; PB07; PB08; PB12;
 PB33; PB88; PC20; PC35; PC97;
 60 M[20P]-670: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA23; PA27; PA28; PA35; PA39; PA67; PA79; PA81; PA89; PB10;
 PB12; PB18; PC20; PC21; PC51;
 M[20P]-678: PA06; PA11; PA12; PA13; PA21; PA23; PA29; PA35; PA39; PA40; PB00; PB07; PB10; PB12; PB33;
 PB60; PB77; PC11; PC67; PC76;
 M[20P]-681: PA07; PA10; PA11; PA21; PA24; PA26; PA30; PA35; PA39; PA57; PA75; PB07; PB12; PB28; PB88;
 65 PC11; PC49; PC55; PC58; PC66;

M[20P]-686: PA00; PA10; PA13; PA22; PA24; PA27; PA28; PA33; PA39; PA40; PA69; PB12; PB32; PB38; PB85; PB88; PC20; PC55; PC60; PC66;
M[20P]-692: PA07; PA10; PA13; PA21; PA22; PA26; PA34; PA39; PA40; PA81; PB12; PB18; PB32; PB33; PB88; PC35; PC37; PC52; PC55; PC76;
5 M[20P]-694: PA07; PA11; PA13; PA14; PA15; PA16; PA21; PA27; PA28; PA29; PA35; PA39; PA40; PA75; PB12; PB33; PB88; PC50; PC51; PC52;
M[20P]-697: PA00; PA13; PA16; PA19; PA21; PA22; PA25; PA27; PA28; PA39; PA79; PA81; PB00; PB12; PB32; PB60; PB99; PC51; PC58; PC76;
10 M[20P]-703: PA00; PA13; PA14; PA15; PA24; PA26; PA33; PA35; PA52; PA75; PA81; PB07; PB12; PB28; PB85; PC20; PC21; PC35; PC41; PD02;
M[20P]-705: PA11; PA13; PA30; PA33; PA40; PA67; PA75; PB07; PB12; PB28; PB35; PB88; PC20; PC21; PC24; PC35; PC37; PC41; PC50; PC55;
M[20P]-708: PA07; PA13; PA23; PA25; PA27; PA29; PA30; PA33; PA52; PA57; PA75; PB00; PB08; PB12; PB38; PB60; PB77; PC50; PC76; PD02;
15 M[20P]-709: PA11; PA13; PA17; PA20; PA21; PA23; PA26; PA27; PA28; PA40; PA69; PA81; PA92; PB00; PB07; PB12; PC20; PC41; PC52; PC66;
M[20P]-712: PA12; PA13; PA15; PA20; PA22; PA26; PA27; PA29; PA35; PA52; PA81; PB07; PB10; PB12; PB33; PB88; PC11; PC20; PC41; PC52;
20 M[20P]-714: PA07; PA10; PA11; PA16; PA21; PA26; PA33; PA40; PA67; PA81; PA98; PB00; PB07; PB12; PB28; PC11; PC41; PC49; PC50; PC98;
M[20P]-716: PA11; PA13; PA15; PA19; PA22; PA26; PA33; PA37; PA39; PA57; PB07; PB12; PB28; PB33; PB88; PB99; PC14; PC23; PC35; PC67;
M[20P]-718: PA12; PA13; PA15; PA16; PA20; PA22; PA25; PA26; PA39; PA40; PA92; PB07; PB12; PB27; PB35; PB38; PB99; PC11; PC27; PC41;
25 M[20P]-721: PA19; PA20; PA21; PA24; PA25; PA27; PA29; PA30; PA55; PA57; PB12; PB32; PB58; PB60; PB88; PB99; PC41; PC50; PC60; PC67;
M[20P]-723: PA12; PA13; PA16; PA17; PA21; PA28; PA29; PA33; PA34; PA40; PA60; PA89; PB28; PB60; PB61; PC14; PC24; PC41; PC51; PC74;
M[20P]-724: PA13; PA23; PA25; PA35; PA57; PA67; PB07; PB12; PB32; PB33; PB88; PB99; PC12; PC20; PC23; PC49; PC50; PC66; PC67; PC94;
30 M[20P]-725: PA00; PA13; PA14; PA20; PA22; PA25; PA26; PA28; PA33; PA40; PA57; PA81; PB12; PB16; PB33; PB88; PC11; PC24; PC51; PC74;
M[20P]-733: PA11; PA13; PA15; PA21; PA28; PA30; PA33; PA40; PB12; PB32; PB33; PB99; PC11; PC12; PC20; PC60; PC73; PC74; PC94; PD02;
35 M[20P]-737: PA00; PA11; PA13; PA15; PA17; PA21; PA24; PA28; PA29; PA30; PA67; PB07; PB27; PB28; PB77; PC20; PC21; PC41; PC51; PC94;
M[20P]-740: PA11; PA13; PA14; PA15; PA22; PA23; PA28; PA33; PA39; PA57; PA75; PA89; PB02; PB12; PB28; PB33; PC12; PC21; PC24; PC55;
M[20P]-745: PA11; PA21; PA22; PA24; PA26; PA27; PA28; PA29; PA57; PA89; PB07; PB12; PB28; PB33; PC08; PC11; PC41; PC66; PC67; PC98;
40 M[20P]-746: PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA33; PA39; PA40; PA81; PB06; PB07; PB12; PB32; PB60; PC20; PC21; PC24; PC37; PC50; PC55;
M[20P]-748: PA11; PA13; PA14; PA17; PA23; PA26; PA32; PA57; PA60; PA81; PB07; PB12; PB28; PB32; PB33; PB85; PB99; PC20; PC21; PC35;
45 M[20P]-752: PA11; PA13; PA18; PA26; PA28; PA29; PA33; PA35; PA39; PA67; PA75; PB07; PB12; PB32; PB88; PB99; PC12; PC50; PC54; PC62;
M[20P]-753: PA11; PA12; PA13; PA14; PA15; PA29; PA32; PA40; PA57; PA81; PB00; PB12; PB33; PB60; PC20; PC21; PC49; PC52; PC66; PD02;
M[20P]-757: PA11; PA13; PA21; PA22; PA23; PA27; PA34; PA35; PA40; PA57; PA67; PB10; PB12; PB22; PB58; PC11; PC14; PC23; PC55; PC98;
50 M[20P]-758: PA10; PA11; PA13; PA20; PA21; PA23; PA28; PA29; PA30; PA40; PA69; PA75; PA81; PB12; PC06; PC20; PC41; PC52; PC57; PC74;
M[20P]-764: PA11; PA13; PA22; PA29; PA35; PA40; PA57; PA73; PA75; PA81; PB08; PB12; PB33; PB82; PC11; PC20; PC21; PC29; PC41; PC52;
55 M[20P]-765: PA10; PA11; PA13; PA15; PA26; PA27; PA30; PA35; PA40; PA89; PB12; PB22; PB58; PB60; PC34; PC37; PC55; PC58; PC67; PD02;
M[20P]-766: PA11; PA13; PA17; PA22; PA24; PA25; PA29; PA30; PA33; PA34; PA35; PA81; PA92; PB00; PB12; PB82; PC24; PC50; PC74; PC97;
M[20P]-767: PA11; PA21; PA22; PA28; PA29; PA33; PA37; PB12; PB60; PB85; PB88; PB99; PC14; PC20; PC21; PC41; PC51; PC55; PC57; PC98;
60 M[20P]-771: PA10; PA11; PA13; PA14; PA22; PA26; PA27; PA28; PA29; PA35; PA86; PA89; PB07; PB12; PB28; PB88; PB99; PC12; PC21; PC50;
M[20P]-777: PA11; PA14; PA15; PA20; PA21; PA24; PA25; PA28; PA29; PA33; PA75; PB12; PB85; PB99; PC21; PC51; PC55; PC62; PC67; PD02;
65 M[20P]-779: PA15; PA19; PA20; PA21; PA22; PA23; PA24; PA25; PA29; PA30; PA57; PA67; PA75; PA89; PB07;

PB12; PB32; PC20; PC51; PC74;
 M[20P]-781: PA10; PA15; PA21; PA22; PA39; PA57; PA75; PB08; PB09; PB12; PB28; PB35; PB58; PB60; PC12;
 PC33; PC37; PC66; PC67; PC74;
 M[20P]-782: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA26; PA30; PA75; PA89; PA92; PB05; PB07; PB12; PB32;
 5 PB82; PB99; PC51; PC58; PC73;
 M[20P]-785: PA16; PA17; PA21; PA28; PA29; PA30; PA32; PA33; PA55; PB07; PB12; PB77; PB85; PB88; PB99;
 PC12; PC20; PC35; PC67; PC98;
 M[20P]-786: PA11; PA13; PA14; PA18; PA19; PA21; PA22; PA27; PA28; PA29; PA33; PA40; PA52; PA57; PA81;
 PB28; PC11; PC20; PC21; PC50;
 10 M[20P]-787: PA10; PA11; PA13; PA22; PA23; PA35; PB07; PB12; PB22; PB85; PB99; PC11; PC20; PC41; PC49;
 PC52; PC53; PC55; PC73; PD02;
 M[20P]-789: PA10; PA11; PA13; PA22; PA23; PA27; PA40; PA57; PA75; PA81; PB07; PB12; PB27; PB60; PB88;
 PC11; PC20; PC23; PC35; PC41;
 M[20P]-791: PA10; PA11; PA13; PA15; PA21; PA33; PA35; PA40; PA57; PA69; PA85; PA98; PA99; PB07; PB12;
 15 PB20; PB99; PC12; PC20; PC58;
 M[20P]-793: PA11; PA13; PA14; PA15; PA19; PA26; PA29; PA55; PA67; PA89; PB12; PB33; PB88; PC14; PC20;
 PC21; PC34; PC37; PC67; PC97;
 M[20P]-794: PA21; PA23; PA28; PA29; PA34; PA35; PA57; PA75; PA81; PB07; PB12; PB18; PB32; PB58; PC11;
 PC14; PC41; PC55; PC62; PC74;
 20 M[20P]-795: PA10; PA13; PA20; PA23; PA27; PA29; PA57; PA60; PA69; PB00; PB07; PB12; PB18; PB32; PB85;
 PB88; PC20; PC66; PC74; PD02;
 M[20P]-803: PA11; PA13; PA15; PA22; PA25; PA26; PA29; PA30; PA33; PA40; PA75; PB07; PB12; PB28; PC21;
 PC23; PC34; PC55; PC71; PC73;
 M[20P]-804: PA11; PA12; PA13; PA20; PA22; PA23; PA30; PA33; PA34; PA79; PB12; PB18; PB58; PB60; PB85;
 25 PB88; PC20; PC50; PC67; PC68;
 M[20P]-806: PA06; PA10; PA11; PA13; PA19; PA20; PA21; PA23; PA25; PA28; PA52; PA73; PA75; PA98; PB12;
 PB33; PB82; PB85; PB88; PC11;
 M[20P]-816: PA11; PA13; PA19; PA25; PA28; PA29; PA33; PA57; PA81; PA89; PB00; PB10; PB12; PB26; PB28;
 PB99; PC11; PC12; PC76; PC97;
 30 M[20P]-819: PA10; PA11; PA13; PA15; PA26; PA34; PA60; PA81; PA92; PB07; PB12; PB38; PB85; PC01; PC14;
 PC20; PC52; PC58; PC66; PC67;
 M[20P]-823: PA00; PA11; PA12; PA13; PA14; PA17; PA27; PA29; PA40; PA60; PA75; PA79; PA89; PB07; PB12;
 PB99; PC20; PC52; PC66; PC71;
 M[20P]-830: PA13; PA20; PA25; PA26; PA28; PA40; PA75; PA89; PB00; PB07; PB12; PB32; PB88; PC06; PC12;
 35 PC20; PC41; PC52; PC76; PC98;
 M[20P]-831: PA11; PA13; PA15; PA21; PA25; PA33; PB12; PB28; PB32; PB33; PB38; PB60; PB77; PB88; PC20; PC23;
 PC35; PC37; PC49; PC58; PC66;
 M[20P]-841: PA10; PA11; PA13; PA18; PA22; PA28; PA29; PA30; PA35; PA40; PA55; PA75; PB07; PB12; PB28;
 PB32; PB33; PC41; PC49; PC60;
 40 M[20P]-844: PA11; PA15; PA21; PA24; PA26; PA29; PA33; PA40; PA69; PA81; PA98; PB12; PB28; PB61; PC49;
 PC67; PC71; PC73; PC74; PD02;
 M[20P]-845: PA11; PA13; PA14; PA15; PA21; PA30; PA34; PA39; PA60; PA79; PA81; PA89; PB07; PB18; PC14;
 PC20; PC21; PC34; PC68; PC97;
 M[20P]-846: PA11; PA13; PA25; PA27; PA29; PA32; PA33; PA35; PA37; PA39; PA40; PB08; PB12; PB33; PB88;
 45 PC24; PC41; PC52; PC58; PC62;
 M[20P]-847: PA10; PA19; PA20; PA21; PA28; PA29; PA30; PA67; PA75; PA89; PB00; PB12; PB28; PB33; PB60;
 PC12; PC55; PC73; PC74; PD02;
 M[20P]-848: PA07; PA11; PA13; PA15; PA20; PA22; PA26; PA27; PA30; PA40; PA69; PA75; PB12; PB32; PB85;
 PB88; PC34; PC37; PC66; PC68;
 50 M[20P]-849: PA00; PA13; PA25; PA27; PA28; PA29; PA34; PA40; PA57; PA81; PB00; PB12; PB18; PB77; PC20;
 PC24; PC35; PC41; PC50; PC51;
 M[20P]-852: PA00; PA11; PA13; PA15; PA19; PA22; PA26; PA35; PA89; PB00; PB12; PB58; PB77; PC12; PC20;
 PC29; PC62; PC71; PC94; PC98;
 M[20P]-853: PA00; PA11; PA21; PA24; PA25; PA33; PA57; PA60; PB07; PB12; PB28; PB32; PB60; PB82; PB88;
 55 PC24; PC41; PC50; PC51; PC58;
 M[20P]-857: PA00; PA11; PA13; PA26; PA28; PA75; PA76; PA79; PB12; PB28; PB60; PB88; PC11; PC12; PC20;
 PC37; PC50; PC52; PC67; PD02;
 M[20P]-873: PA10; PA13; PA26; PA27; PA30; PA34; PA85; PA98; PB05; PB07; PB12; PB28; PB29; PB32; PB60;
 PC14; PC20; PC26; PC41; PC76;
 60 M[20P]-880: PA11; PA13; PA17; PA20; PA22; PA24; PA26; PA27; PA29; PA38; PA57; PB07; PB12; PB20; PB29;
 PB97; PC24; PC37; PC51; PC71;
 M[20P]-888: PA10; PA12; PA15; PA16; PA21; PA27; PA28; PA33; PA44; PB00; PB12; PB13; PB27; PC11; PC20;
 PC51; PC58; PC73; PC75; PD02;
 M[20P]-890: PA00; PA11; PA13; PA15; PA16; PA25; PA34; PA75; PA82; PA86; PB00; PB12; PB16; PB27; PB33;
 65 PC20; PC49; PC50; PC57; PC98;

M[20P]-894: PA12; PA18; PA21; PA24; PA26; PA27; PA34; PA57; PA67; PA82; PB01; PB12; PB33; PB76; PB98; PB99; PC11; PC24; PC33; PC83;
M[20P]-902: PA12; PA13; PA21; PA26; PA29; PA39; PA40; PA57; PA96; PB00; PB07; PB12; PB27; PC20; PC50; PC53; PC61; PC62; PC75; PC94;
M[20P]-904: PA06; PA13; PA20; PA23; PA25; PA27; PA35; PA46; PA52; PA60; PA81; PA90; PA97; PB03; PB12; PB57; PB99; PC20; PC52; PC73;
M[20P]-907: PA00; PA07; PA14; PA21; PA24; PA25; PA45; PA75; PA83; PA97; PB12; PB26; PB32; PB60; PB92; PC06; PC20; PC35; PC37; PD02;
M[20P]-909: PA12; PA14; PA20; PA21; PA29; PA39; PA72; PA93; PB12; PB22; PB28; PB32; PC21; PC23; PC24; PC41; PC52; PC73; PC79; PD02.

Nota: si en las listas análogas anteriores y en las siguientes se produce un código de planta más de una vez en la misma composición herbaria, significa que se usó más de una cuchara calibrada de la planta seca molida correspondiente.

Partiendo de las composiciones herbarias enumeradas en la Lista 6-3 se prepararon extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 40 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración.

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 y ATCC 14775, con las siguientes diluciones finales de muestras procesadas: 1:20, 1:63 y 1:200.

En la Tabla 5-1 se proporcionan el promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas obtenidas de composiciones herbarias que incluyen las 2 plantas de Mezcla[2P]-1 a una dilución de 1:20.

Tabla 5-1: Promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas, basado en Mezcla[2P]-1 a una dilución de 1:20. (A) Extractos de mezclas que muestran una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula. (B) Extractos de mezclas que muestran actividad antibiopelícula y actividad antimicrobiana equivalente o inferior. (C) Mezclas de extractos que muestran actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula equivalente o inferior.

(A)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-1	22%	36%
M[20P]-563	26%	40%
M[20P]-495	25%	43%
M[20P]-631	27%	42%
M[20P]-465	24%	50%
M[20P]-408	26%	50%
M[09P]-8	31%	48%
M[19P]-13	31%	50%
M[18P]-12	40%	50%
M[20P]-581	40%	50%
M[20P]-469	40%	55%
M[20P]-485	43%	52%
M[20P]-427	37%	66%
M[20P]-582	51%	54%
M[20P]-431	44%	65%
M[20P]-618	54%	57%
M[20P]-580	61%	59%
M[20P]-421	53%	70%
M[20P]-499	60%	67%
M[20P]-525	86%	77%
M[20P]-29	105%	93%

(B)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-1	22%	36%
M[20P]-723	11%	40%
M[20P]-786	20%	40%
M[20P]-737	22%	40%
M[20P]-340	11%	40%
M[20P]-382	13%	41%
M[20P]-444	18%	42%
M[20P]-603	12%	42%
M[20P]-470	19%	42%
M[20P]-503	12%	46%
M[19P]-67	18%	49%
M[20P]-533	21%	50%
M[20P]-845	16%	51%
M[20P]-377	21%	51%
M[20P]-510	7%	55%

(C)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-1	22%	36%
M[17P]-9	27%	29%
M[18P]-37	29%	36%

Se descubrió que 20 de las muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 9, 18, 19 o 20 plantas tenían una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula que el extracto de mezcla de referencia Mezcla[2P]-1 (Tabla 5-1 A). Se descubrió que catorce extractos de 20 mezclas de plantas tenían una actividad antibiopelícula superior y una actividad antimicrobiana equivalente o inferior (Tabla 5-1 B). Se descubrió que dos muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 17 y 18 plantas tenían una actividad antimicrobiana superior y una actividad antibiopelícula equivalente o inferior (Tabla 5-1C).

En la Tabla 5-2 se proporcionan el promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas obtenidas de composiciones herbarias que incluyen las 2 plantas de Mezcla[2P]-2 a una dilución de 1:20.

Tabla 5-2: Promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas, basado en la Mezcla[2P]-2 a una dilución de 1:20. (A) Extractos de mezclas que muestran una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula. (B) Extractos de mezclas que muestran actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula equivalente o inferior.

(A)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-2	12%	-3%
M[17P]-5	17%	17%
M[20P]-654	16%	20%
M[16P]-1	14%	22%
M[17P]-1	16%	22%
M[20P]-779	14%	29%
M[20P]-746	15%	28%
M[20P]-635	17%	26%
M[20P]-844	15%	29%
M[20P]-831	17%	31%
M[20P]-894	18%	30%
M[20P]-888	23%	25%
M[20P]-407	19%	31%
M[20P]-907	21%	31%
M[20P]-335	19%	33%
M[20P]-714	17%	35%
M[20P]-668	15%	38%
M[20P]-584	14%	39%
M[20P]-777	16%	37%
M[20P]-853	20%	34%
M[20P]-785	16%	39%
M[20P]-622	21%	34%
M[09P]-2	17%	39%
M[19P]-46	18%	37%
M[20P]-387	13%	43%
M[20P]-767	18%	39%
M[18P]-23	24%	33%
M[20P]-745	20%	37%
M[20P]-478	22%	36%
M[19P]-45	16%	42%
M[19P]-49	19%	40%
M[20P]-467	17%	42%
M[20P]-396	21%	38%
M[20P]-392	17%	42%
M[19P]-44	20%	42%
M[19P]-41	23%	40%

(B)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-2	12%	-3%
M[20P]-638	11%	13%
M[20P]-794	6%	16%
M[20P]-909	0%	19%
M[20P]-538	8%	22%
M[20P]-781	6%	24%
M[19P]-27	7%	26%
M[20P]-681	11%	24%
M[16P]-3	8%	28%
M[20P]-721	2%	28%
M[20P]-493	7%	28%
M[17P]-6	9%	29%
M[20P]-659	10%	30%
M[20P]-409	10%	30%
M[20P]-602	4%	31%
M[20P]-456	9%	31%
M[20P]-383	5%	32%
M[20P]-847	13%	33%
M[20P]-496	6%	34%
M[19P]-51	10%	34%
M[20P]-371	7%	36%
M[20P]-609	12%	36%
M[19P]-52	9%	36%
M[19P]-50	12%	36%
M[18P]-24	11%	36%
M[19P]-53	10%	40%

5	M[19P]-48	18%	46%
	M[19P]-47	17%	46%
	M[20P]-490	20%	44%
	M[19P]-21	29%	35%
	M[20P]-632	24%	40%
10	M[19P]-54	19%	45%
	M[20P]-461	19%	46%
	M[19P]-42	24%	41%
	M[20P]-506	17%	49%
15	M[19P]-55	21%	46%
	M[20P]-459	26%	42%
	M[20P]-375	19%	52%
20	M[19P]-2	26%	49%
	M[19P]-40	28%	48%
	M[20P]-523	28%	51%
25	M[20P]-420	34%	56%
	M[20P]-429	36%	59%
	M[20P]-535	45%	55%
	M[20P]-532	42%	60%
30	M[20P]-432	54%	72%
	M[20P]-555	68%	65%
	M[20P]-240	67%	78%
35	M[20P]-557	86%	78%

Se descubrió que 58 de las muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 9, 16, 17, 18, 19 o 20 plantas tenían una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula que el extracto de mezcla de referencia Mezcla[2P]-2 (Tabla 5-2 A). Se descubrió que 25 muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 16, 17, 19 o 20 plantas tenían una actividad antibiopelícula superior y una actividad antimicrobiana equivalente o inferior (Tabla 5-2 B).

En la Tabla 5-3 se proporcionan el promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas obtenidas de composiciones herbarias que incluyen las 2 plantas de Mezcla[2P]-3 a una dilución de 1:20.

Tabla 5-3: Promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y de la inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas, basado en la Mezcla[2P]-3 a una dilución de 1:20. (A) Extractos de mezclas de que muestran una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula. (B) Extractos de mezclas que muestran actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula equivalente o inferior.

(A)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula	(B)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-3	12%	28%	Mezcla[2P]	12%	28%
M[20P]-649	16%	29%	M[20P]-599	11%	32%
M[20P]-857	15%	32%	M[20P]-621	10%	32%
M[20P]-703	13%	36%	M[20P]-740	12%	33%
M[20P]-486	15%	35%	M[20P]-830	7%	33%

ES 2 986 293 T3

(continuación)

5	M[20P]-766	13%	37%	M[20P]-623	12%	34%
	M[20P]-789	14%	36%	M[20P]-708	8%	35%
	M[20P]-725	14%	37%	M[20P]-880	12%	35%
10	M[20P]-536	20%	32%	M[20P]-716	8%	35%
	M[20P]-753	14%	38%	M[20P]-803	4%	36%
	M[20P]-401	14%	38%	M[20P]-686	13%	36%
15	M[20P]-765	14%	38%	M[20P]-663	5%	36%
	M[20P]-848	14%	39%	M[20P]-873	7%	36%
	M[20P]-782	14%	40%	M[20P]-608	10%	37%
20	M[20P]-589	15%	39%	M[20P]-752	10%	37%
	M[20P]-607	14%	40%	M[20P]-443	8%	37%
	M[20P]-541	20%	34%	M[19P]-30	3%	37%
25	M[20P]-447	15%	39%	M[20P]-712	12%	37%
	M[20P]-601	17%	38%	M[20P]-616	7%	38%
	M[20P]-494	13%	43%	M[20P]-724	4%	38%
30	M[20P]-787	15%	40%	M[20P]-795	11%	38%
	M[20P]-748	15%	41%	M[20P]-403	13%	38%
	M[09P]-6	15%	41%	M[20P]-595	7%	38%
35	M[20P]-480	18%	38%	M[20P]-771	9%	39%
	M[20P]-633	15%	41%	M[20P]-718	5%	39%
	M[20P]-849	14%	42%	M[20P]-620	12%	39%
40	M[20P]-793	16%	42%	M[20P]-841	6%	40%
	M[18P]-9	17%	41%	M[20P]-804	8%	40%
	M[20P]-852	13%	45%	M[20P]-386	6%	41%
45	M[20P]-819	20%	39%	M[20P]-764	11%	42%
	M[20P]-655	15%	44%	M[18P]-33	11%	42%
	M[20P]-455	15%	44%	M[20P]-349	9%	43%
50	M[20P]-846	16%	44%	M[19P]-92	10%	46%
	M[20P]-481	18%	41%	M[18P]-34	11%	47%
	M[20P]-484	17%	42%	M[19P]-93	12%	50%
55	M[20P]-590	26%	34%	M[18P]-31	12%	51%
	M[20P]-890	19%	42%	M[18P]-34	12%	51%
	M[20P]-670	21%	40%	M[19P]-62	10%	56%
60	M[20P]-705	23%	39%			
	M[20P]-816	22%	39%			
	M[19P]-91	15%	48%			
65	M[20P]-457	22%	43%			
	M[20P]-551	24%	41%			
	M[19P]-100	16%	50%			
	M[20P]-583	23%	43%			
	M[20P]-823	22%	44%			
	M[19P]-100	16%	50%			

(continuación)

M[19P]-98	17%	50%
M[19P]-101	14%	54%
M[19P]-93	14%	53%
M[19P]-102	13%	54%
M[19P]-5	19%	49%
M[19P]-89	17%	51%
M[19P]-103	13%	55%
M[19P]-96	18%	52%
M[20P]-475	25%	45%
M[20P]-548	30%	42%
M[19P]-96	19%	53%
M[20P]-605	22%	50%
M[20P]-577	29%	44%
M[20P]-482	27%	46%
M[19P]-95	19%	55%
M[20P]-904	21%	55%
M[20P]-559	32%	47%
M[20P]-430	29%	71%
M[20P]-520	62%	67%
M[20P]-579	75%	66%
M[20P]-560	72%	70%
M[20P]-565	73%	73%
M[20P]-524	81%	79%
M[20P]-575	85%	76%

Se descubrió que 70 de las muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 9, 19 o 20 plantas tenían una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula que el extracto de mezcla de referencia Mezcla[2P]-3 (Tabla 5-3 A). Se descubrió que 37 muestras procesadas que contenían de 18 a 20 plantas tenían una actividad antibiopelícula superior y una actividad antimicrobiana equivalente o inferior (Tabla 5-3 B).

En la Tabla 5-4 se proporcionan el promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas obtenidas de composiciones herbarias que incluyen las 3 plantas de Mezcla[3P]-1 a una dilución de 1:20.

Tabla 5-4: Promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas, basado en la Mezcla[3P]-1 a una dilución de 1:20. (A) Extractos de mezclas que muestran una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula. (B) Extractos de mezclas que muestran actividad antimicrobiana y actividad antibiopelícula equivalente o inferior.

(A)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[3P]-1	31%	15%
M[18P]-2	35%	42%
M[16P]-5	36%	41%

(B)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[3P]-1	31%	15%
M[20P]-692	11%	22%
M[20P]-612	6%	25%

ES 2 986 293 T3

(continuación)

5	M[14P]-2	34%	44%	M[18P]-22	4%	27%
	M[16P]-6	35%	44%	M[20P]-388	9%	27%
	M[09P]-9	33%	47%	M[20P]-380	12%	28%
10	M[09P]-1	34%	45%	M[11P]-12	22%	29%
	M[18P]-7	35%	45%	M[19P]-33	8%	30%
	M[17P]-3	36%	44%	M[19P]-35	6%	30%
15	M[09P]-7	35%	49%	M[17P]-2	12%	30%
	M[20P]-594	40%	46%	M[20P]-678	10%	31%
	M[09P]-6	37%	51%	M[19P]-22	17%	31%
20	M[20P]-658	45%	43%	M[20P]-552	16%	32%
	M[19P]-3	34%	54%	M[17P]-4	9%	32%
	M[18P]-11	40%	49%	M[20P]-806	12%	32%
25	M[19P]-104	43%	46%	M[12P]-1	19%	33%
	M[09P]-3	46%	44%	M[14P]-1	18%	33%
	M[09P]-4	46%	45%	M[19P]-28	6%	33%
30	M[19P]-19	34%	57%	M[12P]-2	22%	34%
	M[18P]-13	42%	50%	M[18P]-1	16%	34%
	M[18P]-10	43%	49%	M[19P]-36	6%	34%
35	M[18P]-9	42%	51%	M[20P]-479	23%	34%
	M[18P]-17	45%	51%	M[15P]-1	23%	34%
	M[20P]-634	43%	56%	M[09P]-21	22%	34%
40	M[20P]-596	44%	55%	M[20P]-446	10%	34%
	M[18P]-15	47%	52%	M[19P]-34	7%	34%
	M[20P]-449	47%	56%	M[19P]-106	29%	35%
45	M[09P]-10	54%	50%	M[10P]-41	8%	35%
	M[20P]-588	48%	56%	M[13P]-1	22%	35%
	M[20P]-458	50%	56%	M[18P]-5	18%	35%
50	M[19P]-105	49%	56%	M[19P]-39	-1%	35%
	M[13P]-2	51%	56%	M[11P]-3	12%	35%
	M[19P]-11	43%	67%	M[20P]-439	19%	36%
55	M[18P]-16	54%	59%	M[11P]-2	13%	36%
	M[20P]-569	55%	60%	M[18P]-20	6%	36%
	M[20P]-296	52%	62%	M[20P]-757	18%	36%
60	M[18P]-18	56%	61%	M[10P]-303	25%	36%
	M[20P]-516	61%	68%	M[11P]-11	29%	37%
	M[20P]-592	70%	71%	M[11P]-6	9%	37%
65	M[20P]-626	71%	71%	M[19P]-37	5%	37%
	M[19P]-23	72%	72%	M[18P]-19	10%	37%
	M[20P]-497	72%	77%	M[18P]-4	29%	37%
	M[20P]-572	74%	78%	M[18P]-35	27%	37%
	M[20P]-574	76%	79%	M[18P]-25	11%	37%
	M[20P]-527	76%	80%	M[11P]-5	10%	38%

ES 2 986 293 T3

(continuación)

M[20P]-297	83%	81%
M[20P]-422	81%	83%
M[20P]-564	86%	82%
M[20P]-418	98%	87%
M[20P]-416	99%	89%
M[20P]-576	104%	86%
M[20P]-573	104%	93%

M[20P]-694	20%	38%
M[11P]-8	10%	38%
M[11P]-9	11%	38%
M[20P]-733	12%	38%
M[11P]-7	10%	38%
M[19P]-31	6%	38%
M[19P]-32	4%	38%
M[19P]-29	6%	38%
M[18P]-6	22%	38%
M[20P]-374	2%	38%
M[11P]-4	12%	39%
M[20P]-791	13%	39%
M[20P]-758	15%	39%
M[19P]-26	6%	39%
M[20P]-697	17%	39%
M[19P]-38	4%	40%
M[19P]-24	28%	40%
M[16P]-2	24%	40%
M[18P]-21	9%	40%
M[15P]-5	29%	40%
M[17P]-8	30%	40%
M[20P]-613	8%	41%
M[18P]-14	27%	41%
M[20P]-604	14%	41%
M[11P]-1	17%	41%
M[18P]-36	29%	41%
M[18P]-3	23%	42%
M[20P]-453	5%	42%
M[19P]-25	9%	42%
M[20P]-709	18%	42%
M[20P]-474	16%	45%
M[20P]-666	22%	45%
M[20P]-902	21%	46%
M[20P]-435	15%	46%
M[20P]-567	30%	47%
M[19P]-4	24%	47%
M[19P]-16	18%	47%
M[19P]-59	10%	48%
M[19P]-17	23%	48%
M[19P]-58	20%	49%
M[19P]-60	13%	49%
M[19P]-15	27%	50%

(continuación)

5	M[11P]-10	31%	50%
	M[19P]-14	27%	50%
	M[19P]-6	32%	51%
	M[20P]-445	21%	51%
10	M[19P]-8	30%	51%
	M[19P]-18	21%	52%
	M[19P]-9	29%	52%
	M[19P]-7	30%	52%
15	M[19P]-10	29%	52%
	M[19P]-68	23%	53%
	M[19P]-63	16%	53%
20	M[19P]-69	22%	53%
	M[19P]-1	26%	54%
	M[19P]-66	24%	54%
	M[19P]-12	26%	54%
25	M[20P]-472	27%	54%
	M[19P]-20	31%	54%
	M[19P]-70	19%	55%
30	M[19P]-62	17%	56%
	M[19P]-57	21%	56%
	M[19P]-65	27%	57%
35	M[19P]-73	18%	57%
	M[20P]-514	30%	58%
	M[19P]-56	24%	58%
	M[19P]-64	27%	59%
40	M[19P]-72	20%	60%
	M[19P]-71	19%	61%

45 Se descubrió que 51 de las muestras procesadas obtenidas a partir de composiciones herbarias que contenían 9, 16, 17, 18, 19 o 20 plantas tenían una mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula que el extracto de mezcla de referencia Mezcla[3P]-1 (Tabla 5-4 A). Se descubrió que 113 muestras procesadas que contenían de 9 a 20 plantas tenían una mayor actividad antibiopelícula y una actividad antimicrobiana equivalente o menor (Tabla 5-4 B).

50 **Ejemplo comparativo 3**

Como ejemplo comparativo, se informa de varios extractos de mezclas de 20 plantas que contienen sólo una planta entre las 3 plantas del ejemplo 1 (PA13, PA21, PB12), que se ha descubierto que no tienen ninguna o tienen escasas actividades antimicrobianas y antibiopelículas contra las mismas *Staphylococcus aureus*.

Se prepararon diez composiciones herbarias que tenían el contenido indicado en la Lista 5-8 de acuerdo con el Método A descrito previamente.

60 **Lista 5-8: composiciones herbarias de muestras procesadas**

M[20P]-39: PB00; PB01; PB02; PB03; PB04; PB05; PB06; PB07; PB08; PB09; PB10; PB11; PB12; PB13; PB14; PB15; PB16; PB17; PB18; PB19;
 65 M[20P]-239: PA00; PA05; PA21; PA26; PA33; PA39; PA60; PA85; PB00; PB06; PB32; PB79; PC02; PC26; PC34; PC38; PC62; PC78; PCS4;

M[20P]-337: PA00; PA10; PA11; PA15; PA18; PA21; PA22; PA24; PA26; PA28; PA52; PA94; PA98; PB10; PB20; PB26; PB29; PB82; PC67; PC97;
M[20P]-362: PA21; PA23; PA25; PA33; PA37; PA57; PA69; PA81; PA92; PB16; PB25; PB26; PB28; PB29; PB78; PC20; PC21; PC71; PC83; PD02;
5 M[20P]-364: PA15; PA21; PA25; PA28; PA39; PA75; PA80; PA85; PA89; PA98; PB01; PB06; PB24; PB28; PB35; PC24; PC25; PC57; PC75; PCS2;
M[20P]-540: PA06; PA10; PA12; PA14; PA20; PA21; PA26; PA27; PA27; PA57; PA57; PA57; PA69; PB07; PB82; PC11; PC20; PC23; PC55; PC98;
10 M[20P]-647: PA10; PA11; PA24; PA26; PA28; PA33; PA35; PA40; PA57; PA69; PB00; PB07; PB12; PB28; PB33; PB38; PB60; PC55; PC67; PC97;
M[20P]-652: PA00; PA07; PA13; PA15; PA16; PA23; PA26; PA28; PA33; PA39; PA57; PA92; PB28; PB38; PC20; PC21; PC52; PC55; PC74; PC97;
M[20P]-862: PA11; PA15; PA18; PA21; PA25; PA27; PA28; PA29; PA35; PA38; PA52; PA86; PA89; PA92; PB07; PB28; PB88; PC11; PC55; PC98;
15 M[20P]-872: PA13; PA14; PA16; PA28; PA29; PA30; PA33; PA35; PA39; PA81; PA90; PA92; PB00; PB32; PC12; PC34; PC37; PC67; PC97; PD02.

Se prepararon diez extractos acuosos (o muestras procesadas) a partir de las composiciones herbarias correspondientes de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 40 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración.

Para cada muestra procesada, la actividad biológica se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente, con las siguientes diluciones finales de muestras procesadas: 1:20, 1:63 y 1:200.

En la Tabla 5-5 se proporcionan el promedio del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio del porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas a una dilución de 1:20.

Tabla 5-5: promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas en las muestras tratadas a una dilución de 1:20.

	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
Mezcla[2P]-1	22%	36%
Mezcla[2P]-2	12%	3%
Mezcla[2P]-3	12%	28%
M[20P]-362	1%	6%
M[20P]-364	5%	6%
M[20P]-039	1%	6%
M[20P]-862	5%	2%
M[20P]-337	0%	9%
M[20P]-872	2%	11%
M[20P]-540	5%	10%
M[20P]-652	9%	7%
M[20P]-239	9%	7%
M[20P]-647	9%	9%

Todas las muestras procesadas probadas obtenidas de composiciones herbarias que contienen 20 plantas que incluyen solo una planta entre las 3 plantas del Ejemplo 1 (PA13, PA21, PB12) mostraron una menor actividad antimicrobiana que las tres extractos de mezclas de 2 plantas de Mezcla[2P]-1 de referencia (obtenida de PA13 y PA21), Mezcla[2P]-2 (obtenida de PA21 y PB12) y Mezcla[2P]-3 (obtenida de PA13 y PB12) y una menor actividad antibiopelícula que Mezcla[2P]-1 y Mezcla[2P]-3.

Ejemplo 6

En este Ejemplo, se informa de las actividades antimicrobianas y antibiopelículas simultáneas contra las mismas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus pseudintermedius* de 2 muestras

procesadas elegidas entre las mejores mezclas descritas en los Ejemplos 4 y 5.

Las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Pharmacie Fontgieve" (Clermont-Ferrand, Francia) y "Pharmacie St Herem" (Clermont-Ferrand, Francia).

Se prepararon dos preparaciones herbarias que contenían los polvos vegetales secos indicados en la Tabla 6-1 a continuación, de acuerdo con el Método A descrito previamente.

Tabla 6-1

Composiciones herbarias	M[20P]-576	M[10P]-154
Planta 1	2 cucharas de PA11	1 cuchara de PA11
Planta 2	1 cuchara de PA12	1 cuchara de PA12
Planta 3	3 cucharas de PA13	1 cuchara de PA13
Planta 4	2 cucharas de PA14	1 cuchara de PA21
Planta 5	1 cuchara de PA20	1 cuchara de PA22
Planta 6	1 cuchara de PA21	1 cuchara de PA79
Planta 7	1 cuchara de PA22	1 cuchara de PB12
Planta 8	1 cuchara de PA29	1 cuchara de PB49
Planta 9	1 cuchara de PA39	1 cuchara de PC29
Planta 10	1 cuchara de PB12	1 cuchara de PC63
Planta 11	1 cuchara de PB60	
Planta 12	1 cuchara de PC20	
Planta 13	1 cuchara de PC26	
Planta 14	1 cuchara de PC33	
Planta 15	1 cuchara de PC37	
Planta 16	1 cuchara de PC49	

Partiendo de tales composiciones herbarias, se prepararon 2 extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 40 ml para M[20P]-576 y 20 ml para M[10P]-154 de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de centrifugación antes de la filtración.

La actividad biológica de las muestras procesadas se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las siguientes cepas:

- Cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213, ATCC 14775, NCTC 12493, ATCC 33591, ATCC 33592, ATCC 43300, ATCC 700698, ATCC 700699, ATCC 9144 y ATCC BAA-44
- Cepas de *Staphylococcus epidermidis*: ATCC 14990, ATCC 12228, ATCC 700296, ATCC 49134 y ATCC 49461
- Cepa de *Staphylococcus pseudintermedius*: ATCC 49444

La concentración inhibidora mínima (CIM) observada con las 2 muestras procesadas se da en la Tabla 6-2 en forma de HID, así como la eficacia promedio sobre todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 6-2: HID de las 2 muestras procesadas en 14 cepas de *Staphylococcus aureus*, 5 cepas de *Staphylococcus epidermidis* y 1 cepa de *Staphylococcus pseudintermedius*

		M[10P]-154	M[20P]-576
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	20	20
	ATCC 49476	40	40
	ATCC 6538	10	10
	ATCC 51740	20	40
	ATCC 29213	20	20
	ATCC 14775	20	20
	NCTC 12493	40	40
	ATCC 33591	20	40
	ATCC 33592	20	40
	ATCC 43300	20	40
	ATCC 700698	20	20
	ATCC 700699	40	20
	ATCC 9144	20	20
	ATCC BAA-44	40	20
	Promedio	25	28

(continuación)

		M[10P]-154	M[20P]-576
<i>S. Epidermidis</i>	ATCC 14990	40	20
	ATCC 12228	40	20
	ATCC 700296	40	20
	ATCC 49461	40	20
	ATCC 49134	80	80
	Promedio	48	32
<i>S. pseudintermedius</i>	ATCC 49444	40	40
	Promedio total	32	30

M[10P]-154 y el M[20P]-576 mostraron una actividad antimicrobiana completa en todas las *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* probadas. M[10P]-154 mostró actividad antimicrobiana completa a 1:80 en 1 cepa de *Staphylococcus epidermidis*, a 1:40 en 4 cepas de *Staphylococcus aureus*, 4 de *Staphylococcus epidermidis* y la cepa probada de *Staphylococcus pseudintermedius*, a 1:20 en 9 cepas de *Staphylococcus aureus*, y a 1:10 en 1 cepa de *Staphylococcus aureus*.

M[20P]-576 mostró una actividad antimicrobiana completa a 1:80 en 1 cepa de *Staphylococcus epidermidis*, a 1:40 en 6 cepas de *Staphylococcus aureus* y la cepa probada de *Staphylococcus pseudintermedius*, a 1:20 en 7 cepas de *Staphylococcus aureus* y 4 de *Staphylococcus epidermidis* y a 1:10 en 1 cepa de *Staphylococcus aureus*.

En la Tabla 6-3 se proporcionan el porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas (IFB) de las 2 muestras procesadas a una dilución 1:20, así como la eficacia promedio sobre todas las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 6-3: inhibición del crecimiento planctónico e inhibición de la formación de biopelículas (IFB) de las 2 muestras procesadas en 14 cepas de *Staphylococcus aureus*, 5 cepas de *Staphylococcus epidermidis* y 1 cepa de *Staphylococcus pseudintermedius* a dilución 1:20

		Inhibición del crecimiento planctónico		Inhibición de la formación de biopelículas (IFB)	
		M[10P]-154	M[20P]-576	M[10P]-154	M[20P]-576
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	96%	99%	90%	88%
	ATCC 49476	93%	109%	93%	95%
	ATCC 6538	49%	56%	45%	60%
	ATCC 51740	91%	106%	89%	96%
	ATCC 29213	94%	105%	91%	92%
	ATCC 14775	90%	105%	88%	90%
	NCTC 12493	99%	113%	93%	92%
	ATCC 33591	95%	113%	91%	93%
	ATCC 33592	97%	107%	91%	93%
	ATCC 43300	94%	110%	90%	92%
	ATCC 700698	92%	113%	89%	91%
	ATCC 700699	88%	95%	98%	96%
	ATCC 9144	82%	91%	88%	84%
	ATCC BAA-44	90%	101%	93%	94%
	Promedio	89%	102%	88%	90%
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	90%	101%	91%	90%
	ATCC 12228	90%	101%	93%	91%
	ATCC 700296	86%	90%	81%	82%
	ATCC 49461	90%	99%	93%	85%
	ATCC 49134	89%	96%	96%	90%
	Promedio	89%	98%	91%	88%
<i>S. pseudintermedius</i>	ATCC 49444	92%	103%	95%	93%
	Promedio total	89%	101%	89%	89%

A una dilución de 1:20, M[10P]-154 mostró un promedio del 88% de inhibición de la formación de biopelículas

en todos los ensayos de cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que M[20P]-576 mostró un promedio del 90%. Las dos mezclas mostraron una menor actividad antimicrobiana en una cepa: ATCC 6538 (45% para M[10P]-154, 60% para M[20P]-576). M[10P]-154 mostró un promedio del 91% de inhibición del crecimiento planctónico en todas las cepas *Staphylococcus epidermidis* probadas mientras que M[20P]-576 mostró un promedio del 88%. (véase la Tabla 6-3). Las dos mezclas mostraron más de respectivamente el 95% (M[10P]-154) y el 93% (M[20P]-576) de porcentaje de inhibición en la *Staphylococcus pseudintermedius* probada. Por tanto, M[10P]-154 y M[20P]-576 han demostrado actividad antibiopelícula en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus pseudintermedius* a dilución 1:20.

Ejemplo 7

La solución de la mezcla [20C]-576 (descrita en el Ejemplo 6) usada para las siguientes formulaciones se preparó de acuerdo con los Métodos A y B descritos previamente, con la excepción de la etapa de filtración, que en este Ejemplo se realiza mediante filtración por succión con un embudo Büchner relleno con una capa hidrófila de algodón de 5 cm de espesor. Para mayor claridad, en el siguiente Ejemplo esta solución filtrada de algodón se denominará SK576.

Se prepararon una pomada y dos cremas que iban a usarse para aplicaciones tópicas con un método de emulsificación como sigue:

- Se prepararon la Fase A y la Fase B mezclando con agitación orbital en dos vasos de precipitados separados los siguientes ingredientes:

	Fase A	Fase B
Pomada	- 73,8 g de aceite de almendra orgánico (Hyteck, "Aroma Zone"TM, Francia) - 18,5 g de cera de abejas orgánica (Hyteck, "Aroma Zone"TM, Francia) - 9,7 g de manteca de karité orgánica (Hyteck, "Aroma Zone"TM, Francia) - 1,0 ml de tocoferol natural (Hyteck, "Aroma Zone"TM, Francia)	- 29,6 g de SK576, preparado como se describe en el Ejemplo 6 - 13,5 g de glicerina orgánica (The Naissance Trading & Innovation, "Naissance"TM, UK) - 2,7 g de ácido ascórbico (Hyteck "Aroma Zone"TM, Francia)
Crema 1	- 30,4 g de aceite de almendra orgánico (Hyteck, "Aroma Zone", Francia): - 8,3 g de Olivem® orgánico 1000 (Hyteck, "Aroma Zone"TM, Francia) - 3,1 g de mentol (Hyteck "Aroma Zone"TM, Francia) - 1,0 ml de tocoferol natural (Hyteck, "Aroma Zone"TM, Francia)	- 51,5 g de SK576, preparado como se describe en el Ejemplo 6 - 14,9 g de glicerina orgánica (The Naissance Trading & Innovation "Naissance"TM, UK)
Crema 2	- 14,9 g de aceite de almendra orgánico (Hyteck "Aroma Zone"TM, Francia): - 11,8 g de Olivem® orgánico 1000 (Hyteck "Aroma Zone"TM, Francia) - 5,1 g de manteca de karité orgánica (Hyteck "Aroma Zone"TM, Francia) - 1,0 ml de tocoferol natural (Hyteck "Aroma Zone"TM, Francia)	- 160,0 g de SK576, preparado como se describe en el Ejemplo 6 - 10 g de glicerina orgánica (The Naissance Trading & Innovation, "Naissance"TM, UK)

- Los dos vasos de precipitados se calentaron a 70° C usando un baño de agua caliente y se mantuvo a 70° C durante 10 min para evitar la cristalización de cera de abejas.

- La Fase B se vertió lentamente en la Fase A, manteniendo el vaso de precipitados en el baño de agua caliente y con agitación constante mediante un mezclador de inmersión mecánico (Moulinex "Infyniforce_hand blender", Francia).

- El vaso de precipitados que contenía la mezcla de las fases A y B se retiró después del baño caliente y se formó la pomada usando una "batidora de mayonesa" por inmersión (batidora Moulinex "Infyniforce_hand", Francia).

Se preparó un gel para ser usado para aplicaciones tópicas mediante:

- Filtrado de 20,6 g de SK576, en un filtro de jeringa hidrófilo (0,22 µm).

- Agregado 0,75 g de polvo de xantano (Hyteck "Aroma Zone"TM, Francia) y 0,25 g de ácido ascórbico (Hyteck "Aroma Zone"TM, Francia) a la solución filtrada y mezclando con una espátula durante 5-10 min para formarla.

Se preparó una solución de pulverización para ser usada para aplicaciones tópicas mediante:

- Mezclado 5,5 g de SK576 con 11,9 g de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, Francia) en un vaso de precipitados de 20 ml que se almacenó en un refrigerador a 5° C durante 3 h.
- Colocación del vaso de precipitados con la mezcla fría en un baño de hielo-agua y añadiendo suavemente 0,7 g de Kolliphor® P-407 (Sigma-Aldrich, Francia) bajo agitación con una barra magnética y un agitador.
- Después de 30 min de agitación en baño de hielo-agua, la solución se cargó en un pulverizador de reactivo (CAMAG, Suiza) para la administración.

El protocolo de cada una de estas cinco preparaciones se puede ampliar a escala fácilmente a diferentes volúmenes de preparación manteniendo la misma cantidad relativa de cada ingrediente.

Ejemplo 8

Actividad biológica de un extracto acuoso de la invención en un modelo de ratón letal por infección de *Staphylococcus aureus*

Introducción

La cepa de *S. aureus* Newman se aisló en 1952 de una infección humana y se ha usado ampliamente en modelos animales de infecciones estafilocócicas debido a su fenotipo de virulencia robusto.

Se han usado extensamente ratones OF1 hembra para estudiar la patogénesis inducida por *Staphylococcus aureus*. Los primeros trabajos sobre la patogénesis de las infecciones de *Staphylococcus aureus* usaron la vía intraperitoneal de desafío para infectar y tratar ratones debido a su facilidad técnica.

El objetivo de este ejemplo fue evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto acuoso de la invención en ratones OF1 hembra infectados con dosis letal de *Staphylococcus aureus* Newman. El tratamiento se administró por vía oral de acuerdo con el programa Q1Dx10, de 2 días antes de la infección a 7 días después de la infección. La monitorización de la mortalidad se realizó desde D0 a D15.

Se usó vehículo como control negativo.

Material y métodos

Sustancia de ensayo y controles

Sustancia de ensayo: Extracto acuoso M[20C] 576 (obtenido a partir de 120 g/l de composición herbaria, preparado como se describe en el Ejemplo 6). Se proporcionó en 11 viales que contenían 1.200 µl de cada uno de los extractos acuosos. Se almacenó a -20° C.

Vehículo: Solución acuosa de sacarosa al 10%. Se almacenará a -20° C.

Cepa bacteriana: cepa Newman de *Staphylococcus* (proporcionada por el Dr. T. Foster, Trinity College, Dublin, Irlanda, Lote No 14156, LST4).

Adquisición y confinamiento de animales

Se adquirieron veinte (20) ratones hembra Crl:OF1 (no cruzados), de 6 semanas de edad, de Charles River (L'Arbresle Francia).

La unidad de cuidado de animales fue autorizada por el ministerio francés de agricultura e investigación (número de acuerdo B35-288-1). Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices éticas de experimentaciones con animales (Principes d'éthique de l'expérimentation animale, Directiva n°86/609 CEE del 24 de noviembre de 1986, Décret n° 87/848 del 19 de octubre de 1987, Arrêté d'Application del 19 de abril 1988).

Los animales se mantuvieron en habitaciones "A2" en condiciones controladas de temperatura (22 ± 3° C), humedad (50 ± 20 %), fotoperíodo (12 h de luz/12 h de oscuridad), intercambio de aire y baja presión. El sistema de tratamiento de aire está programado para 14 cambios de aire por hora, sin recirculación.

Se proporcionaron alimento y agua *ad libitum*, estando colocado en la tapa metálica encima de la jaula.

Tratamiento y diseño experimental

Preparación de bacterias - Amplificación de bacterias para exposición

Se descongeló un vial de bacterias y se cultivaron 100 µl de inóculo en 50 ml de caldo de soja tríptico (TSB, Ref. 43592 o 22902, Sigma). Las bacterias se incubaron a 37° C durante 20 h con agitación a 110 rpm en un agitador horizontal. La suspensión bacteriana se diluirá a 1/20 (100 µl + 1,9 ml de TSB) y la densidad óptica se leerá a 680 nm (D.O.680 nm).

A continuación, se centrifugaron 10 ml de bacterias a 5.200 rpm (3400 g) durante 10 min a 4° C. Se desechó el sobrenadante y se solubilizaron las bacterias en 10 ml de DPBS (ref. BE17-512F, Lonza, Francia). La suspensión bacteriana (C0) se diluyó a 1/20 (100 µl + 1,9 ml de DPBS) y se medirá la D.O.680 nm.

La D.O. 680 nm medida antes y después de la centrifugación debe ser similar.

La concentración de UFC/ml de la solución bacteriana se calculó como sigue:

$$\text{CFU/ml} = (\text{D.O.680 nm} \times 20 \text{ (factor de dilución)}) \times 6.5.108 \text{ (CFU/U.D.O)}$$

Preparación de mucina

Se preparó mucina (Sigma, Francia) al 20% 14-16 días antes del tratamiento tal como se describe a continuación:

Se precalentó DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) a 56° C y se transfirieron ¾ del volumen final a un mezclador, luego se agregará mucina de cerdo y se mezclará. El mezclador se lavó con el volumen restante de DPBS. A continuación, la solución de mucina al 20% se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se incubó a 37° C con agitación durante 1 hora y 30 minutos. Los ¾ de solución de mucina al 20% se transfirieron a un frasco estéril. El ¼ restante de la solución se almacenó por separado. Después, los ¾ y el ¼ de las soluciones se esterilizaron por autoclave. Se almacenó una solución estéril de mucina de cerdo al 20% a +4° C.

El día anterior a la infección, el pH de los ¾ de solución de mucina al 20% se ajustó a 7,4 añadiendo NaOH filtrado al 30%. Si era necesario, se usó una parte del ¼ de solución restante para ajustar el pH.

Preparación de bacterias

De acuerdo con los resultados de O.D. 680 nm, las bacterias (C0) se diluyeron en DPBS para alcanzar la concentración de $6,8 \times 10^7$ UFC/ml. Estas suspensiones se diluyeron a la mitad en mucina de cerdo al 20% para obtener la concentración de DL80 de $3,4 \times 10^7$ UFC/ml en PBS-mucina de cerdo al 10%. La suspensión utilizada para el tratamiento se puso en un tubo que contenía perlas de vidrio estériles (4 mm, ref. 068502, Dutscher, Francia). La suspensión no se agitó con vórtex, sino que se mezcló invirtiendo los tubos. Las bacterias se colocaron en hielo antes de los tratamientos y se mantuvieron en hielo durante el tratamiento.

Determinación de UFC

Para determinar la concentración exacta de la suspensión bacteriana antes y después de inocularla en los animales, la suspensión bacteriana se diluyó en diluciones en serie de 10 veces en DPBS-0,5% Tween 20 (Sigma, Francia) como se describe en la Tabla 8-1 en pocillos profundos (50 µl de bacterias + 450 µl de DPBS-0,5% de Tween 20). A continuación, se sembraron 6 x 50 µl de diluciones bacterianas 3, 4, 5 y 6 en placa de agar de soja tríptico (agar de soja tríptico, Sigma) y se colocaron a 37° C durante la noche. Se contaron las colonias para determinar las UFC reales (unidades formadoras de colonias) de inóculos.

La numeración se realizó en la gota (50 µl) que contenía entre 20 y 100 colonias. Los recuadros sombreados corresponden a las diluciones sembradas en placas.

Tabla 8-1: Diluciones de la suspensión bacteriana para determinar las UFC (viabilidad) reales de los inóculos. Las casillas sombreadas corresponden a las diluciones sembradas en las placas.

	Diluciones					
	1	2	3	4	5	6
Suspensión bacteriana nocturna en PBS	1/10	1/100	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁵	1/10 ⁶
Por ejemplo, concentración inicial: 3.4×10^7 CFU/ml	3.4×10^6	3.4×10^5	34000	3400	340	34
Número de colonias / 50 µl (1 gota)	1.7×10^5	1.7×10^4	1.7×10^3	170	17	1.7

Aleatorización

Antes del experimento (D-2), se aleatorizaron 20 ratones hembra OF1 sanos en 2 grupos de 10 ratones/grupo según criterios de peso corporal, de modo que los pesos corporales medios de los grupos no eran estadísticamente diferentes.

Tratamientos

Los tratamientos se realizaron desde D-2 hasta D7 (D0: día de la inoculación de bacterias) mediante administración oral (PO). Las inoculaciones bacterianas se realizaron mediante inyección intraperitoneal (IP).

Inoculación

Se inoculó a los ratones D0 una suspensión bacteriana. Cada inoculación consistió en una inyección intraperitoneal de 500 µl de la suspensión a $3,4 \times 10^7$ CFU/ml ($1,7 \times 10^7$ CFU/ ratón).

Diseño experimental

Los animales se trataron con una administración oral de la sustancia de ensayo desde D-2 hasta D7. En D0, los tratamientos se realizaron 1 hora después de la inoculación de bacterias.

Los grupos experimentales se definirán como se describe a continuación y se resumen en la Tabla 8-2.

- Los 10 ratones del grupo 1 se tratarán de D-2 a D7 con el vehículo mediante administración oral de acuerdo con el programa de tratamiento Q1DX10.
- Los 10 ratones del grupo 2 se tratarán de D-2 a D7 con la sustancia de prueba mediante administración oral según el programa de tratamiento Q1DX10.

Tabla 8-2: Diseño experimental

Grupos	Número de ratones	Sustancia de ensayo	Vía de administración	Volumen de administración	Programa de tratamiento	Modelo bacteriano
1	10	Vehículo	PO	10 mL/kg	Q1DX10 (de D-2 a D7)	Newman letal para IP <i>Staphylococcus aureus</i> (3.4×10^7 UFC/ml) 500 µl

Monitorización de animales

Desde D0 hasta D1, se observó la mortalidad de los ratones dos veces al día.

Desde D2 hasta D15, se observó la mortalidad de los ratones una vez al día.

El peso corporal de los ratones se registró dos veces a la semana hasta el final del experimento.

Las observaciones clínicas detalladas (cambios en la piel, piel, ojos, membranas mucosas, aparición de secreciones y excreciones, función respiratoria, cambios en la marcha, postura) se monitorizaron dos veces a la semana como se describe en la Tabla 8-3 a continuación por ejemplo. La descripción de esta lista no es exhaustiva y se complementó con otras observaciones, de ser necesario.

Tabla 8-3 Observaciones/parámetros clínicos

Parámetros	Descripción detallada	Parámetros	Descripción detallada	Parámetros	Descripción detallada
Movilidad/Gail	Estacionario	Comportamiento	Temible	Pelaje	Normal
	Reducida		Normal		Contaminado
	Normal		Agresivo		Pérdida
	Excesivo		Lenta		Coloreado
Carro	Normal	Respiración	Normal	Membranas mucosas	No aplicable
	Próstata		Velocidad		Normal
Parálisis	No		Irregular		Anormal (nariz)
	Delantera derecha	Ojos	Normal		Anormal
	Delantera izquierda		Desgarrable		(boca)
	Trasera derecha		Cerrado		Anormal
	La parte trasera izquierda	Piel	Normal		(nariz/boca)

(continuación)

Parámetros	Descripción detallada	Parámetros	Descripción detallada	Parámetros	Descripción detallada
	Derecha		Enrojecimiento		Poco
	A la izquierda		Parche		Normal
	Frente delantero		Herida		Abundante
	Trasero		Hematoma	Excreciones	Seco

Sacrificio de ratones

En el D15, los ratones supervivientes se sacrificaron por exanguinación, seguido de dislocación cervical, si fuera necesario. No se realizó autopsia.

Resultados

El análisis de supervivencia de los ratones mostró los resultados presentados en las siguientes Tablas 8-4 y 8-5.

Tabla 8-4 El número de ratones que sobrevivió por día

Número de ratones supervivientes al día										
Grupos	Nd0	N D1	Nd2	Nd3	Nd4	N D5	ND6	N D7	N D8	
Grupo 1 (vehículo, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	10	6	6	5	5	3	2	NA	0	
Grupo 2 (TS puro, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	10	6	6	6	6	6	4	NA	3	

Tabla 8-5 Porcentaje de ratones supervivientes al día

Porcentaje de supervivencia										
Grupos	Nd0	N D1	Nd2	Nd3	Nd4	N D5	ND6	N D7	N D8	
Grupo 1 (vehículo, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	100%	60%	60%	50%	50%	30%	20%	ND	0%	
Grupo 2 (TS puro, PO, Q1Dx10, 10 ml/kg)	100%	60%	60%	60%	60%	60%	40%	ND	30%	

ND = No disponible

El tratamiento permitió reducir la mortalidad de los ratones del 100% al 70%. Este estudio con animales demostró, por lo tanto, que se observaron las actividades antimicrobianas y antibiopelículas reivindicadas *in vitro* lo cual se traduce en un efecto terapéutico, cuando el extracto acuoso de la invención se administra por vía oral a animales.

Ejemplo 9

En este Ejemplo ilustramos actividades antimicrobianas y antibiopelículas simultáneas contra *Staphylococcus aureus* de la composición divulgada de 2 plantas entre 3: *Filipendula ulmaric* PA13, *Camellia sinensis* PA21, *Arcostaphylos uva-ursi* PB12 y al menos 1 planta entre 3: *Eugenia caryophyllus* PC20, *Vitis vinifera var. tinctorial* PA22, *Desmodium adscendens* PB07. Las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia).

Partiendo de estos tres polvos vegetales diferentes se prepararon seis composiciones herbarias según el método A notificado anteriormente.

Lista 9-1 : composiciones herbarias de muestras procesadas

M[02P]-064: PA13; PA21;
M[03P]-050: PA13; PA21; PC20;
M[03P]-053: PA13; PA21; PB07;
M[03P]-056: PA13; PA21; PA22;
M[02P]-065: PA13; PB12;
M[03P]-051: PA13; PB12; PC20;
M[03P]-054: PA13; PB12; PB07;
M[03P]-057: PA13; PB12; PA22;
M[02P]-066: PA21; PB12;

M[03P]-052: PA21; PB12; PC20;
 M[03P]-055: PA21; PB12; PB07;
 M[03P]-058: PA21; PB12; PA22;
 M[03P]-059: PA13; PB12; PA21;
 M[04P]-025: PA13; PB12; PA21; PC20;
 M[04P]-026: PA13; PB12; PA21; PB07;
 M[04P]-027: PA13; PB12; PA21; PA22.

Partiendo de las composiciones herbarias enumeradas en la Lista 6-3 se prepararon extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 40 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración.

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 6538, con las siguientes diluciones finales de muestras procesadas: 1:5 para la inhibición de la formación de biopelículas y 1:10 para la inhibición del crecimiento. Obsérvese que la inhibición del crecimiento es cercana al 100% para cada mezcla a una dilución de 1:5, y la inhibición de la formación de biopelículas es cercana al 0% para todas las mezclas a una dilución de 1:10.

El porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre toda la cepa probada de las muestras procesadas obtenidas de las diferentes composiciones herbarias se informan en la siguiente Tabla 9-1.

Tabla 9-1: promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 de la muestra tratada según las composiciones proporcionadas en el Listado 9-1. Las muestras tratadas se utilizaron en una dilución de 1:10 para las pruebas de inhibición del crecimiento planctónico y en una dilución de 1:5 para la inhibición de la formación de biopelícula.

(A)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula	(B)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
M[D2P]-064	47%	34%	M[D2P]-065	42%	15%
M[03P]-050	70%	56%	M[03P]-051	59%	36%
M[03P]-053	55%	35%	M[03P]-054	54%	22%
M[03P]-056	56%	38%	M[03P]-057	54%	34%
(C)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula	(D)	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
M[02P]-066	40%	23%	M[03P]-D59	59%	87%
M[03P]-052	53%	28%	M[04P]-025	69%	90%
M[03P]-055	59%	27%	M[04P]-026	64%	90%
M[03P]-058	60%	33%	M[04P]-027	64%	89%

(A) enumera extractos obtenidos de composiciones herbarias que contienen PA13 y PA21, en las que la adición de uno entre PC20, PB07 y PA22 mejora la actividad; (B) enumera extractos obtenidos de composiciones herbarias que contienen PA13 y PB12, en las que la adición de uno entre PC20, PB07 y PA22 mejora la actividad; (C) enumera extractos obtenidos de composiciones herbarias que contienen PA13, PA21 y PB12, en las que la adición de uno entre PC20, PB07 y PA22 mejora la actividad; (D) enumera extractos obtenidos de composiciones herbarias que contienen PA13 y PA21, en las que la adición de uno entre PC20, PB07 y PA22 mejora la actividad.

Ejemplo 10

En este Ejemplo, ilustramos actividades antimicrobianas y antibiopelículas simultáneas contra *Staphylococcus aureus* de 324 extractos de mezclas obtenidos a partir de composiciones herbarias divulgadas que comprenden 2 plantas entre 3: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arcostaphylos uva-ursi* (PB12) y al menos 1 planta entre 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera* var. *tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens*

(PB07).

Para las mezclas de M[20C]-2083 a M[20C]-20798, las plantas secas de grado farmacéutico se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia). Para las mezclas de M[20C]-2805 a M[20C]-2957, las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Pharmacie Fontgieve" (Clermont-Ferrand, Francia, plantas PA00 a PB12) y "Pharmacie St Herem" (Clermont-Ferrand, Francia, plantas PB13 a PD02).

Se prepararon composiciones herbarias que contenían de 3 a 20 polvos vegetales según el Método A descrito previamente.

Partiendo de las composiciones herbarias, se prepararon los extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 40 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración.

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 y ATCC 14775, con las diluciones finales 1:20 de las muestras procesadas.

El promedio de porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y el promedio de porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas analizadas de las muestras procesadas obtenidas de las siguientes composiciones herbarias de, respectivamente, la Lista 10-1, la Lista 10-2, la Lista 10-3 y la Lista 10-4 se proporcionan, respectivamente, en la Tabla 10-1, la Tabla 10-2, la Tabla 10-3 y la Tabla 10-4. En cada conjunto, Se descubrió que los extractos obtenidos a partir de composiciones herbarias que contenían más de 3 o 4 plantas mostraban inhibición del crecimiento planctónico o inhibición de la formación de biopelículas (o ambas inhibiciones) mayor que cualquiera de las mezclas que contenían solo 3 o 4 plantas.

Lista 10-1: Extractos de composiciones herbarias que contienen 2 plantas entre 3: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21) y al menos una de 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[03P]-050: PA13; PA21; PC20;
M[03P]-053: PA13; PA21; PB07;
M[03P]-056: PA13; PA21; PA22;
M[20C]-2808: PA11; PA12; PA13; PA18; PA21; PA23; PA24; PA28; PA69; PB07; PB88; PC23; PC24; PC49;
PC52; PC55 (2 cucharas); PC60; PC97;
M[20C]-2820: PA10; PA11 (2 cucharas); PA12; PA13; PA14; PA18; PA20; PA21; PA25; PA29; PA33; PA35; PA67;
PA75; PB07; PB60; PC33; PC35; PC55;
M[20C]-2821: PA11; PA13 (2 cucharas); PA19; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA33; PA35; PA75; PB07; PB36;
PC20; PC33 (2 cucharas); PC49; PC55; PC97;
M[20C]-2826: PA11; PA13 (2 cucharas); PA20; PA21; PA24; PA25; PA29; PA33; PA34; PA35; PA52; PA70; PA75;
PB07; PC11; PC21; PC33; PC37; PC74;
M[20C]-2827: PA10; PA11; PA13 (2 cucharas); PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA35; PA57; PA75; PB02;
PB07; PB28; PC11; PC23; PC33; PC49;
M[20C]-2830: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA18; PA21; PA22; PA25; PA29; PA32; PA34; PA67; PB07; PB60;
PB88; PC33; PC35; PC55; PC98;
M[20C]-2831: PA13; PA13; PA19; PA21; PA22; PA22; PA25; PA29; PA32; PA34; PB07; PB36; PB88; PC20; PC33;
PC33; PC49; PC55; PC97; PC98;
M[20C]-2833: PA10; PA11; PA13; PA14; PA21; PA22; PA24; PA25; PA26; PA29; PA32; PA34; PB33; PB88; PB88;
PC12; PC23; PC27; PC33; PC98;
M[20C]-2836: PA13; PA13; PA21; PA22; PA24; PA25; PA29; PA32; PA34; PA34; PA52; PA70; PB07; PB88; PC11;
PC21; PC33; PC37; PC74; PC98;
M[20C]-2837: PA10; PA13 (2 cucharas); PA21; PA22; PA25; PA26; PA29; PA32; PA34; PA57; PB02; PB07; PB28;
PB88; PC11; PC23; PC33; PC49; PC98;
M[20C]-2838: PA12; PA13 (2 cucharas); PA18; PA21; PA21; PA22; PA24; PA25; PA29; PA32; PA34; PB88; PC23;
PC33; PC49; PC52; PC55; PC97; PC98;
M[20C]-2839: PA13 (2 cucharas); PA14; PA21; PA22; PA25; PA25; PA26; PA29; PA32; PA34; PA39; PA52; PA57;
PB33; PB88; PC33; PC71; PC97; PC98;
M[20C]-2858: PA12; PA13; PA18; PA20; PA21; PA23; PA24; PA24; PA67; PB07; PB28; PB33; PC12; PC20; PC21;
PC23; PC49; PC52; PC55; PC97;
M[20C]-2861: PA13; PA19; PA21; PA22 (2 cucharas); PB07; PB28; PB36; PB60; PC11; PC20; PC20; PC23; PC33;
PC49; PC55 (2 cucharas); PC60; PC74; PC97;
M[20C]-2866: PA13; PA21; PA22; PA24; PA34; PA52; PA70; PB07; PB28; PB60; PC11 (2 cucharas); PC20; PC21;
PC23; PC37; PC55; PC60; PC74 (2 cucharas);
M[20C]-2867: PA10; PA13; PA21; PA22; PA26; PA57; PB02; PB07; PB28; PB28; PB60; PC11 (2 cucharas); PC20;
PC23; PC23; PC49; PC55; PC60; PC74;

M[20C]-2868: PA12; PA13; PA18; PA21; PA21; PA22; PA24; PB28; PB60; PC11; PC20; PC23 (2 cucharas); PC49; PC52; PC55 (2 cucharas); PC60; PC74; PC97;
M[20C]-2869: PA13; PA14; PA21; PA22; PA25; PA26; PA39; PA52; PA57; PB28; PB33; PB60; PC11; PC20; PC23; PC55; PC60; PC71; PC74; PC97;
5 M[20C]-2871: PA10; PA11; PA13; PA19; PA21; PA22; PA35; PA57; PB07; PB07; PB36; PB77; PC20 (2 cucharas); PC23; PC33; PC49; PC55; PC71; PC97;
M[20C]-2876: PA10; PA11; PA13; PA21; PA24; PA34; PA35; PA52; PA57; PA70; PB07 (2 cucharas); PB77; PC11; PC20; PC21; PC23; PC37; PC71; PC74;
10 M[20C]-2877: PA10; PA10; PA11; PA13; PA21; PA26; PA35; PA57; PA57; PB02; PB07; PB28; PB77; PC11; PC20; PC23 (2 cucharas); PC49; PC71;
M[20C]-2878: PA10; PA11; PA12; PA13; PA18; PA21; PA21; PA24; PA35; PA57; PB07; PB77; PC20; PC23; PC23; PC49; PC52; PC55; PC71; PC97;
M[20C]-2879: PA10; PA11; PA13; PA14; PA21; PA25; PA26; PA35; PA39; PA52; PA57 (2 cucharas); PB07; PB33; PB77; PC20; PC23; PC71 (2 cucharas); PC97;
15 M[20C]-2889: PA10; PA12; PA13; PA14; PA18; PA21; PA26; PA26; PA28; PA29; PA33; PA39; PA75; PB36; PC20; PC52; PC55 (2 cucharas); PC60;
M[20C]-2894: PA11 (2 cucharas); PA13; PA21; PA28; PA39; PA39; PA70; PB02; PB02; PB07; PB99 (2 cucharas); PC14; PC20; PC49; PC71; PC97; PC98;
M[20C]-2944: PA10; PA11 (2 cucharas); PA13; PA14; PA21; PA28; PA39; PA70; PB02; PB07; PB27; PB99; PC11; PC20; PC23; PC67; PC71; PC97; PC98;
20 M[20C]-2954: PA11; PA12; PA13; PA14; PA21; PA23; PA28; PA33; PA39; PA70; PB01; PB02; PB07; PB99; PC20; PC27; PC52; PC71; PC97; PC98.

Tabla 10-1: promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas en la muestra tratada según los extractos del Listado 10-1 a una dilución de 1:20.

	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
M[03C]-050	41%	31%
M[D3C]-053	37%	23%
M[03C]-056	34%	21%
M[20C]-2808	66%	30%
M[20C]-2820	54%	27%
M[20C]-2821	53%	24%
M[20C]-2826	56%	25%
M[20C]-2827	51%	26%
M[20C]-2830	56%	37%
M[20C]-2831	64%	31%
M[20C]-2833	80%	39%
M[20C]-2836	59%	25%
M[20C]-2837	58%	25%
M[20C]-2838	70%	30%
M[20C]-2839	56%	30%

	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
M[20C]-2858	58%	32%
M[20C]-2861	58%	31%
M[20C]-2866	57%	43%
M[20C]-2867	62%	32%
M[20C]-2868	74%	36%
M[20C]-2869	85%	45%
M[20C]-2871	63%	26%
M[20C]-2876	66%	28%
M[20C]-2877	81%	43%
M[20C]-2878	65%	28%
M[20C]-2879	58%	28%
M[20C]-2889	62%	41%
M[20C]-2894	55%	29%
M[20C]-2944	68%	16%
M[20C]-2954	75%	27%

Lista 10-2: extractos de composiciones herbarias que contienen: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Arcostaphylos uva-ursi* (PB12) y al menos una entre 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[03C]-051: PA13; PB12; PC20;
M[03C]-054: PA13; PB12; PB07;
M[03C]-057: PA13; PB12; PA22;
M[20C]-2083: PA02; PA13; PA28 (2 cucharas); PA31; PA36; PA40; PA79; PA93; PB01; PB12; PB17; PB18; PB31; PB51; PB77; PC20; PC58; PC64; PC66;

M[20C]-2084: PA13; PA28; PA31; PA36; PA61; PA76; PA76; PA79; PA82; PB01; PB10; PB12; PB17; PB31; PB57;
 PC20; PC36; PC41; PC64; PC66;
 M[20C]-2085: PA12; PA13; PA14; PA28; PA30; PA31; PA36; PA79; PA94; PB00; PB01; PB08; PB12; PB17; PB31;
 PC02; PC14; PC20; PC64; PC66;
 5 M[20C]-2090: PA08; PA13; PA20; PA23; PA26; PA32; PA46; PA52; PA57; PA79; PA95; PB10; PB12; PB33; PB76;
 PB82; PC08; PC20; PC21; PD00;
 M[20C]-2091: PA08; PA13; PA26; PA52; PA57; PA72; PA79; PA88; PA92; PA95; PB12; PB60; PB76; PB83; PC08;
 PC11; PC20; PC26; PC68; PD00;
 M[20C]-2092: PA08; PA13; PA17; PA26; PA52; PA53; PA57; PA79; PA95; PB06; PB12; PB50; PB76; PC08; PC20;
 10 PC20; PC27; PC97; PD00; PD02;
 M[20C]-2100: PA13; PA20; PA23; PA32; PA41; PA46; PA53; PA79; PA80; PA90; PB08; PB10; PB12; PB33; PB82;
 PB85; PC20; PC21; PC28; PC75;
 M[20C]-2102: PA13; PA17; PA41; PA53; PA53; PA79; PA80; PA90; PB06; PB08; PB12; PB50; PB85; PC20; PC20;
 PC27; PC28; PC75; PC97; PD02;
 15 M[20C]-2104: PA13; PA41; PA53; PA61; PA76; PA76; PA79; PA80; PA82; PA90; PB08; PB10; PB12; PB57; PB85;
 PC20; PC28; PC36; PC41; PC75;
 M[20C]-2105: PA12; PA13; PA14; PA30; PA41; PA53; PA79; PA80; PA90; PA94; PB00; PB08; PB08; PB12; PB85;
 PC02; PC14; PC20; PC28; PC75;
 M[20C]-2110: PA00; PA10; PA13; PA20; PA23; PA25; PA30; PA32; PA46; PA52; PA79; PB05; PB10; PB12; PB33;
 20 PB82; PC01; PC20; PC21; PD07;
 M[20C]-2111: PA00; PA10; PA13; PA25; PA30; PA52; PA72; PA79; PA88; PA92; PB05; PB12; PB60; PB83; PC01;
 PC11; PC20; PC26; PC68; PD07;
 M[20C]-2120: PA11; PA13; PA16; PA20; PA23; PA32; PA44; PA46; PA60; PA67; PA73; PA79; PB10; PB12; PB33;
 PB48; PB82; PC17; PC20; PC21;
 25 M[20C]-2122: PA11; PA13; PA16; PA17; PA44; PA53; PA60; PA67; PA73; PA79; PB06; PB12; PB48; PB50; PC17;
 PC20; PC20; PC27; PC97; PD02;
 M[20C]-2131: PA05; PA13; PA18; PA37; PASS; PA72; PA72; PA79; PA88; PA92; PA97; PB04; PB12; PB60; PB83;
 PC11; PC20; PC26; PC35; PC68;
 M[20C]-2135: PA05; PA12; PA13; PA14; PA18; PA30; PA37; PA55; PA72; PA79; PA94; PA97; PB00; PB04; PB08;
 30 PB12; PC02; PC14; PC20; PC35;
 M[20C]-2137: PA05; PA13; PA18; PA27; PA37; PA46; PA55; PA72; PA79; PA82; PA97; PB00; PB04; PB11; PB12;
 PC20; PC35; PC45; PC52; PC67;
 M[20C]-2140: PA13; PA14; PA20; PA23; PA32; PA37; PA46; PA79; PA85; PB10; PB12; PB33; PB49; PB82; PB98;
 PC20; PC21; PC55; PC62; PC98;
 35 M[20C]-2141: PA13; PA14; PA37; PA72; PA79; PA85; PA88; PA92; PB12; PB49; PB60; PB83; PB98; PC11; PC20;
 PC26; PC55; PC62; PC68; PC98;
 M[20C]-2142: PA13; PA14; PA17; PA37; PA53; PA79; PA85; PB06; PB12; PB49; PB50; PB98; PC20; PC20; PC27;
 PC55; PC62; PC97; PC98; PD02;
 M[20C]-2143: PA02; PA13; PA14; PA28; PA37; PA40; PA79; PA85; PA93; PB12; PB18; PB49; PB51; PB77; PB98;
 40 PC20; PC55; PC58; PC62; PC98;
 M[20C]-2144: PA13; PA14; PA37; PA61; PA76; PA76; PA79; PA82; PA85; PB10; PB12; PB49; PB57; PB98; PC20;
 PC36; PC41; PC55; PC62; PC98;
 M[20C]-2150: PA13; PA20; PA23; PA31; PA32; PA46; PA60; PA74; PA79; PB03; PB10; PB12; PB33; PB82; PC20;
 PC21; PC29; PC37; PC60; PC86;
 45 M[20C]-2151: PA13; PA31; PA60; PA72; PA74; PA79; PA88; PA92; PB03; PB12; PB60; PB83; PC11; PC20; PC26;
 PC29; PC37; PC60; PC68; PC86;
 M[20C]-2152: PA13; PA17; PA31; PA53; PA60; PA74; PA79; PB03; PB06; PB12; PB50; PC20; PC20; PC27; PC29;
 PC37; PC60; PC86; PC97; PD02;
 M[20C]-2153: PA02; PA13; PA28; PA31; PA40; PA60; PA74; PA79; PA93; PB03; PB12; PB18; PB51; PB77; PC20;
 50 PC29; PC37; PC58; PC60; PC86;
 M[20C]-2154: PA13; PA31; PA60; PA61; PA74; PA76; PA76; PA79; PA82; PB03; PB10; PB12; PB57; PC20; PC29;
 PC36; PC37; PC41; PC60; PC86;
 M[20C]-2155: PA12; PA13; PA14; PA30; PA31; PA60; PA74; PA79; PA94; PB00; PB03; PB08; PB12; PC02; PC14;
 PC20; PC29; PC37; PC60; PC86;
 55 M[20C]-2163: PA06; PA13; PA17; PA20; PA23; PA72; PA79; PA80; PA92; PB01; PB03; PB10; PB12; PB33; PB57;
 PB82; PC20; PC62; PC86; PC97;
 M[20C]-2164: PA13; PA17; PA20; PA41; PA79; PA80; PA86; PA92; PB03; PB10; PB12; PC20; PC26; PC27; PC29;
 PC55; PC60; PC62; PC86; PC97;
 M[20C]-2214: PA13; PA37; PA41; PA79; PA86; PB00; PB10; PB12; PB49; PB82; PC20; PC26; PC27; PC29; PC55;
 60 PC60; PC62; PC66; PC86;
 M[20C]-2234: PA13; PA41; PA79; PA85; PA86; PB12; PB31; PB50; PB77; PC14; PC20; PC26; PC27; PC29; PC55;
 PC55; PC60; PC62; PC98;
 M[20C]-2241: PA10; PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA46; PA79; PB00; PB10; PB11; PB12; PB17; PB57; PC20;
 PC27; PC29; PC37; PC64; PC68;
 65 M[20C]-2242: PA13; PA14; PA17; PA23; PA36; PA37; PA60; PA61; PA76; PA79; PA82; PB00; PB06; PB12; PB49;

	PC20; PC27; PC29; PC68; PC98;
	M[20C]-2243: PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA52; PA53; PA73; PA79; PA92; PB00; PB01; PB12; PB18; PB60;
	PC20; PC20; PC27; PC29; PC68;
5	M[20C]-2248: PA13; PA14 (2 cucharas); PA23; PA25; PA36; PA36; PA37; PA46; PA79; PA85; PB00; PB12; PC02;
	PC20; PC27; PC29; PC29; PC55; PC68;
	M[20C]-2249: PA10; PA13; PA14; PA23; PA36; PA37; PA53; PA74; PA79; PA92; PB00; PB12; PC20; PC27; PC29;
	PC62; PC67; PC68; PC86; PC97;
	M[20C]-2250: PA13; PA23; PA37; PA76; PA79; PB10; PB12; PB33; PB50; PB82; PB82; PB85; PB98; PC01; PC11;
10	PC20; PC45; PC55; PC60; PD02;
	M[20C]-2253: PA13; PA37; PA52; PA53; PA73; PA79; PA92; PB01; PB10; PB12; PB18; PB33; PB50; PB60; PB82;
	PB85; PC01; PC20; PC20; PC45;
	M[20C]-2254: PA11; PA13; PA17; PA27; PA37; PA79; PB00; PB10; PB12; PB33; PB50; PB82; PB83; PB85; PB92;
	PB98; PC01; PC20; PC27; PC45;
15	M[20C]-2255: PA13; PA36; PA37; PA53; PA72; PA79; PA80; PB03; PB10; PB12; PB33; PB49; PB50; PB82; PB82;
	PB85; PC01; PC20; PC45; PC68;
	M[20C]-2256: PA13; PA23; PA37; PA53; PA61; PA79; PA85; PB10; PB12; PB33; PB50; PB60; PB82; PB85; PC01;
	PC11; PC20; PC29; PC45; PD02;
	M[20C]-2257: PA13; PA37; PA37; PA60; PA72; PA79; PB10; PB12; PB33; PB49; PB50; PB82; PB85; PC01; PC08;
20	PC20; PC45; PC68; PC98; PD02;
	M[20C]-2258: PA13; PA14; PA25; PA36; PA37; PA46; PA79; PA85; PB10; PB12; PB33; PB50; PB82; PB85; PC01;
	PC02; PC20; PC29; PC45; PC55;
	M[20C]-2259: PA10; PA13; PA37; PA53; PA74; PA79; PA92; PB10; PB12; PB33; PB50; PB82; PB85; PC01; PC20;
	PC45; PC62; PC67; PC86; PC97;
25	M[20C]-2261: PA10; PA13; PA23; PA36; PA37; PA46; PA53; PA73; PA79; PA97; PB10; PB11; PB12; PB17; PB57;
	PC20; PC26; PC29; PC37; PC64;
	M[20C]-2278: PA10; PA13; PA14; PA25; PA28; PA30; PA36; PA37; PA41; PA46; PA79; PA85; PB12; PB50; PB60;
	PC02; PC20; PC29; PC55; PC66;
	M[20C]-2281: PA10; PA13; PA17; PA46; PA52; PA79; PA82; PA92; PA96; PB10; PB11; PB12; PB17; PB57; PB98;
30	PC20; PC36; PC37; PC64; PC86;
	M[20C]-2321: PA13; PA46; PA53; PA79; PA82; PA92; PB03; PB10; PB11; PB12; PB83; PB85; PC20; PC20; PC21;
	PC55; PC60; PC86; PC97; PD02;
	M[20C]-2406: PA13; PA37; PA46; PA53; PA79; PA85; PB01; PB05; PB10; PB11; PB12; PB17; PB49; PB98; PC20;
	PC36; PC37; PC45; PC58; PC67;
35	M[20C]-2420: PA10; PA13; PA14; PA36; PA46; PA79; PB10; PB10; PB11; PB11; PB12; PB17; PB17; PB33; PB82;
	PC20; PC54; PC55; PC68; PC98;
	M[20C]-2441: PA00; PA13; PA14; PA17; PA17; PA37; PA37; PA46; PA74; PA79; PB00; PB03; PB10; PB12; PB49;
	PC08; PC20; PC35; PC62; PC86;
	M[20C]-2443: PA00; PA13; PA14; PA14; PA17; PA36; PA37; PA79; PB00; PB01; PB10; PB12; PC02; PC08; PC11;
40	PC20; PC29; PC62; PC67; PC86;
	M[20C]-2449: PA00; PA13; PA14; PA17; PA36; PA37; PA60; PA79; PA85; PB00; PB10; PB12; PB82; PB98; PC08;
	PC20; PC29; PC62; PC86; PC98;
	M[20C]-2451: PA10; PA13; PA17; PA23; PA37; PA46; PA74; PA76; PA79; PB00; PB03; PB08; PB10; PB12; PB49;
	PB49; PC20; PC35; PC97; PC98;
45	M[20C]-2460: PA08; PA13; PA14; PA36; PA36; PA46; PA79; PB10; PB11; PB12; PB17; PB17; PB98; PC20; PC36;
	PC54; PC62; PC68; PC68; PC86;
	M[20C]-2488: PA10; PA13; PA37; PA46; PA53; PA74; PA79; PA82; PB00; PB00; PB12; PB49; PC20; PC29; PC37;
	PC45; PC54; PC74; PC86; PC98;
	M[20C]-2545: PA00; PA08; PA10; PA13; PA46; PA73; PA76; PA79; PA90; PB01; PB08; PB10; PB12; PB17; PB33;
	PB33; PC20; PC55; PC68; PD02;
50	M[20C]-2551: PA13; PA14; PA16; PA27; PA36; PA79; PA82; PA92; PA95; PB10; PB12; PB57; PB85; PC11; PC20;
	PC29; PC29; PC54; PC64; PC98;
	M[20C]-2553: PA13; PA16; PA23; PA60; PA79; PA82; PA95; PB00; PB10; PB10; PB12; PB33; PB49; PB50; PB85;
	PC02; PC11; PC20; PC29; PC98;
55	M[20C]-2555: PA00; PA10; PA13; PA16; PA79; PA82; PA90; PA95; PB08; PB10; PB10; PB12; PB33; PB85; PC11;
	PC20; PC29; PC68; PC98; PD02;
	M[20C]-2580: PA10; PA13; PA25; PA37; PA40; PA46; PA79; PB11; PB12; PB33; PB49; PB82; PB85; PB98; PC20;
	PC29; PC29; PC36; PC45; PC97;
	M[20C]-2589: PA13; PA14; PA17; PA40; PA46; PA79; PA80; PB11; PB12; PB33; PB49; PB85; PB98; PC20; PC26;
60	PC29; PC37; PC86; PC97; PD02;
	M[20C]-2622: PA13; PA25; PA36; PA36; PA37; PA46; PA46; PA79; PA82; PB12; PB49; PB82; PC20; PC20; PC54;
	PC55; PC64; PC68; PC86; PC98;
	M[20C]-2627: PA13; PA14; PA36; PA46; PA76; PA79; PA80; PA96; PB12; PB49; PB49; PC20; PC20; PC45; PC54;
	PC55; PC64; PC97; PC98; PC98;
65	M[20C]-2641: PA05; PA13; PA16; PA27; PA36; PA37; PA41; PA79; PA96; PB05; PB10; PB12; PB82; PB85; PB98;
	PC11; PC20; PC54; PC68; PD02;

M[20C]-2651: PA13; PA36; PA41; PA46; PA79; PA92; PB00; PB01; PB05; PB12; PB33; PB82; PB82; PB85; PB98;
 PC20; PC54; PC55; PC86; PD02;
 M[20C]-2654: PA13; PA36; PA46; PA79; PA92; PB00; PB00; PB01; PB08; PB11; PB12; PB33; PB82; PC01; PC20;
 PC55; PC55; PC64; PC86; PC86;
 5 M[20C]-2717: PA13; PA14; PA46; PA79; PB00; PB10; PB12; PB49; PB50; PB77; PB85; PB85; PC02; PC20; PC29;
 PC64; PC64; PC68; PC98; PD02;
 M[20C]-2728: PA05; PA13; PA16; PA30; PA46; PA60; PA61; PA79; PA85; PB04; PB10; PB12; PB49; PB82; PB82;
 PB85; PB98; PC11; PC20; PC37;
 10 M[20C]-2730: PA13; PA36; PA37; PA46; PA61; PA79; PA82; PA85; PB00; PB12; PB17; PB33; PB82; PB85; PC01;
 PC02; PC20; PC29; PC64; PC98;
 M[20C]-2738: PA05; PA13; PA37; PA46; PA61; PA61; PA79; PA85; PB10; PB12; PB82; PB82; PB85; PB85; PB98;
 PC02; PC20; PC29; PC37; PC64;
 M[20C]-2788: PA00; PA05; PA13; PA27; PA46; PA61; PA79; PA82; PB00; PB10; PB12; PB82; PB85; PB85; PB98;
 PC20; PC37; PC37; PC58; PC97;
 15 M[20C]-2805: PA11; PA13; PA13; PA14; PA22; PA23; PA28; PA33; PA35; PA69; PB07; PB12; PB38; PB88; PB88;
 PC20; PC24; PC55; PC55; PC60;
 M[20C]-2812: PA11; PA11; PA13; PA20; PA23; PA29; PA30; PA83; PA98; PB02; PB12; PB27; PB38; PC11; PC11;
 PC20; PC23; PC37; PC51; PC60;
 M[20C]-2815: PA11; PA13; PA14; PA22; PA23; PA29; PA33; PA35; PA98; PB02; PB12; PB27; PB38; PB38; PB88;
 PC11; PC20; PC23; PC37; PC55;
 20 M[20C]-2840: PA10; PA11; PA12 (2 cucharas); PA13; PA14; PA18; PA28; PA33; PA67; PA67; PB07 (2 cucharas);
 PB12; PB60; PC23; PC35; PC37; PC55; PC67;
 M[20C]-2841: PA12; PA13 (2 cucharas); PA19; PA22; PA28; PA33; PA67; PB07 (2 cucharas); PB12; PB36; PC20;
 PC23; PC33; PC37; PC49; PC55; PC67; PC97;
 25 M[20C]-2842: PA11; PA12; PA13 (2 cucharas); PA20; PA28; PA30; PA33; PA67; PA83; PB07; PB12 (2 cucharas);
 PC11; PC20; PC23; PC37; PC51; PC60; PC67;
 M[20C]-2843: PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA24; PA26; PA28; PA33; PA67; PB07; PB12; PB33; PB88; PC12;
 PC23; PC23; PC27; PC37; PC67;
 M[20C]-2844: PA12; PA13; PA13; PA15; PA18; PA20; PA28; PA32; PA33; PA67 (2 cucharas); PB07; PB12; PB12;
 PC20; PC23; PC37; PC49; PC55; PC67;
 30 M[20C]-2845: PA12; PA13 (2 cucharas); PA14; PA22; PA28; PA33; PA33; PA35; PA67; PB07; PB12 (2 cucharas);
 PB38; PB88; PC20; PC23; PC37; PC55; PC67;
 M[20C]-2847: PA10; PA12; PA13 (2 cucharas); PA26; PA28; PA33; PA57; PA67; PB02; PB07; PB07; PB12; PB28;
 PC11; PC23; PC23; PC37; PC49; PC67;
 35 M[20C]-2849: PA12; PA13 (2 cucharas); PA14; PA25; PA26; PA28; PA33; PA39; PA52; PA57; PA67; PB07; PB12;
 PB33; PC23; PC37; PC67; PC71; PC97;
 M[20C]-2852: PA11; PA13; PA20 (2 cucharas); PA23; PA24; PA30; PA67; PA83; PB07; PB12; PB28; PB33; PC11;
 PC12; PC20; PC20; PC21; PC51; PC60;
 M[20C]-2854: PA13; PA15; PA18; PA20 (2 cucharas); PA23; PA24; PA32; PA67 (2 cucharas); PB07; PB12; PB28;
 PB33; PC12; PC20 (2 cucharas); PC21; PC49; PC55;
 40 M[20C]-2855: PA13; PA14; PA20; PA22; PA23; PA24; PA33; PA35; PA67; PB07; PB12; PB28; PB33; PB38; PB88;
 PC12; PC20; PC21; PC55;
 M[20C]-2893: PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA23; PA26; PA28; PA33; PA39; PB02; PB07 (2 cucharas); PB12;
 PB99; PC14; PC20; PC49; PC98; PD02;
 45 M[20C]-2897: PA11 (2 cucharas); PA13; PA14; PA24; PA29; PA39; PA83; PB02; PB07; PB12; PB60; PB99; PC11;
 PC14; PC20; PC20; PC49; PC51; PC98;
 M[20C]-2930: PA11; PA13; PA14; PA23; PA26; PA28; PA33; PA35; PA83; PB12; PB28; PB33; PB38; PB77; PB88;
 PC20; PC23; PC37; PC60; PC60;
 M[20C]-2933: PA00; PA06; PA11; PA12; PA13; PA14; PA23; PA26; PA28 (2 cucharas); PA33; PA33; PB07; PB12;
 PB12; PB28; PB38; PB77; PC60; PD02;
 50 M[20C]-2935: PA10; PA11; PA13; PA14; PA28; PA29; PA33; PA57; PA67; PB07; PB12; PB28 (2 cucharas); PB38;
 PB77; PB77; PC11; PC20; PC52; PC60;
 M[20C]-2936: PA11 (2 cucharas); PA13; PA14; PA18; PA28; PA33; PA57; PA67; PB02; PB12; PB28; PB38 (2
 cucharas); PC11; PC20; PC27; PC52; PC60;
 55 M[20C]-2937: PA11; PA11; PA13; PA14 (3 cucharas); PA28; PA29; PA33; PA83; PB12 (2 cucharas); PB28; PB38;
 PB60; PB77; PC11; PC20; PC51; PC60;
 M[20C]-2939: PA10; PA11; PA12; PA13 (2 cucharas); PA14; PA18; PA26; PA28; PA33 (2 cucharas); PA39; PB12;
 PB28; PB38; PB77; PC20; PC52; PC55; PC60;
 M[20C]-2943: PA00; PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA14; PA23; PA26; PA28; PA33; PB07 (2 cucharas); PB12;
 PB27; PC11; PC20; PC23; PC67; PD02;
 60 M[20C]-2947: PA10; PA11 (2 cucharas); PA13; PA14 (2 cucharas); PA24; PA29; PA83; PB07; PB12; PB27; PB60;
 PC11 (2 cucharas); PC20 (2 cucharas); PC23; PC51; PC67;
 M[20C]-2953: PA00; PA06; PA12 (2 cucharas); PA13; PA14; PA23 (2 cucharas); PA26; PA28; PA33 (2 cucharas);
 PB01; PB07 (2 cucharas); PB12; PC20; PC27; PC52; PD02;
 65 M[20C]-2957: PA11; PA12; PA13; PA14 (2 cucharas); PA23; PA24; PA29; PA33; PA83; PB01; PB07; PB12; PB60;

PC11; PC20 (2 cucharas); PC27; PC51; PC52.

Tabla 10-2: promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas en la muestra procesada según las mezclas de la Lista 10-2 a una dilución de 1:20.

		Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
	M[03C]-051	37%	24%
	M[03C]-054	30%	13%
	M[03C]-057	27%	22%
	M[20C]-2083	84%	55%
	M[20C]-2084	72%	40%
	M[20C]-2085	70%	45%
	M[20C]-2090	57%	46%
	M[20C]-2091	66%	35%
	M[20C]-2092	71%	43%
	M[20C]-2100	56%	40%
	M[20C]-2102	53%	41%
	M[20C]-2104	60%	43%
	M[20C]-2105	81%	55%
	M[20C]-2110	59%	43%
	M[20C]-2111	63%	46%
	M[20C]-2120	66%	28%
	M[20C]-2122	72%	37%
	M[20C]-2131	54%	37%
	M[20C]-2135	59%	40%
	M[20C]-2137	78%	50%
	M[20C]-2140	60%	35%
	M[20C]-2141	56%	40%
	M[20C]-2142	61%	34%
	M[20C]-2143	77%	37%
	M[20C]-2144	74%	39%
	M[20C]-2150	65%	27%
	M[20C]-2151	61%	34%
	M[20C]-2152	66%	32%
	M[20C]-2153	82%	50%
	M[20C]-2154	67%	26%
	M[20C]-2155	63%	32%
	M[20C]-2163	61%	40%
	M[20C]-2164	70%	35%
	M[20C]-2214	76%	37%
	M[20C]-2234	56%	31%
	M[20C]-2241	60%	40%

		Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
	M[20C]-2321	55%	30%
	M[20C]-2406	58%	31%
	M[20C]-2420	55%	34%
	M[20C]-2441	52%	36%
	M[20C]-2443	58%	33%
	M[20C]-2449	55%	32%
	M[20C]-2451	53%	28%
	M[20C]-2460	54%	37%
	M[20C]-2488	54%	27%
	M[20C]-2545	52%	29%
	M[20C]-2551	52%	29%
	M[20C]-2553	52%	27%
	M[20C]-2555	58%	39%
	M[20C]-2580	58%	44%
	M[20C]-2589	56%	35%
	M[20C]-2622	57%	40%
	M[20C]-2627	58%	39%
	M[20C]-2641	53%	36%
	M[20C]-2651	53%	33%
	M[20C]-2654	53%	35%
	M[20C]-2717	55%	30%
	M[20C]-2728	56%	24%
	M[20C]-2730	55%	27%
	M[20C]-2738	52%	26%
	M[20C]-2788	56%	25%
	M[20C]-2805	71%	25%
	M[20C]-2812	54%	31%
	M[20C]-2815	52%	29%
	M[20C]-2840	55%	31%
	M[20C]-2841	51%	31%
	M[20C]-2842	53%	35%
	M[20C]-2843	58%	34%
	M[20C]-2844	76%	42%
	M[20C]-2845	46%	33%
	M[20C]-2847	61%	41%
	M[20C]-2849	76%	32%

(continuación)

5	M[20C]-2242	59%	33%	M[20C]-2852	77%	32%
	M[20C]-2243	63%	38%	M[20C]-2854	57%	27%
	M[20C]-2248	84%	49%	M[20C]-2855	66%	35%
10	M[20C]-2249	63%	36%	M[20C]-2893	61%	37%
	M[20C]-2250	58%	36%	M[20C]-2897	66%	36%
	M[20C]-2253	76%	37%	M[20C]-2930	81%	52%
15	M[20C]-2254	55%	25%	M[20C]-2933	60%	32%
	M[20C]-2255	60%	29%	M[20C]-2935	65%	34%
	M[20C]-2256	58%	30%	M[20C]-2936	68%	41%
	M[20C]-2257	59%	25%	M[20C]-2937	78%	41%
20	M[20C]-2258	81%	39%	M[20C]-2939	77%	44%
	M[20C]-2259	60%	29%	M[20C]-2943	67%	29%
	M[20C]-2261	52%	25%	M[20C]-2947	71%	40%
25	M[20C]-2278	53%	25%	M[20C]-2953	66%	38%
	M[20C]-2281	56%	26%	M[20C]-2957	71%	45%

30 **Lista 10-3: composiciones herbarias de muestras procesadas que contienen: *Camellia sinensis* (PA21), *Arcostaphylos uva-ursi* (PB12) y al menos una entre 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):**

- M[03C]-052: PA21; PB12; PC20;
- 35 M[03C]-055: PA21; PB12; PB07;
- M[03C]-058: PA21; PB12; PA22;
- 40 M[20C]-2888: PA14; PA15; PA18; PA21; PA21; PA23; PA26; PA28; PA28; PA29; PA39; PA57; PA75; PB07; PB12; PB36; PC11; PC55; PC55; PC60;
- M[20C]-2913: PA00; PA06; PA12; PA21; PA23; PA26; PA26; PA27; PA28; PA33; PB07; PB07; PB12 (2 cucharas); PB33; PC20; PC24; PC41; PC71; PD02;
- 45 M[20C]-2918: PA15; PA18; PA21 (2 cucharas); PA23; PA26; PA27; PA28; PA57; PB07 (2 cucharas); PB12 (2 cucharas); PB33; PC11; PC20; PC24; PC41; PC55; PC71;
- M[20C]-2920: PA20; PA21; PA23; PA26; PA28; PA35; PA35; PA67; PA83; PB12; PB33; PB88; PC12; PC20; PC23; PC37; PC37; PC60 (2 cucharas); PC74;
- 50 M[20C]-2923: PA00; PA06; PA12; PA20; PA21; PA23; PA26; PA28 (2 cucharas); PA33; PA35; PA67; PB07; PB12 (2 cucharas); PC12; PC37; PC60; PC74; PD02;
- M[20C]-2928: PA15; PA18; PA20; PA21 (2 cucharas); PA23; PA28 (2 cucharas); PA35; PA57; PA67; PB07; PB12 (2 cucharas); PC11; PC12; PC37; PC55; PC60; PC74;
- 55 M[20C]-2887: PA11; PA14; PA14; PA21; PA24; PA26; PA28; PA29 (2 cucharas); PA39; PA75; PA83; PB12; PB36; PB60; PC11; PC20; PC51; PC55; PC60;
- 60 M[20C]-2914: PA11; PA21 (2 cucharas); PA26; PA27; PA28; PA39; PA70; PB02; PB07; PB12; PB33; PB99; PC20; PC24; PC41; PC71 (2 cucharas); PC97; PC98;
- M[20C]-2915: PA10; PA21; PA26; PA27; PA29; PA57; PA67; PB07 (2 cucharas); PB12; PB28; PB33; PB77; PC11; PC20 (2 cucharas); PC24; PC41; PC52; PC71;
- 65

M[20C]-2916: PA11; PA18; PA21; PA26; PA27; PA57; PA67; PB02; PB07; PB12; PB33; PB38; PC11; PC20; PC20; PC24; PC27; PC41; PC52; PC71;

M[20C]-2917: PA11; PA14; PA21; PA24; PA26; PA27; PA29; PA83; PB07; PB12 (2 cucharas); PB33; PB60; PC11; PC20 (2 cucharas); PC24; PC41; PC51; PC71;

M[20C]-2925: PA10; PA20; PA21; PA28; PA29; PA35; PA57; PA67 (2 cucharas); PB07; PB12; PB28; PB77; PC11; PC12; PC20; PC37; PC52; PC60; PC74;

M[20C]-2926: PA11; PA18; PA20; PA21; PA28; PA35; PA57; PA67 (2 cucharas); PB02; PB12; PB38; PC11; PC12; PC20; PC27; PC37; PC52; PC60; PC74;

M[20C]-2927: PA11; PA14; PA20; PA21; PA24; PA28; PA29; PA35; PA67; PA83; PB12; PB12; PB60; PC11; PC12; PC20; PC37; PC51; PC60; PC74;

M[20C]-2910: PA21; PA23; PA26 (2 cucharas); PA27; PA35; PA83; PB07; PB12; PB33 (2 cucharas); PB88; PC20 (2 cucharas); PC23; PC24; PC37; PC41; PC60; PC71.

Tabla 10-3: promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas en la muestra procesada según las mezclas de la Lista 10-2 a una dilución de 1:20.

	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula		Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
M[03C]-052	31%	13%	M[20C]-2887	46%	8%
M[D3C]-D55	29%	10%	M[20C]-2914	29%	38%
M[03C]-058	31%	18%	M[20C]-2915	30%	35%
M[20C]-2888	48%	27%	M[20C]-2916	39%	40%
M[20C]-2913	46%	37%	M[20C]-2917	40%	41%
M[20C]-2918	46%	32%	M[20C]-2925	41%	36%
M[20C]-2920	54%	30%	M[20C]-2926	47%	36%
M[20C]-2923	51%	28%	M[20C]-2927	41%	41%
M[20C]-2928	46%	32%	M[20C]-2910	46%	39%

Lista 10-4: extractos de composiciones herbarias que contienen: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arcostaphylos uva-ursi* (PB12) y al menos una entre 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctorial* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07):

M[04C]-025: PA13; PA21; PB12; PC20;
M[04C]-026: PA13; PA21; PB12; PB07;
M[04C]-027: PA13; PA21; PB12; PA22;
M[20C]-2898: PA11; PA13; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28; PA39; PA57; PB02; PB07 (2 cucharas); PB07; PB12; PB99; PC11; PC14; PC20; PC49; PC55; PC98;
M[20C]-2900: PA10; PA11; PA13; PA21; PA23; PA25; PA26; PA35; PA69; PA83; PB12; PB32; PB33; PB88; PC20 (2 cucharas); PC23; PC37; PC55; PC60;
M[20C]-2903: PA00; PA06; PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA23; PA25; PA26; PA28; PA33; PA69; PB07; PB12 (2 cucharas); PB32; PC20; PC55; PD02;
M[20C]-2908: PA10; PA11; PA13; PA15; PA18; PA21 (2 cucharas); PA23; PA25; PA28; PA57; PA69; PB07; PB12 (2 cucharas); PB32; PC11; PC20; PC55 (2 cucharas);
M[20C]-2938: PA11; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28 (2 cucharas); PA33; PA57; PB07; PB12 (2 cucharas); PB28; PB38; PB77; PC11; PC55; PC60;
M[20C]-2948: PA10; PA11; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23; PA28; PA57; PB07 (2 cucharas); PB12; PB27; PC11 (2 cucharas); PC20; PC23; PC55; PC67;
M[20C]-2951: PA12; PA13 (2 cucharas); PA14; PA21; PA23; PA24; PA33; PA39; PA67; PB01; PB07; PB12; PB77; PC20; PC27; PC33; PC49; PC52; PC60;
M[20C]-2952: PA12; PA13 (2 cucharas); PA14; PA21; PA23; PA25; PA26; PA33; PA37; PA67; PB01; PB07 (2 cucharas); PB12; PC20; PC27; PC49; PC52; PC71;
M[20C]-2958: PA12; PA13; PA14; PA15; PA18; PA21; PA23 (2 cucharas); PA28; PA33; PA57; PB01; PB07 (2

cucharas); PB12; PC11; PC20; PC27; PC52; PC55;
M[20C]-2822: PA11 (2 cucharas); PA13 (2 cucharas); PA20 (2 cucharas); PA21; PA25; PA29; PA30; PA33; PA35;
PA75; PA83; PB12; PC11; PC20; PC33; PC51; PC60;
5 M[20C]-2824: PA11; PA13 (2 cucharas); PA15; PA18; PA20 (2 cucharas); PA21; PA25; PA29; PA32; PA33; PA35;
PA67; PA75; PB12; PC20; PC33; PC49; PC55;
M[20C]-2825: PA11; PA13 (2 cucharas); PA14; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA33 (2 cucharas); PA35 (2
cucharas); PA75; PB12; PB38; PB88; PC20; PC33; PC55;
M[20C]-2834: PA13 (2 cucharas); PA15; PA18; PA20; PA21; PA22; PA25; PA29; PA32 (2 cucharas); PA34; PA67;
PB12; PB88; PC20; PC33; PC49; PC55; PC98;
10 M[20C]-2835: PA13 (2 cucharas); PA14; PA21; PA22 (2 cucharas); PA25; PA29; PA32; PA33; PA34; PA35; PB12;
PB38; PB88 (2 cucharas); PC20; PC33; PC55; PC98;
M[20C]-2848: PA12 (2 cucharas); PA13 (2 cucharas); PA18; PA21; PA24; PA28; PA33; PA67; PB07; PB12; PC23
(2 cucharas); PC37; PC49; PC52; PC55; PC67; PC97;
M[20C]-2862: PA11; PA13; PA20; PA21; PA22; PA30; PA83; PB12; PB28; PB60; PC11 (2 cucharas); PC20 (2
15 cucharas); PC23; PC51; PC55; PC60 (2 cucharas); PC74;
M[20C]-2864: PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA22; PA32; PA67; PB12; PB28; PB60; PC11; PC20 (2 cucharas);
PC23; PC49; PC55 (2 cucharas); PC60; PC74;
M[20C]-2865: PA13; PA14; PA21; PA22 (2 cucharas); PA33; PA35; PB12; PB28; PB38; PB60; PB88; PC11; PC20
(2 cucharas); PC23; PC55 (2 cucharas); PC60; PC74;
20 M[20C]-2872: PA10; PA11 (2 cucharas); PA13; PA20; PA21; PA30; PA35; PA57; PA83; PB07; PB12; PB77; PC11;
PC20 (2 cucharas); PC23; PC51; PC60; PC71;
M[20C]-2874: PA10; PA11; PA13; PA15; PA18; PA20; PA21; PA32; PA35; PA57; PA67; PB07; PB12; PB77; PC20
(2 cucharas); PC23; PC49; PC55; PC71;
M[20C]-2875: A10; A11; A13; A14; A21; A22; A33; A35; A35; A57; B07; B12; B38; B77; B88; C20 (2 cucharas);
25 C23; C55; C71;
M[20C]-2882: PA13; PA14; PA21 (2 cucharas); PA25; PA26 (2 cucharas); PA28; PA29; PA37; PA39; PA67; PA75;
PB07; PB12; PB36; PC49; PC55; PC60; PC71;
M[20C]-2891: PA11; PA13 (2 cucharas); PA21; PA24; PA39; PA39; PA67; PB02; PB07; PB12; PB77; PB99; PC14;
PC20; PC33; PC49 (2 cucharas); PC60; PC98;
30 M[20C]-2892: PA11; PA13 (2 cucharas); PA21; PA25; PA26; PA37; PA39; PA67; PB02; PB07 (2 cucharas); PB12;
PB99; PC14; PC20; PC49 (2 cucharas); PC71; PC98;
M[20C]-2901: PA10; PA11; PA13 (2 cucharas); PA21 (2 cucharas); PA24; PA25; PA39; PA67; PA69; PB12 (2
cucharas); PB32; PB77; PC20; PC33; PC49; PC55; PC60;
M[20C]-2902: PA10; PA11; PA13 (2 cucharas); PA21 (2 cucharas); PA25 (2 cucharas); PA26; PA37; PA67; PA69;
PB07; PB12 (2 cucharas); PB32; PC20; PC49; PC55; PC71;
35 M[20C]-2904: PA10; PA11 (2 cucharas); PA13; PA21 (2 cucharas); PA25; PA28; PA39; PA69; PA70; PB02; PB12;
PB32; PB99; PC20; PC55; PC71; PC97; PC98;
M[20C]-2905: PA10 (2 cucharas); PA11; PA13; PA21; PA25; PA29; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12; PB28; PB32;
PB77; PC11; PC20 (2 cucharas); PC52; PC55;
40 M[20C]-2906: PA10; PA11 (2 cucharas); PA13; PA18; PA21; PA25; PA57; PA67; PA69; PB02; PB12; PB32; PB38;
PC11; PC20 (2 cucharas); PC27; PC52; PC55;
M[20C]-2907: PA10; PA11 (2 cucharas); PA13; PA14; PA21; PA24; PA25; PA29; PA69; PA83; PB12 (2 cucharas);
PB32; PB60; PC11; PC20 (2 cucharas); PC51; PC55;
M[20C]-2909: A10 (2 cucharas); A11; A12; A13 (2 cucharas); A18; A21; A25; A26; A33; A39; A69; B12; B32; C20
45 (2 cucharas); C52; C55 (2 cucharas);
M[20C]-2911: PA13; PA21 (2 cucharas); PA24; PA26; PA27; PA39; PA67; PB07; PB12 (2 cucharas); PB33; PB77;
PC20; PC24; PC33; PC41; PC49; PC60; PC71;
M[20C]-2912: PA13; A21 (2 cucharas); PA25; PA26 (2 cucharas); PA27; PA37; PA67; PB07 (2cucharas); PB12 (2
cucharas); PB33; PC20; PC24; PC41; PC49; PC71 (2 cucharas);
50 M[20C]-2919: PA10; PA12; PA13; PA18; PA21; PA26 (2 cucharas); PA27; PA33; PA39; PB07; PB12; PB33; PC20
(2 cucharas); PC24; PC41; PC52; PC55; PC71;
M[20C]-2922: PA13; PA20; PA21 (2 cucharas); PA25; PA26; PA28; PA35; PA37; PA67 (2 cucharas); PB07; PB12
(2 cucharas); PC12; PC37; PC49; PC60; PC71; PC74;
M[20C]-2929: PA10; PA12; PA13; PA18; PA20; PA21; PA26; PA28; PA33; PA35; PA39; PA67; PB12; PC12; PC20;
55 PC37; PC52; PC55; PC60; PC74;
M[20C]-2932: PA11; PA13 (2 cucharas); PA14; PA21; PA25; PA26; PA28; PA33; PA37; PA67; PB07; PB12 (2
cucharas); PB28; PB38; PB77; PC49; PC60; PC71;
M[20C]-2941: PA10; PA11; PA13 (2 cucharas); PA14; PA21; PA24; PA39; PA67; PB07; PB12; PB27; PB77; PC11;
PC20; PC23; PC33; PC49; PC60; PC67;
60 M[20C]-2942: PA10; PA11; PA13 (2 cucharas); PA14; PA21; PA25; PA26; PA37; PA67; PB07 (2 cucharas); PB12;
PB27; PC11; PC20; PC23; PC49; PC67; PC71;

Tabla 10-4: promedio de la eficacia del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico y del porcentaje de inhibición de la formación de biopelícula en las 6 cepas de *Staphylococcus aureus* probadas en la muestra tratada según las mezclas de la Lista 10-4 a una dilución de 1:20.

		Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula		Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelícula
5						
10	M[04C]-025	57%	18%	M[20C]-2872	59%	36%
	M[04C]-026	48%	16%	M[20C]-2874	78%	39%
	M[04C]-027	49%	18%	M[20C]-2875	83%	47%
15	M[20C]-2898	60%	21%	M[20C]-2882	61%	28%
	M[20C]-2900	78%	32%	M[20C]-2891	70%	27%
	M[20C]-2903	48%	28%	M[20C]-2892	76%	39%
	M[20C]-2908	54%	15%	M[20C]-2901	59%	29%
20	M[20C]-2938	70%	26%	M[20C]-2902	51%	30%
	M[20C]-2948	56%	22%	M[20C]-2904	62%	24%
	M[20C]-2951	47%	17%	M[20C]-2905	55%	37%
25	M[20C]-2952	60%	19%	M[20C]-2906	59%	37%
	M[20C]-2958	53%	31%	M[20C]-2907	75%	41%
	M[20C]-2822	46%	38%	M[20C]-2909	82%	49%
30	M[20C]-2824	60%	32%	M[20C]-2911	55%	30%
	M[20C]-2825	76%	38%	M[20C]-2912	59%	29%
	M[20C]-2834	55%	27%	M[20C]-2919	75%	48%
	M[20C]-2835	64%	29%	M[20C]-2922	63%	32%
35	M[20C]-2848	52%	29%	M[20C]-2929	54%	30%
	M[20C]-2862	46%	31%	M[20C]-2932	73%	39%
	M[20C]-2864	51%	29%	M[20C]-2941	63%	48%
40	M[20C]-2865	56%	43%	M[20C]-2942	56%	34%

Ejemplo comparativo 4

Como ejemplo comparativo, se informan varios extractos de composiciones herbarias que contienen solo 1 planta entre 3: *Filipendula ulmaric* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arcostaphylos uva-ursi* (PB12) y sólo 1 entre 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07).

Se prepararon 5 composiciones herbarias que tenían el contenido indicado en la Lista 10-5 de acuerdo con el Método 1 descrito anteriormente.

Lista 10-5 extractos de composiciones herbarias que contienen las siguientes plantas

- M[20P]-318: PA15; PA21; PA34; PA35; PA82; PA83; PA85; PA92; PA96; PB03; PB07; PB26; PB30; PB36; PB79; PC11; PC49; PC91; PC92; PD10;
- M[20P]-329: PA10; PA28; PA34; PA36; PA55; PA72; PA83; PA85; PA91; PB03; PB12; PB16; PB28; PB35; PB49; PB92; PC20; PC23; PC64; PC85;
- M[20P]-333: PA04; PA05; PA13; PA16; PA22; PA39; PA51; PA55; PA57; PA72; PA82; PA92; PA98; PB05; PB20; PB36; PB43; PB74; PB77; PC37;
- M[20P]-362: PA21; PA23; PA25; PA33; PA37; PA57; PA69; PA81; PA92; PB16; PB25; PB26; PB28; PB29; PB78; PC20; PC21; PC71; PC83; PD02;
- M[20P]-513: PA12; PA14; PA14; PA20; PA20; PA21; PA22; PA33; PA35; PA52; PA57; PA69; PB00; PB32; PB38;

PC24; PC37; PC52; PC55; PC67;

Se prepararon composiciones herbarias que contenían 20 polvos vegetales según el método A descrito anteriormente.

Partiendo de las composiciones herbarias, se prepararon los extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 40 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración.

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, ATCC 49476, ATCC 6538, ATCC 51740, ATCC 29213 y ATCC 14775, con las diluciones finales 1:20 de muestras procesadas.

En la Tabla 10-5 se proporcionan el promedio del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y del promedio del porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas probadas de las muestras procesadas obtenidas de las composiciones herbarias de la Lista 10-4. Cada porcentaje es el promedio de 2 mediciones de la misma condición en dos pocillos diferentes. Los porcentajes negativos reflejan la promoción del crecimiento y la promoción de biopelículas, en lugar de la inhibición deseada. Se aprecia que tales extractos dan una inhibición muy pobre, si la hay, en comparación con los extractos del Ejemplo 10.

Tabla 10-5: promedio del porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico bacteriano y promedio del porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas sobre todas las cepas probadas de las muestras procesadas obtenidas de las composiciones herbarias de la Lista 10-4

	Inhibición del crecimiento planctónico	Inhibición de la formación de biopelículas
M[20C]-318	-10%	0%
M[20C]-329	12%	9%
M[20C]-333	3%	18%
M[20C]-362	22%	3%
M[20C]-513	-21%	21%

Ejemplo 11

En este Ejemplo, ilustramos actividades antimicrobianas contra 14 especies microbianas diferentes descritas en la Tabla 11-1 de 10 extractos de mezclas obtenidas de las composiciones herbarias divulgadas en la Lista 11-1 que comprenden al menos 2 plantas entre 3: *Filipendula ulmarica* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21), *Arcostaphylos uva-ursi* (PB12) y al menos 1 planta entre 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctoria* (PA22), y *Desmodium adscendens* (PB07).

Tabla 11-1: especies microbianas y cepas usadas en el Ejemplo 11

Nombre completo de la cepa	Código de cepa	Concentración de inóculo (bacterias/ml)
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> (MRSA) ATCC® 33592™	B-A49	2.10. ⁵
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 14990™	B-A08	2.10 ⁵
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ATCC® 49444™	B-A09	2.10 ⁵
<i>Candida albicans</i> ATCC® 60193™	B-A61	2.10 ^{6,5}
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 11775™	B-A67	2.10 ^{5,5}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 13883™	B-A68	2.10 ^{5,5}
<i>Listeria innocua</i> ATCC® 33090™	B-A69	2.10 ^{5,5}
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19115™	B-A70	2.10 ^{5,5}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™	B-A71	2.10 ^{5,5}
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> ATCC® 13076™	B-A72	2.10 ^{5,5}
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC® 13311™	B-A73	2.10 ^{5,5}

(continuación)

	Nombre completo de la cepa	Código de cepa	Concentración de inóculo (bacterias/ml)
5	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 27336™	B-A75	2.10 ^{5,5}
	<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i> ATCC® 43079™	B-A77	2.10 ^{5,5}
10	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® BAA-1323™	B-B26	2.10 ^{6,5}

Lista 11-1: extractos de composiciones herbarias que contienen: *Filipendula ulmaria* (PA13), *Camellia sinensis* (PA21) y al menos una de 3: *Eugenia caryophyllus* (PC20), *Vitis vinifera var. tinctoria* (PA22), *Desmodium adscendens* (PB07) usadas en el Ejemplo-11:

15 M[20P]-297: PA10; PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA29; PA33; PA57; PA67; PA69; PB07; PB12; PB60; PC20; PC37; PC49; PC98;
 M[20P]-416: PA11; PA13; PA14; PA20; PA21; PA25; PA26; PA28; PA29; PA67; PA75; PB02; PB12; PB27; PB33; PB60; PB88; PC20; PC49; PC60;
 20 M[20P]-418: PA10; PA11; PA12; PA13; PA21; PA22; PA23; PA24; PA26; PA39; PB07; PB12; PB38; PC11; PC12; PC20; PC23; PC24; PC49; PC55;
 M[20P]-527: PA10; PA10; PA11; PA13; PA15; PA20; PA20; PA21; PA23; PA26 (3 cucharas); PA33; PB08; PB12 (2 cucharas); PB60; PB88; PC12; PC20;
 M[20P]-557: PA00; PA10; PA20; PA21; PA23; PA24; PA29; PA57; PB07; PB12 (4 cucharas); PC11 (2 cucharas); PC12; PC20; PC51; PC55; PC67;
 25 M[20P]-573: PA10; PA11; PA13 (3 cucharas); PA14; PA18; PA21; PA23; PA29; PA67; PB00; PB07; PB12; PB33; PB77; PC11; PC52; PC60; PC71;
 M[20P]-576: PA11 (2 cucharas); PA12; PA13 (3 cucharas); PA14 (2 cucharas); PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37; PC49;
 30 M[19P]-576: PA11 (2 cucharas); PA12; PA13 (3 cucharas); PA14 (2 cucharas); PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37;
 M[5P]-1: PA12; PA13; PA21; PA22; PB12;
 M[5P]-2: PA11; PA13; PA21; PA22; PB12;

35 Para las mezclas M[5P]-1, M[5P]-2 y M[19P]-576, las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia). Para las otras mezclas, las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Pharmacie Fontgieve" (Clermont-Ferrand, Francia, plantas PA00 a PB12) y "Pharmacie St Herem" (Clermont-Ferrand, Francia, plantas PB13 a PD02).

40 Todas las composiciones herbarias de 20 plantas se prepararon de acuerdo con el Método A descrito previamente.

45 Partiendo de las composiciones herbarias, se prepararon los extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 40 ml de agua que contenía 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración.

Las composiciones herbarias M[19P]-576, M[5P]-1 y M[5P]-2 se prepararon ponderando cada hierba seca como se indica en la Tabla 11-2

50 **Tabla 11-2: peso de planta seca (mg) usada en las composiciones herbarias de M[19P]-576, M[5P]-1 y M[5P]-2 usadas en el Ejemplo-11**

	PA11	PA12	PA13	PA14	PA20	PA21	PA22	PA29	PA39	PB12	PB60	PC20	PC26	PC33	PC37
55 M[19P]-576	409	145	573	316	277	271	207	380	207	247	206	236	198	187	154
M[5P]-1		903	1574			2237	1263			2022					
M[5P]-2	756		720			1027	577			925					

60 Partiendo de las composiciones herbarias, se prepararon los extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando, respectivamente, 30 ml, 40 ml y 40 ml, de agua sin sacarosa con, respectivamente, M[19P]-576, M[5P]-1 y M[5P]-2, para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración.

65

En la Tabla 11-3 se proporciona la actividad biológica de cada muestra procesada se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las siguientes cepas a las diluciones finales indicadas de muestras procesadas.

En la Tabla 11-3 se proporciona el promedio en porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico microbiano.

Tabla 11-3: porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico en las 14 cepas microbianas analizadas de la muestra procesada de la composición divulgada en la Lista 11-1

	M[20C]-297	M[20C]-416	M[20C]-418	M[20C]-527	M[20C]-557	M[20C]-573	M[20C]-576	M[19C]-576	M[5P]-1	M[5P]-2
Dilución	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:20	1:20	1:20
B-A49	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B-A08	100%	99%	100%	100%	100%	98%	98%	100%	100%	100%
B-A09	89%	97%	98%	99%	99%	100%	100%	100%	100%	100%
B-A61	25%	69%	36%	45%	51%	55%	90%	ND	ND	ND
B-A67	45%	52%	59%	66%	62%	52%	39%	34%	55%	38%
B-A68	100%	97%	100%	100%	100%	94%	92%	100%	100%	100%
B-A69	-1%	21%	21%	38%	30%	30%	-1%	38%	100%	38%
B-A70	39%	52%	53%	74%	54%	57%	32%	34%	100%	40%
B-A71	63%	71%	69%	75%	75%	82%	71%	42%	100%	55%
B-A72	47%	53%	59%	63%	58%	58%	32%	39%	62%	42%
B-A73	59%	59%	59%	71%	72%	58%	32%	42%	100%	45%
B-A75	51%	52%	63%	71%	63%	57%	31%	ND	ND	ND
B-A77	40%	47%	64%	68%	59%	58%	40%	100%	100%	100%
B-B26	58%	64%	72%	70%	74%	42%	93%	ND	ND	ND

Nota: "ND" significa "no determinado"

Ejemplo 12

En este Ejemplo, ilustramos actividades antimicrobianas de una mezcla vegetal donde la etapa de extracción se realizó con los disolventes no acuosos acetona, acetato de etilo, etanol, usados solos o como mezclas binarias como se indica en la Tabla 12-1. Se proporciona una comparación con el agua.

Tabla 12-1: Composición de las mezclas binarias utilizadas en el Ejemplo 12 para la extracción no acuosa.

A)	Nombre del solvente binario	Proporción de acetona a etanol	B)	Nombre del solvente binario	Proporción de acetato de etilo a etanol	C)	Nombre del solvente binario	Proporción de acetato de etilo a acetona
	AC9ET1	90/10		EA9ET1	90/10		EA9AC1	90/10
	AC8ET2	80/20		EA8ET2	80/20		EA8AC2	80/20
	AC7ET3	70/30		EA7ET3	70/30		EA7AC3	70/30
	AC6ET4	60/40		EA6ET4	60/40		EA6AC4	60/40
	AC5ET5	50/50		EA5ET5	50/50		EA5AC5	50/50
	AC4ET6	40/60		EA4ET6	40/60		EA4AC6	40/60
	AC3ET7	30/70		EA3ET7	30/70		EA3AC7	30/70
	AC2ET8	20/80		EA2ET8	20/80		EA2AC8	20/80
	AC1ET9	10/90		EA1ET9	10/90		EA1AC9	10/90

La mezcla de plantas secas M[20P]-576 se componía de la siguiente Tabla 12-2 y se colocó en un vial de 500 ml y se mezcló completamente mediante volteo y laminado manuales. Las hierbas secas se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia), excepto PC49 que se obtuvo de Siccarapam (Aubiat, Francia).

Tabla 12-2: lista de plantas secas que componen el M[20P]-576 usado en el Ejemplo 12

Planta seca	PA 11	PA 12	PA 13	PA 14	PA 20	PA 21	PA 22	PA 29	PA 39	PB 12	PB 60	PC 20	PC 26	PC 33	PC 37	PC 49
Peso (g)	29,7	10,5	41,5	22,9	19,8	19,9	15,0	27,5	15,0	17,8	15,0	17,1	14,4	13,6	11,3	9,3

Para cada disolvente ensayado, se colocaron 5 g de mezcla vegetal seca en un vial coloreado de 100 ml (Schott, Alemania) con una barra magnética y se añadieron 50 ml de disolvente. La suspensión líquida se agitó con un agitador magnético (RO 15P IKA, Alemania) a la velocidad máxima durante 48 horas a temperatura ambiente. Cada suspensión/solución se filtró por gravedad usando un filtro plegado de 250 mm (J025106, Prats Dumas, Francia) colocado en un embudo de vidrio (Schott, Alemania) colocado en un matraz de evaporación. El matraz que contiene el líquido que atraviesa el filtro se coloca en un dispositivo de evaporación rotatoria al vacío (controlador de vacío Rotavapor® R205 + V800, Büchi, Suiza) y la evaporación se realiza a 35° C con vacío ajustado para estar por debajo del punto de ebullición del disolvente, hasta que todo el disolvente se haya evaporado. El material restante se pesa y se disuelve en DMSO (Acros organic, EE.UU.) qsp 10 g/l para formar la mezcla extraída.

Se prepararon dos extractos acuosos de acuerdo con el Método B descrito previamente, en el que las cucharas de plantas secas se reemplazaron por 2 g de la mezcla de plantas secas M[20P]-576 del Ejemplo 12, usando 40 ml de agua para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración. El contenido de residuo seco de uno de los extractos de mezcla de plantas se determinó pesando el residuo de liofilización obtenido con un dispositivo de liofilización (FreeZone™ 2.5, Labconco EE.UU., con RZ6 Vacuubrand, Alemania) del extracto congelado.

Estos contenidos de residuo seco se usaron para deducir las actividades específicas de los diferentes extractos.

La actividad biológica de cada mezcla extraída se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las cepas indicadas en la Tabla 12-3, donde la dilución de la mezcla extraída fue: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. La concentración inhibidora mínima (CIM) se observó mediante observación visual de los pocillos como la concentración más baja en la que no se observa crecimiento.

Tabla 12-3: lista de las cepas bacterianas usadas en el Ejemplo 12

<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
NCTC 12493™	B-A47	ATCC®12228™	B-A22
ATCC®33591™	B-A48	ATCC®700296™	B-A23
ATCC®33592™	B-A49	ATCC®49461™	B-A24
NCTC 43300™	B-A51	ATCC®14990™	B-A08

Los resultados se recopilan en las tablas 12-4 para los diferentes disolventes.

Tabla 12-4: CIM en mg/l de las mezclas extraídas usando, A) acetona, etanol-acetato, etanol y agua como disolvente, B), diferentes proporciones de acetona y etanol como disolvente binario como se indica en la Tabla 12-2-A, C) diferentes proporciones de etanol-acetato y etanol como disolvente binario como se indica en la Tabla 12-2-B, y D) usando diferentes proporciones de etanol-acetato y acetona como disolvente binario como se indica en la Tabla 12-2-C.

A)	Acetona	Etanol- acetato	Etanol	Agua
B-A47	500	500	500	725
B-A48	500	500	500	725
B-A49	500	500	500	725
B-A51	500	500	500	725
B-A22	250	250	250	363
B-A23	250	250	250	363
B-A24	250	250	250	363
B-A08	250	250	250	725

(continuación)

	B)	AC9ET1	AC8ET2	AC7ET3	AC6ET4	ACSETS	AC4ET6	AC3ET7	AC2ET8	AC1ET9
5	B-A47	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	B-A48	250	250	250	250	250	500	500	500	500
	B-A49	250	250	250	250	250	500	500	500	500
	B-A51	500	500	500	500	500	500	500	500	500
10	B-A22	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	B-A23	250	125	125	125	125	250	250	250	250
	B-A24	250	250	250	250	250	250	250	250	250
15	B-A08	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	C)	EA9ET1	EA8ET2	EA7ET3	EA6ET4	EASETS	EA4ET6	EA3ET7	EA2ET8	EA1ET9
	B-A47	500	500	500	500	500	500	500	500	500
20	B-A48	250	250	250	250	250	500	500	500	500
	B-A49	250	250	250	250	250	500	500	500	500
	B-A51	250	500	500	500	500	500	500	500	500
	B-A22	250	250	250	250	250	250	250	250	250
25	B-A23	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	B-A24	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	B-A08	250	250	250	250	250	250	250	250	250
30	D)	EA9AC1	EA8AC2	EA7AC3	EA6AC4	EASACS	EA4AC6	EA3AC7	EA2AC8	EA1AC9
	B-A47	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	B-A48	500	500	500	500	500	500	500	500	500
35	B-A49	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	B-A51	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	B-A22	500	250	250	250	250	250	250	250	250
	B-A23	500	250	250	250	250	250	250	250	250
40	B-A24	500	250	250	250	250	250	250	250	250
	B-A08	500	500	250	250	250	250	250	250	250

Ejemplo 13

45 En este Ejemplo, ilustramos actividades antimicrobianas de una mezcla de plantas preparada de acuerdo con el Método B descrito previamente, donde el carbohidrato añadido se elige entre sacarosa, dextrosa, maltosa y galactosa.

50 La mezcla de plantas secas M[19P]-576, M[5P]-1 y M[5P]-2 se compuso siguiendo la Tabla 13-1 y se colocó en un vial de 500 ml y se mezcló exhaustivamente mediante volteo y laminado manuales. Las hierbas secas se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia), excepto PC49 que se obtuvo de Siccarapam (Aubiat, Francia).

55 **Tabla 13-1: lista de plantas secas que componen: A) la mezcla M[20P]-576, B) la mezcla M[5P]-1 y C) la mezcla M[5P]-2 utilizada en el Ejemplo 13.**

60

A)

Planta seca	PA 11	PA 12	PA 13	PA 14	PA 20	PA 21	PA 22	PA 29	PA 39	PB 12	PB 60	PC 20	PC 26	PC 33	PC 37	PC 49
Peso (g)	29,7	10,5	41,5	22,9	19,8	19,9	15,0	27,5	15,0	17,8	15,0	17,1	14,4	13,6	11,3	9,3

B)

Planta seca	PA12	PA13	PA21	PA22	PB12
Peso (g)	34,1	59,2	84,1	47,5	75,8

65

(continuación)

C)

Planta seca	PA11	PA13	PA21	PA22	PB12
Peso (g)	56,9	54	76,9	43,4	69,4

Para cada mezcla de plantas secas, los extractos se prepararon de acuerdo con el Método B descrito previamente, en el que las cucharas de plantas secas se reemplazaron por 2 g de la mezcla de plantas del Ejemplo 13, usando 40 ml de agua y las cantidades de carbohidrato indicadas en la Tabla 13-3 para la extracción de agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración.

El contenido de residuo seco de las mezclas vegetales sin carbohidrato se determinó por separado, pesando el residuo de liofilización obtenido con un dispositivo de liofilización (FreeZone™ 2.5, Labconco EE.UU, con RZ6 Vacuubrand, Alemania) de un extracto congelado de 40 ml preparado de acuerdo con el Método B descrito previamente, donde las cucharas de plantas secas se reemplazaron por 2 g de la mezcla de plantas del Ejemplo 13, usando 40 ml de agua para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración. Estos contenidos de residuo seco se usaron para deducir las actividades específicas de los diferentes extractos, en los que el carbohidrato se considera como un adyuvante y no se tiene en cuenta como parte del ingrediente activo.

La actividad biológica de cada mezcla extraída se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las cepas indicadas en la Tabla 13-2, donde la dilución de la mezcla extraída fue: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. La concentración inhibidora mínima (CIM) se observó mediante observación visual de los pocillos como la concentración más baja en la que no se observa crecimiento.

Tabla 13-2: lista de las cepas bacterianas usadas en el Ejemplo 13

<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
NCTC 12493™	B-A47	ATCC®12228™	B-A22
ATCC®33591™	B-A48	ATCC®700296™	B-A23
ATCC®33592™	B-A49	ATCC®49461™	B-A24
NCTC 43300™	B-A51	ATCC®14990™	B-A08

Los resultados se recopilan en las tablas 13-4.

Tabla 13-3: CIM en mg/l de las mezclas extraídas usando sacarosa, lactosa, dextrosa, maltosa o galactosa para: A) la mezcla M[20P]-576, B) la mezcla M[5P]-1 y C), la mezcla M[5P]-2

A)	Sacarosa	Lactosa			Dextrosa			Maltosa			Galactosa		
	100g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l
M[20P]-576													
B-A47	725	>725	>725	725	>725	>725	>725	>725	725	725	725	725	725
B-A48	725	>725	>725	725	>725	>725	>725	725	725	725	725	725	725
B-A49	725	>725	>725	725	>725	>725	>725	725	725	725	725	725	725
B-A51	725	>725	>725	725	>725	>725	>725	725	725	725	725	725	725
B-A22	363	725	725	725	725	725	363	363	363	363	363	363	363
B-A23	363	725	725	363	725	725	363	363	363	363	363	363	363
B-A24	363	725	725	725	725	725	363	363	363	363	363	363	363
B-A08	725	725	725	725	725	725	725	363	363	363	363	363	363
B)	Sacarosa	Lactosa			Dextrosa			Maltosa			Galactosa		
M[5P]-1	100g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l
B-A47	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327
B-A48	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327
B-A49	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	653
B-A47	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327	327
B-A22	327	327	327	327	327	327	327	163	163	163	163	327	327

(continuación)

5	B-A23	163	163	327	163	163	163	327	163	163	163	163	327	163
	B-A24	327	327	327	327	327	327	327	163	163	163	163	327	163
10	B-A08	327	327	327	327	327	327	327	163	327	327	163	327	327
	C)	Sacarosa	Lactosa			Dextrosa			Maltosa			Galactosa		
15	M[5P]-2	100g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l	100g/l	50g/l	25g/l
	B-A47	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	688
20	B-A48	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
	B-A49	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	688
25	B-A51	344	344	344	344	344	344	344	688	344	688	344	344	688
	B-A22	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
30	B-A23	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
	B-A24	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
35	B-A08	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344

Ejemplo 14

En este Ejemplo, ilustramos la potenciación de la actividad antimicrobiana del extracto de mezcla herbaria M[20P]-576 hacia antibióticos usados comúnmente.

Tabla 14-1: especies bacterianas y cepas usadas en el ejemplo 14

Nombre completo de la cepa	Código de cepa
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	B-A17
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 29213™	B-A21

Lista 14-1: composiciones herbarias de muestra procesada usadas en el ejemplo 14:

M[19P]-576: PA11; PA12; PA13; PA14; PA20; PA21; PA22; PA29; PA39; PB12; PB60; PC20; PC26; PC33; PC37.

Las plantas secas de calidad farmacéutica se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia).

Las composiciones herbarias M[19P]-576 se prepararon ponderando cada hierba seca como se indica en la Tabla 14-2

Tabla 14-2: peso de planta seca (mg) usada en las composiciones herbarias de M[19P]-576

	PA 11	PA 12	PA 13	PA 14	PA 20	PA 21	PA 22	PA 29	PA 39	PB 12	PB 60	PC 20	PC 26	PC 33	PC 37
M[19P]-576	409	145	573	316	277	271	207	380	207	247	206	236	198	187	154

Partiendo de la composición herbaria, se prepararon los extractos acuosos correspondientes (o muestras procesadas) de acuerdo con el Método B descrito anteriormente usando 2,06 g de la composición herbaria anterior con 40 ml de agua con 100 g/l de sacarosa para la extracción con agua e incluyendo la etapa de decantación antes de la filtración. En una preparación de extracto acuoso independiente sin sacarosa, se ha medido que 2,06 g/40 ml de composición herbaria corresponde a 14,5 g/l como se deduce del peso del extracto herbaria seco liofilizado.

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las siguientes cepas a las diluciones finales indicadas de muestras procesadas que se proporcionan en la Tabla 14-3. En el Ejemplo 14 calculamos el crecimiento de las bacterias en presencia de antibiótico y/o mezcla herbaria con respecto al crecimiento en ausencia de extracto de antibiótico y mezcla herbaria.

En la Tabla 14-3 se proporciona el promedio en porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico de bacterias.

Debe observarse que la presencia del extracto de hierbas M[19P]-576 tiene tres efectos a la concentración usada: 1) reduce el crecimiento de las bacterias a baja concentración y ausencia de antibiótico, 2) reduce el aumento del

crecimiento bacteriano inducido por la baja concentración de antibiótico con respecto al crecimiento en ausencia de antibióticos, y 3) reduce la concentración inhibidora mínima (CIM), de, respectivamente, vancomicina para B-A17 y de ampicilina y penicilina para B-A21, a la concentración de M[19P]-576 comenzando a, respectivamente, 90.6 µg/ml, 181.3 µg/ml y 90.6 µg/ml.

Tabla 14-3: crecimiento planctónico en presencia de diferentes concentraciones de extracto y concentraciones de antibiótico con respecto al crecimiento de las bacterias en ausencia tanto de extracto como de antibiótico, en dos cepas diferentes.

Efecto de antibiótico, en las cepas diferentes:														
	Cepa	M[19P] 576 (µg/ml)	Concentración de antibiótico (µg/ml)											
			0	3.91	7.81	15.63	31.25	62.50	125	250	500	1000	2000	4000
Ampicilina	B- A17	0	100%	176%	176%	148%	131%	112%	2%	0%	0%	0%	0%	-1%
		90.6	57%	64%	76%	75%	58%	18%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
		181.3	54%	52%	53%	52%	31%	7%	-4%	-4%	-4%	-4%	-5%	-1%
	B- A21	0	100%	153%	132%	131%	132%	116%	150%	113%	112%	106%	-1%	0%
		90.6	64%	108%	83%	82%	82%	74%	83%	75%	83%	0%	0%	0%
		181.3	42%	44%	63%	70%	69%	70%	62%	62%	61%	-2%	-3%	-2%
Penicilina	B- A17	0	100%	137%	138%	3%	1%	0%	-1%	0%	0%	0%	0%	0%
		90.6	53%	39%	25%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
		181.3	51%	23%	5%	-3%	-3%	-3%	-3%	-2%	-3%	-4%	-4%	-2%
	B-	0	100%	135%	116%	115%	113%	108%	106%	101%	0%	0%	0%	0%
		90.6	65%	104%	83%	83%	84%	80%	74%	26%	0%	0%	0%	0%
		181.3	44%	62%	43%	70%	61%	60%	45%	-3%	-3%	-3%	-3%	-3%
Vancomicina	B-A17	0	100%	135%	118%	114%	117%	115%	116%	118%	128%	117%	0%	0%
		90.6	62%	65%	66%	65%	74%	70%	67%	66%	63%	0%	0%	0%
		181.3	42%	40%	41%	53%	55%	55%	54%	46%	47%	-3%	-3%	-2%
	B-A21	0	100%	118%	117%	113%	117%	110%	102%	102%	102%	0%	0%	0%
		90.6	45%	102%	82%	88%	77%	76%	77%	74%	67%	0%	0%	0%
		181.3	58%	48%	63%	57%	60%	57%	41%	57%	32%	-2%	-3%	0%

Ejemplo 15

En este ejemplo, se ilustra cómo adaptar la temperatura en el Método B para hacer frente a restricciones industriales.

Las plantas secas de calidad orgánica se obtuvieron de "Herboristerie Cailleau" (Chemillé, Francia).

Las composiciones herbarias M[5P]-1 se prepararon ponderando cada hierba seca como se indica en la Tabla 15-1

Tabla 15-1: peso de planta seca (mg) usada en las composiciones herbarias de M[5P]-1

	PA12	PA13	PA21	PA22	PB12
M[5P]-1	395.2	688.8	978.9	552.5	884.6

Se preparó un primer extracto M[5P]-1-A incorporando 120 g de la composición herbaria en 600 ml de agua contenida en un vaso de precipitados de 2 l (Schott, Alemania). Se preparó un segundo extracto M[5P]-1-B colocando 120 g de la composición herbaria en una bolsa de algodón de calidad orgánica de 25 x 30 cm (Ecobags, EE.UU.), y la bolsa llena se colocó en 600 ml de agua contenida en un vaso de precipitados de 2 l (Schott, Alemania). Se preparó un tercer extracto M[5P]-1-C colocando dos veces 60 g de la composición herbaria en una bolsa de algodón de calidad orgánica de 25 x 30 cm (Ecobags, EE.UU.), y las dos bolsas llenas se colocaron en 600 ml de agua contenida en un único vaso de precipitados de 2 l (Schott, Alemania). Cada preparación, respectivamente, de M[5P]-1-A, M[5P]-1-B y M[5P]-1-C, se dejó para maceración durante 3 horas a temperatura ambiente y luego se colocó en su vaso de precipitados en un autoclave (línea de vapor VWR Eco 25, EE.UU.) durante 30 minutos a 121° C, 121° C y 134° C,

respectivamente. Para cada uno de M[5P]-1-B y M[5P]-1-C, las bolsas de algodón se prensaron usando una prensa de fruta de 5 l manejada manualmente (Brouwland, Bélgica) y el líquido recuperado se colocó de nuevo en el vaso de precipitados de 2 l. Cada vaso de precipitados se dejó decantar y la cantidad necesaria de líquido sobrenadante se usó para medir su actividad biológica.

Tabla 15-2: especies bacterianas y cepas usadas en el Ejemplo 15

Nombre completo de la cepa	Código de cepa
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	B-A17
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 29213™	B-A21
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 33592™	B-A49

La actividad biológica de cada muestra procesada se determinó de acuerdo con el Método C descrito previamente usando las cepas enumeradas en la Tabla 15-2 a diluciones finales de 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320. La dilución correspondiente a la concentración inhibidora mínima (CIM) se observó mediante observación visual de los pocillos como la concentración más baja en la que no se observa crecimiento y se notifica en la tabla 15-3.

Tabla 15-3: dilución correspondiente a la concentración inhibidora mínima (CIM) de los extractos realizados con diferentes detalles industriales y temperatura

	M[5P]-1-A a 121°	M[5P]-1-B a 121°	M[5P]-1-C a 134°
B-A17	1/80	1/40	1/80
B-A21	1/80	1/40	1/80
B-A49	1/80	1/40	1/160

Debe observarse que la introducción de la bolsa de algodón para facilitar el proceso industrial redujo ligeramente la actividad del extracto en comparación con el proceso insatisfactorio sin bolsa. El aumento de la temperatura del autoclave durante la fase de extracción caliente permitió recuperar la actividad completa.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de una composición herbaria, que comprende al menos dos plantas secas seleccionadas entre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* y *Arctostaphylos uva-ursi* y al menos una planta seleccionada entre *Vitis vinifera* var. *tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* y *Desmodium adscendens*.

2. El extracto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición herbaria comprende además una o más plantas secas adicionales seleccionadas entre: *Achillea millefolium*, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alkanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrago officinalis*, *Buxus sempervirens*, *Calamintha officinalis*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Carum carvi*, *Cassia angustifolia*, *Centaurea cyanus*, *Centaureum erythraea*, *Centella asiatica*, *Cetraria islandica*, *Chamaemelum nobile*, *Chamomilla recutita*, *Chrysanthellum americanum*, *Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Combretum micranthum*, *Crataegus oxyacantha*, *Cuminum cyminum*, *Cupressus sempervirens*, *Curcuma zedoaria*, *Cynara scolymus*, *Cytisus scoparius*, *Desmodium adscendens*, *Elettaria cardamomum*, *Eleutherococcus senticosus*, *Epilobium parviflorum*, *Erysimum officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Eupatorium cannabinum*, *Foeniculum vulgare*, *Fraxinus excelsior*, *Fucus vesiculosus*, *Fumaric officinalis*, *Galium odoratum*, *Gentiana lutea*, *Geranium robertianum*, *Ginkgo biloba*, *Glechoma hederacea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Handroanthus impetiginosus*, *Harpagophytum procumbens*, *Hieracium pilosella*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Hyssopus officinalis*, *Illicium verum*, *Inula helenium*, *Juglans regia*, *Juniperus communis*, *Lamium album*, *Lavandula angustifolia*, *Levisticum officinale*, *Lippia citriodora*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Malva sylvestris*, *Marrubium vulgare*, *Medicago sativa*, *Melissa officinalis*, *Mentha × piperita*, *Morus nigra*, *Myrtus communis*, *Olea europaea*, *Origanum majorana*, *Panax ginseng*, *Papaver rhoeas*, *Parietaria officinalis*, *Passiflora incarnata*, *Petroselinum crispum*, *Peumus boldus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pimpinella anisum*, *Plantago lanceolata*, *Plantago ovata*, *Potentilla anserina*, *Quercus robur*, *Rhamnus frangula*, *Rheum palmatum*, *Rosa centifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Rubia tinctorum*, *Rubus idaeus*, *Salix alba*, *Salvia officinalis*, *Sambucus nigra*, *Satureja montana*, *Silybum marianum*, *Solanum dulcamara*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tanacetum vulgare*, *Taraxacum officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, *Tilia tomentosa*, *Tilia cordata*, *Trigonella foenum-graecum*, *Tussilago farfara*, *Vaccinium myrtillus*, *Valeriana officinalis*, *Verbascum thapsus*, *Verbena officinalis*, *Viscum album*, *Zea mays* y *Zingiber officinale*.

3. El extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición herbaria comprende de tres a siete plantas secas seleccionadas entre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Desmodium adscendens*, *Eugenia caryophyllus* y *Eucalyptus globulus*, en la que al menos dos de tales plantas se seleccionan entre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* y *Arctostaphylos uva-ursi* y al menos una de tales plantas se selecciona entre *Vitis vinifera tinctoria*, *Desmodium adscendens* y *Eugenia caryophyllus*.

4. El extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la composición herbaria comprende las siguientes plantas secas: *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria* y *Arctostaphylos uva-ursi*.

5. El extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la composición herbaria comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria* y *Arctostaphylos uva-ursi*.

6. El extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la composición herbaria comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* y *Arctostaphylos uva-ursi*.

7. El extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la composición herbaria comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Eucalyptus globulus*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Mentha spicata* y *Rubia tinctorum*.

8. El extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la composición herbaria comprende al menos catorce o quince plantas secas seleccionadas entre las dieciséis siguientes: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum*, *Lippia citriodora* y *Tanacetum vulgare*.

9. El extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la composición herbaria comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum* y *Lippia citriodora*.

10. El extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la composición herbaria comprende las siguientes plantas secas: *Rheum palmatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Filipendula ulmaria*, *Satureja montana*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera tinctoria*, *Fucus vesiculosus*, *Foeniculum vulgare*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arbutus unedo*, *Eugenia caryophyllus*, *Juniperus communis*, *Combretum micranthum*, *Lippia citrodora* y *Tanacetum vulgare*.
11. Un liofilizado del extracto según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 10.
12. Un suplemento alimenticio, una composición nutracéutica, farmacéutica, veterinaria o cosmética o alimento funcional o aditivo alimenticio que comprende el extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o el liofilizado según la reivindicación 11, como principio activo, junto con al menos un excipiente.
13. El suplemento alimenticio, la composición nutracéutica, farmacéutica, veterinaria o cosmética, el alimento funcional, o el aditivo alimenticio de acuerdo con la reivindicación 12, formulado para administración oral o tópica.
14. El uso del extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o del liofilizado según la reivindicación 11 como agente antimicrobiano y/o antibiopelícula.
15. El extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el liofilizado según la reivindicación 11 o la composición farmacéutica o veterinaria según las reivindicaciones 12 o 13, para su uso como agente antimicrobiano y/o antibiopelícula en el tratamiento o la prevención de infecciones microbianas.
16. El extracto, liofilizado o composición farmacéutica o veterinaria para su uso según la reivindicación 15, en el que las infecciones están provocadas por *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Candida* o *Staphylococcus*.
17. El extracto, el liofilizado o la composición farmacéutica o veterinaria para su uso según la reivindicación 15, en el que las infecciones están provocadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* o *Staphylococcus pseudintermedius*.
18. Un proceso para preparar el extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende a) triturar o moler por separado o en una mezcla al menos dos plantas secas individuales para obtener los polvos vegetales correspondientes; b) mezclar al menos dos polvos vegetales diferentes para obtener una composición herbaria; c) añadir un disolvente de extracción a dicha composición herbaria para obtener una preparación (o extracto) líquida correspondiente; d) incubar dicha preparación líquida a temperatura ambiente durante un tiempo que varía entre 5 y 15 minutos y e) calentar dicha preparación líquida a una temperatura que varía entre 60° C y 134° C durante un tiempo que varía entre 5 y 60 minutos; opcionalmente f) centrifugar, recoger el sobrenadante y filtrar el sobrenadante recogido; y, opcionalmente, g) concentrar y/o secar o liofilizar la preparación líquida obtenida de la etapa e) o f).
19. El procedimiento según la reivindicación 18, en el que el disolvente de extracción es agua.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que el agua añadida en la etapa (c) comprende un azúcar disuelto en ella a una concentración que varía de 1 a 100 g/l, opcionalmente de 50 a 75 g/l.
21. Una composición herbaria que comprende al menos dos plantas secas seleccionadas entre *Filipendula ulmaria*, *Camellia sinensis* y *Arctostaphylos uva-ursi* y al menos una planta seleccionada entre *Vitis vinifera var. tinctoria*, *Eugenia caryophyllus* y *Desmodium adscendens*.
22. La composición herbaria de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende además una o más plantas secas adicionales seleccionadas entre: *Achillea millefolium*, *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria*, *Agropyrum repens*, *Agropyrum repens*, *Alchemilla vulgaris*, *Alkanna tinctoria*, *Althaea officinalis*, *Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Arbutus unedo*, *Arnica montana*, *Artemisia pontica*, *Artemisia vulgaris*, *Asparagus officinalis*, *Asparagus officinalis*, *Asperula odorata*, *Betula pendula*, *Borrago officinalis*, *Buxus sempervirens*, *Calamintha officinalis*, *Calendula officinalis*, *Calluna vulgaris*, *Carum carvi*, *Cassia angustifolia*, *Centaurea cyanus*, *Centaureum erythraea*, *Centella asiatica*, *Cetraria islandica*, *Chamaemelum nobile*, *Chamomilla recutita*, *Chrysanthellum americanum*, *Cichorium endivia*, *Cichorium intybus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus aurantium*, *Combretum micranthum*, *Crataegus oxyacantha*, *Cuminum cyminum*, *Cupressus sempervirens*, *Curcuma zedoaria*, *Cynara scolymus*, *Cytisus scoparius*, *Desmodium adscendens*, *Eletharia cardamomum*, *Eleutherococcus senticosus*, *Epilobium parviflorum*, *Erysimum officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Eupatorium cannabinum*, *Foeniculum vulgare*, *Fraxinus excelsior*, *Fucus vesiculosus*, *Fumaria officinalis*, *Galium odoratum*, *Gentiana lutea*, *Geranium robertianum*, *Ginkgo biloba*, *Glechoma hederacea*, *Glycyrrhiza glabra*, *Handroanthus impetiginosus*, *Harpagophytum procumbens*, *Hieracium pilosella*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Hyssopus officinalis*, *Illicium verum*, *Inula helenium*, *Juglans regia*, *Juniperus communis*, *Lamium album*, *Lavandula angustifolia*, *Levisticum officinale*, *Lippia citrodora*, *Lotus corniculatus*, *Lythrum salicaria*, *Malva sylvestris*, *Marrubium vulgare*, *Medicago sativa*, *Melissa officinalis*, *Mentha x piperita*, *Morus nigra*, *Myrtus communis*, *Olea europaea*, *Origanum majorana*, *Panax ginseng*, *Papaver rhoeas*,

Parietaria officinalis, Passiflora incarnata, Petroselinum crispum, Peumus boldus, Phaseolus vulgaris, Pimpinella anisum, Plantago lanceolata, Plantago ovata, Potentilla anserina, Quercus robur, Rhamnus frangula, Rheum palmatum, Rosa centifolia, Rosmarinus officinalis, Rubia tinctorum, Rubus idaeus, Salix alba, Salvia officinalis, Sambucus nigra, Satureja montana, Silybum marianum, Solanum dulcamara, Tabebuia impetiginosa, Tanacetum vulgare, Taraxacum officinalis, Thymus serpyllum, Thymus vulgaris, Tilia tomentosa, Tilia cordata, Trigonella foenum-graecum, Tussilago farfara, Vaccinium myrtillus, Valeriana officinalis, Verbascum thapsus, Verbena officinalis, Viscum album, Vitis vinifera var. tinctoria, Zea mays y Zingiber officinale.

23. Un procedimiento de preparación del suplemento alimenticio, de la composición nutracéutica, farmacéutica, veterinaria o cosmética, del alimento funcional o del aditivo alimenticio según las reivindicaciones 12 o 13, que comprende mezclar el extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o el liofilizado de la reivindicación 11, con al menos un excipiente.