

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 894 839**

51 Int. Cl.:

A61K 31/194	(2006.01)	A23L 3/358	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 33/30	(2006.01)		
A23B 4/20	(2006.01)		
A61P 17/02	(2006.01)		
A61P 31/02	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		
A61P 31/10	(2006.01)		
A23L 3/3463	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2014 PCT/CA2014/050180**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14134731**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2014 E 14761205 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021 EP 2964235**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas antibiopelícula que comprenden EDTA disódico y sodio**

30 Prioridad:

07.03.2013 US 201361773912 P
26.04.2013 WO PCT/CA2013/050324
13.06.2013 US 201361834654 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2022

73 Titular/es:

KANE BIOTECH INC. (100.0%)
162-196 Innovation Drive
Winnipeg, Manitoba R3T 2N2, CA

72 Inventor/es:

GAWANDE, PURUSHOTTAM V.;
LOVETRI, KAREN;
YAKANDAWALA, NANDADEVA;
FROELICH, GORD y
MADHYASTHA, SRINIVASA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 894 839 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones antimicrobianas antibiopelícula que comprenden EDTA disódico y sodio

5 Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/773.912, presentada el 7 de marzo de 2013 titulada "COMPOSICIONES Y MÉTODOS ANTIMICROBIANOS Y USOS DE LOS MISMOS PARA TRATAR Y PREVENIR INFECCIONES POR HERIDAS"; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/CA2013/050324 presentada el 26 de abril de 2013 titulada "COMPOSICIONES ANTIMICROBIANAS-ANTIBIOLÓGICAS Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS"; y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 61 / 834.654 presentada el 13 de junio de 2013 titulada "COMPOSICIONES ANTIMICROBIANAS-ANTIBIOLÓGICAS Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS".

15 Campo de la invención

Esta invención puede referirse a los métodos de uso de composiciones antimicrobianas y antibiopelícula para la prevención y el tratamiento de infecciones de heridas. Además, referirse a los métodos de formulación de las composiciones que contiene agentes quelantes, sales de zinc, antimicrobianos y excipientes aceptados para uso farmacéutico, para aplicaciones en el cuidado de heridas, desinfectantes, cosméticos e instrumentos /dispositivos médicos. Más particularmente, la invención se refiere a un método eficaz para la entrega de una formulación farmacéutica aceptable que contiene dos o más agentes quelantes y una sal de zinc.

25 Antecedentes de la invención

Desde un punto de vista microbiológico, la principal función de la piel humana intacta, normal, y la de los animales es el control de las poblaciones microbianas que viven en la superficie de la piel, y evitar que el tejido subyacente sea invadido y colonizado por patógenos potenciales. La exposición del tejido subcutáneo (es decir, una herida) proporciona un ambiente húmedo, cálido y nutritivo que es propicio para la colonización y proliferación microbiana.

En vista de que la colonización de las heridas es en su mayoría polimicrobiana, con la participación de numerosos microorganismos potencialmente patógenos, cualquier herida tiene el riesgo de infectarse. En el caso de que no se cure una infección de una herida, el paciente sufre mayor trauma, así como aumento de los costos de tratamiento. Las prácticas generales de manejo de heridas demandan más recursos. Más del 2% de la población estadounidense sufre de tales heridas crónicas que no cicatrizan, lo que le cuestan al sistema de salud estadounidense \$20 mil millones al año. A nivel mundial, las heridas son un enorme problema tanto en los seres humanos como en los animales.

Por tanto, la preocupación entre los profesionales de la salud en relación con el riesgo de infección de las heridas se justifica no sólo en términos de un mayor trauma para el paciente, sino también teniendo en cuenta su carga sobre los recursos financieros y la creciente exigencia de una gestión rentable dentro del sistema de salud. La mayor parte de las infecciones de heridas son causadas por *Staphylococcus aureus* (20%), *Staphylococcus epi-dermidis* (14%), *Enterococci spp.* (12%), *Escherichia coli* (8%), *Pseudomonas aeruginosa* (8%), *Enterobacter spp.* (7%), *Proteus spp.* (3%), *Klebsiella pneumoniae* (3%), *Streptococci* (3%) y *Candida albicans* (3%).

Las heridas a menudo tienen múltiples barreras para la curación. La cicatrización e infección de las heridas depende de la relación entre la capacidad de las bacterias para crear una comunidad próspera y estable dentro de un entorno de la herida y la capacidad del huésped para controlar la comunidad bacteriana. Puesto que las bacterias son rápidamente capaces de formar su propio microambiente de protección (biopelícula) después de su adhesión a una superficie, la capacidad del huésped para controlar estos organismos es probable que disminuya cuando madura la comunidad biopelicular. Dentro de una comunidad biopelicular estable, es probable que las interacciones entre bacterias aeróbicas y anaeróbicas aumenten su efecto patogénico neto, mejorando su potencial para causar infección y retrasar la curación. En los últimos años, algunos especialistas han vinculado la formación de biopelícula con las heridas crónicas. La evaluación microscópica de las heridas crónicas mostró la formación de biopelícula organizada con sustancia polimérica extracelular adherida alrededor de colonias bacterias en al menos 60% de las heridas crónicas.

En los últimos años, se han realizado numerosos esfuerzos para utilizar antibióticos y antimicrobianos para el tratamiento de heridas clínicamente infectadas que no cicatrizan tanto en humanos como en animales. Estos agentes antimicrobianos son de diferentes composiciones químicas y pueden incluir péptidos, antisépticos (patente de EE.UU. No. 6.700.032), antibióticos, iones/compuestos de plata (solicitud de patente de EE.UU., publicación No. 2005/0035327), quitosano (solicitud de patente de EE.UU. No. de publicación 2006/0210613; patente de Estados Unidos No. 6.998.509), nitrofurazona, tioles de bismuto y xilitol (documento WO 2005/058381).

Ha habido diversos intentos de otros especialistas para crear dispositivos para el cuidado de heridas, tales como vendajes o apósitos, geles y ungüentos que contienen agentes antimicrobianos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 3.930.000 que describe el uso de una crema de zinc alantoinato de plata para eliminar patógenos. Desde un punto de

vista microbiológico, la función principal de la piel humana, intacta, normal y la de los animales, es el control de las poblaciones microbianas que viven en la superficie de la piel y evitar que el tejido subyacente sea invadido y colonizado por patógenos potenciales. La exposición del tejido subcutáneo (es decir, una herida) proporciona un ambiente húmedo, cálido y nutritivo que es propicio para la colonización y proliferación microbiana.

Históricamente se ha supuesto que las propiedades de las bacterias que causan infecciones crónicas eran similares a las de las bacterias cultivadas en suspensión de medio de crecimiento líquido. Sin embargo, la investigación durante los últimos 20 años ha indicado que muchas infecciones crónicas son el resultado del crecimiento microbiano en modo de biopelícula. Las bacterias en biopelículas pueden ser de 100 a 1000 veces más resistente a antibióticos/antimicrobianos en comparación con sus contrapartes planctónicas. Estudios recientes han demostrado que la formación de biopelícula puede ser la razón por la que no se curan las heridas crónicas (Singh and Barbul, Wound Rep Reg. 16: 1, 2008). Además, James et al. (Wound Rep Reg. 16: 37- 44, 2008) recientemente han demostrado la formación de biopelículas en más del 60% de las infecciones bacterianas asociadas con heridas crónicas como úlceras del pie diabético, úlceras de piernas venosas y úlceras por presión.

Las infecciones de heridas crónicas suelen ser infecciones persistentes que se desarrollan lentamente, parecen resolverse raramente a través de las defensas inmunitarias y responden de forma transitoria a la terapia antimicrobiana. Por tanto, existe una necesidad no satisfecha en el contexto clínico para el desarrollo de productos para el cuidado de heridas con actividad antibiopelícula como antimicrobiana para la prevención y tratamiento tanto de heridas agudas, así como crónicas que implican la formación de biopelículas. Una composición con actividad antibiopelícula y antimicrobiana mata las bacterias de las biopelículas que son altamente resistentes a los antibióticos/antimicrobianos y al sistema inmune del cuerpo mediante la inhibición de la formación de biopelículas y/o rompiendo las biopelículas preformadas. Además, también existe la necesidad de una composición para el cuidado de las heridas, sin antibiótico o desinfectante, que contenga generalmente una sustancia reconocida como segura (GRAS por sus siglas en inglés).

En una planta de procesamiento de carne o matadero, hay un problema de contaminación de la carne y los aparatos (por ejemplo, la máquina picadora, cortadora, visillos, mezcladores, transportadoras o similares) con microbios contaminadores de alimentos. En una planta de procesamiento de carne convencional, el hipoclorito de sodio se usa como un antimicrobiano durante un proceso de esterilización de la carne. La carne en canales se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio durante un cierto tiempo. Sin embargo, hay un problema de seguridad para el cuerpo humano por la reacción de productos de hipoclorito de sodio que se adhieren a la carne.

Por tanto, hay una necesidad de anti-microbianos para la esterilización de la carne, que tengan un alto grado de seguridad para los seres humanos, y gran potencia anti- microbiana duradera. Tal anti-microbiano deberá mantener la carne fresca por más tiempo y disminuir o prevenir la degradación de los productos.

Resumen de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición como se establece en la reivindicación 1 adjunta. La composición es una composición para su uso en el tratamiento de una infección de herida o infección de la piel inhibiendo la formación de biopelículas y/o alterando las biopelículas en un Infección de la herida de la piel y/o inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococci* resistente a la vancomicina, o el compuesto *Proteus mirabilis* combinando: EDTA disódico en una concentración de entre 100 mg/L y 500 mg/L de la composición; y citrato de sodio en una concentración entre 1000 mg/L y 5000 mg/L de la composición. Otras características de la composición resultarán evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes una descripción que sigue.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar el deterioro de la carne o desinfectar productos cárnicos mediante uso tópico como se establece en la reivindicación 8 adjunta. El método comprende: aplicar a la carne o productos cárnicos una composición, en la que la composición comprende o se forma combinando: EDTA disódico en una concentración de entre 100 mg/L y 500 mg/L de la composición; y citrato de sodio en una concentración de entre 1000 mg/L y 5000 mg/L de la composición. Otras características del método serán evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes, una descripción que sigue.

Las características y realizaciones descritas en el presente documento pueden aplicarse a la presente invención cuando el contexto lo permita y dichas características y realizaciones sean compatibles con la invención tal como se define en los aspectos antes mencionados y las reivindicaciones adjuntas. En el presente documento se pueden describir características y realizaciones adicionales que añaden contexto a la divulgación general o sirven como antecedentes o información adicional.

La presente invención puede proporcionar composiciones y métodos para la prevención, descontaminación o tratamiento de infecciones de heridas agudas y crónicas, o desinfección de productos cárnicos y carne.

Una realización puede proporcionar una composición que comprenda (a) al menos dos agentes quelantes y (b) una o dos sales de iones metálicos.

5 En otra realización, una composición comprende: (a) una pequeña cantidad de al menos dos agentes quelantes, (b) una pequeña cantidad de al menos una sal de iones metálicos, en la que la cantidad de cada uno de los componentes (a) y (b) es suficiente para formar una composición antiinfecciosa eficaz contra infecciones bacterianas en heridas y para su aplicación como desinfectantes.

10 En otra realización más, una composición comprende: (a) una pequeña cantidad de al menos dos agentes quelantes, una pequeña cantidad de al menos una sal de ión metálico y (c) excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 Otra realización más puede proporcionar una composición antiinfecciosa que comprende dos agentes quelantes y una o dos sales de iones metálicos que son efectivas contra bacterias y hongos que causan infecciones de heridas (infecciones de cortes, contusiones, sitios quirúrgicos, laceraciones, abrasiones, pinchazos, incisiones, disparos), quemaduras, pioderma, dermatitis atópica, eczema, úlceras por presión, úlceras venosas y arteriales de las piernas, úlceras del pie diabético, etc.), infecciones asociadas a la fibrosis quística (FQ), infecciones adquiridas en la comunidad u hospital o enfermedades transmitidas por alimentos.

20 Las composiciones pueden usarse contra una o más bacterias o levaduras asociadas a infecciones seleccionadas del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA por sus siglas en inglés), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococci* resistente a vancomicina (VRE por sus siglas en inglés), *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Proteus mirabilis*.

25 Una realización adicional de la invención puede proporcionar una composición antiinfecciosa que comprende al menos dos agentes quelantes y uno son dos sales de iones metálicos que se utilizan contra infecciones de heridas veterinarias o bacterias y levaduras asociadas a mastitis y otitis.

En una realización, la sal de iones metálicos está entre aproximadamente 1000 mg/L y aproximadamente 10000 mg/L de la composición.

30 Los agentes quelantes pueden seleccionarse del grupo que consiste en EDTA, EGTA, DTPA, EDDHA, IDA, CDTA, HEDTA, HEIDA, NTA, citrato de sodio, citrato de potasio, ovotransferrina y lactoferrina, a pesar de que los agentes quelantes incluyen al menos EDTA disódico y citrato de sodio. Las sales de iones metálicos se pueden seleccionar del grupo que consiste en cloruro de zinc, lactato de zinc, citrato de zinc, gluconato de zinc, sulfato de zinc, acetato de zinc, ión de plata o sulfadiazina de plata, sulfato de plata, nitrato de plata y carbonato de plata.

35 En otra realización, los agentes quelantes son EDTA y citrato de sodio, y la sal de iones metálicos es cloruro de zinc o sulfato de zinc. El EDTA puede estar presente en aproximadamente 10 mg/ml y el citrato de sodio puede estar presente en aproximadamente 10 mg/ml. El cloruro de zinc o el lactato de zinc pueden estar presentes en aproximadamente 1 mg/ml.

40 La composición puede comprender además uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en: agua, tampón de citrato, ácido cítrico, agente estabilizante, un agente aromatizante, vitaminas, minerales, hierbas, un tensioactivo, un péptido antimicrobiano, un antimicrobiano y un ajustador de pH.

45 Esta divulgación también puede enseñar métodos para preparar una formulación adecuada para la aplicación del cuidado de heridas en una variedad de formas, por ejemplo, en una solución desinfectante, una loción, crema, un gel, un aerosol, un aerosol de gel termorreversible, una pasta, un bálsamo, un vendaje, un apósito, una gasa, un dispositivo de irrigación de heridas, una envoltura y soluciones de inmersión de pezones para mastitis.

50 Esta divulgación además puede enseñar métodos para preparar formulaciones adecuadas para desinfectantes y cosméticos. Los desinfectantes tienen aplicaciones en la desinfección de frutas, verduras, instalaciones de procesamiento de alimentos y carne, hospitales, graneros, instrumentos médicos y otras instalaciones industriales e institucionales. Los cosméticos incluyen champús y lociones y cremas corporales antimicrobianas.

55 La invención además puede enseñar métodos para prevenir o tratar el deterioro de la carne que comprenden el uso tópico de la composición en carne o carne o productos cárnicos. El método puede incluir uno o más de recubrimiento, pulverización, nebulización, inyección, remojo, lavado, inmersión y enjuague.

60 Las formulaciones también pueden incluir agentes colorantes y aromatizantes naturales o sintéticos. También se pueden añadir agentes espesantes a las composiciones tales como goma guar, carbopol, polietilenglicol, pluronic F-127, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, goma de xantano y otros agentes espesantes farmacéuticamente aceptables.

Otras formulaciones resultarán fácilmente evidentes para un experto en la técnica. Una composición puede incluir enzimas antibiopelículas (celulasa, beta-N-acetilglucosasa, Dispersina B, papaína, DNasa 1, etc.), péptidos antimicrobianos,

antibióticos (gentamicina, ciprofloxacina, ampicilina, cefamendolona, rifamicina, etc.), antimicrobianos (tri-closan, clorhexidina, compuestos de amonio cuaternario, plata, sales de plata, etc.) y otros compuestos antibiopelícula.

5 Esta divulgación también puede enseñar el uso de sistemas de liberación de nanopartículas o liposomas que mejoran la estabilidad y eficacia de los compuestos antiinfecciosos en las composiciones.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio de citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos y en combinación sobre el crecimiento y la formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), que es ilustrativa de las realizaciones de la presente invención.

15 La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio de citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,125 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos y en combinación sobre el crecimiento y la formación de biopelícula de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a metilina (MRSP por sus siglas en inglés), que se proporciona para propósitos de antecedente.

20 La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio de citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos y en combinación, sobre el crecimiento y la formación de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

25 La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,062 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos y en combinación, sobre el crecimiento y la formación de biopelícula de *Listeria monocitogenes*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

30 La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), lo cual es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en las que tanto el citrato de sodio como el EDTA están presentes simultáneamente, y con propósitos comparativos de otro modo.

35 La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,125 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ en el crecimiento y la formación de biopelículas de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a metilina (MRSP), que se proporciona con fines de referencia.

40 La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solo, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

45 La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solo, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, que se proporciona para propósitos de antecedente.

50 La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solo, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ en el crecimiento y la formación de biopelículas de *Escherichia coli* O157:H7, que se proporciona para propósitos de antecedente.

55 La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos y en combinación sobre el crecimiento y la formación de biopelícula de *Escherichia coli* O157: H7, que se proporciona para propósitos de antecedente.

60 La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,125 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*, lo cual es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en las que están presentes simultáneamente citrato de sodio y EDTA, y con fines comparativos de otro modo.

65 La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitorio del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,125 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de estafilococos coagulasa negativos (CoNS-42), que se proporciona para propósitos de antecedente.

La Figura 13 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386, lo cual es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en las que tanto el citrato de sodio como el EDTA están presentes simultáneamente, y con fines comparativos de otro modo.

La Figura 14 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,125 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

La Figura 15 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,125 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Acinetobacter baumannii*, lo cual es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en las que están presentes simultáneamente citrato de sodio y EDTA, y con fines comparativos de otro modo.

La Figura 16 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Stenotrophomonas maltophilia*, lo cual es ilustrativo de las realizaciones de la presente invención en las que tanto el citrato de sodio como el EDTA están presentes simultáneamente, y con fines comparativos de otro modo.

La Figura 17 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de Enterococos resistentes a la vancomicina (VRE), lo cual es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en las que tanto el citrato de sodio como el EDTA están presentes simultáneamente, y con fines comparativos de otro modo.

La Figura 18 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Enterococcus faecalis*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

La Figura 19 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Proteus mirabilis*, lo cual es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en las que están presentes simultáneamente citrato de sodio y EDTA, y con fines comparativos de otro modo.

La Figura 20 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (3 mg/ml), EDTA (0,25 mg/ml) y ZnCl₂ (0,1 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Candida albicans*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

La Figura 21 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (1,5 mg/ml), EDTA (0,125 mg/ml) y ZnCl₂ (0,05 mg/ml) solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Malassezia pachydermatis*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

La Figura 22 es un gráfico de barras que muestra el efecto inhibitor del citrato de sodio (1,5 mg/ml), EDTA (0,125 mg/ml) y ZnCl₂ (0,05 mg/ml) solos y en combinación sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Malassezia pachydermatis*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "antimicrobiano" se refiere a un compuesto o una composición que mata o inhibe o detiene el crecimiento de microorganismos, que incluyen, pero no se limitan a, bacterias y levaduras.

El término "biopelícula" se refiere a una comunidad estructurada de microorganismos encerrados en una matriz polimérica extracelular autoproducida y unidos a una superficie biótica o abiótica. Las bacterias en una biopelícula pueden ser 1000 veces más resistentes a los antibióticos/antimicrobianos en comparación con sus contrapartes planctónicas (de vida libre).

El término "formación de biopelículas" se refiere a la unión de microorganismos a superficies y al desarrollo subsiguiente de múltiples capas de células.

El término "antibiopelícula" se refiere a la inhibición de la formación de biopelículas microbianas y la interrupción o dispersión de biopelículas preformadas.

5 El término "infección" se refiere a la invasión y multiplicación de microorganismos tales como bacterias, virus y parásitos que normalmente no están presentes dentro del cuerpo. Una infección puede no causar síntomas y ser subclínica, o puede causar síntomas y ser clínicamente aparente. Una infección puede permanecer localizada o puede diseminarse a través de la sangre o los vasos linfáticos para volverse sistémica (en todo el cuerpo). Los microorganismos que viven naturalmente en el cuerpo no se consideran infecciones.

10 El término "herida" se refiere a un tipo de lesión en la que la piel se desgarrar, corta o perfora (una herida abierta), o donde un traumatismo por fuerza contundente provoca una contusión (una herida cerrada). En patología, se refiere específicamente a una lesión aguda, daños en la dermis de la piel.

15 El término "herida aguda" se refiere a aquellas que son nuevas y se encuentran en la primera fase de curación. Las heridas agudas se caracterizan por capas de piel que han sido perforadas o rotas por una fuerza u objeto externo. Cualquier herida aguda puede progresar a una herida crónica si no cicatriza dentro del período de tiempo esperado o como resultado de un suministro de sangre, oxígeno, nutrientes o higiene deficiente. Las heridas agudas deben tratarse adecuadamente para evitar infecciones, inflamaciones o presión constante. Las heridas agudas se clasifican en función de causas como laceraciones, abrasiones, pinchazos, incisiones, disparos, quemaduras y tipo según el tamaño y la profundidad (superficial o profunda).

20 El término "herida crónica" se refiere a una herida que simplemente no se repara por sí sola con el tiempo. A menudo se piensa que las heridas crónicas están "atascadas" en una de las fases de la cicatrización de heridas, y se ven con mayor frecuencia en la población de adultos mayores. Por lo general, si una herida no cicatriza como se esperaba en 2-3 meses, se considera crónica. Las heridas crónicas incluyen úlceras por presión (por ejemplo, úlceras de decúbito), úlceras arteriales y venosas de las piernas y úlceras diabéticas.

25 El término "desinfectantes" se refiere a sustancias que se aplican a objetos no vivos para destruir los microorganismos que viven en los objetos. La desinfección no necesariamente mata todos los microorganismos, especialmente las esporas bacterianas resistentes; es menos eficaz que la esterilización, que es un proceso físico y/o químico extremo que acaba con todo tipo de vida. Los desinfectantes son diferentes de otros agentes antimicrobianos como los antibióticos, que destruyen los microorganismos dentro del cuerpo, y los antisépticos, que destruyen los microorganismos en los tejidos vivos. Los desinfectantes también son diferentes de los biocidas: estos últimos están destinados a destruir todas las formas de vida, no solo los microorganismos. Los desinfectantes actúan destruyendo la pared celular/membrana de los microbios o interfiriendo con el metabolismo y el crecimiento.

30 El término "inhibición" se refiere al menos a una disminución del crecimiento bacteriano asociado a la herida y la formación de biopelículas.

35 El término "mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, como perros, caballos, gatos, ganado, cerdos, ovejas, etc.

40 El término "prevención" se refiere al menos a prevenir una afección asociada con bacterias que ocurren en un mamífero, particularmente cuando se encuentra que el mamífero está predispuesto a tener la afección, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

45 El término "sujeto" se refiere a un vertebrado vivo tal como un mamífero (preferiblemente humanos y animales de compañía) que necesita tratamiento.

50 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una composición lo suficientemente alta como para proporcionar una modificación positiva significativa de la(s) condición(es) del sujeto que se va a tratar.

55 Una "cantidad preventiva" como se usa en este documento incluye una cantidad profiláctica, por ejemplo, una cantidad efectiva para prevenir o proteger contra heridas, infecciones de la piel y enfermedades relacionadas, y sus síntomas, y cantidades efectivas para aliviar o curar heridas, infecciones de la piel, enfermedades relacionadas y síntomas de las mismas. Al administrar un péptido adecuado para su uso en los métodos de la invención al mismo tiempo que un antimicrobiano, el péptido y/o el antimicrobiano se pueden administrar en una cantidad de dosificación que es menor que la cantidad de dosificación requerida cuando el antimicrobiano se administra como un único ingrediente activo. Al administrar cantidades de dosificación más bajas de ingrediente activo, se podrían reducir los efectos secundarios asociados con el mismo.

60 El término "tratamiento" se refiere a una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo adicional o alterar la patología de un trastorno existente. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la infección, así como aquellos en los que se debe prevenir la infección. Con respecto a las infecciones de heridas, "tratar o tratamiento" pretende significar al menos la mitigación de las condiciones de cicatrización de heridas asociadas con infecciones

bacterianas en un sujeto, como un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un ser humano, que se ve afectado al menos en parte por la afección, e incluye, pero no se limita a, modular, inhibir la afección y/o aliviar la afección.

5 El término "sal de iones metálicos" se refiere a la sal de un ión metálico como cloruro de zinc, lactato de zinc, citrato de zinc, gluconato de zinc, sulfato de zinc, acetato de zinc, iones de plata o sulfadiazina de plata, sulfato de plata, nitrato de plata y carbonato de plata.

10 La presente divulgación puede enseñar composiciones antiinfecciosas que ofrecen actividad antimicrobiana y antibiopelícula, que contienen combinaciones de agentes quelantes con otros agentes antimicrobianos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos/compuestos antibiopelícula, sales de iones metálicos con agentes gelificantes, tensioactivos. o agentes estabilizantes.

15 Las composiciones novedosas que combinan agentes quelantes junto con sales de iones metálicos de manera que se utilizan cantidades menores de agentes quelantes y/o sales de iones metálicos de las que normalmente serían necesarias para una composición antimicrobiana se usan para conseguir un crecimiento bacteriano significativo y una inhibición de la biopelícula. Se pueden usar concentraciones más altas de estos compuestos si se desea para ciertas aplicaciones.

20 La cantidad de agentes quelantes a utilizar en la composición antimicrobiana puede estar entre 10000 y 100000 mg/L. El extremo superior de este rango indicado podría usarse para preparar un producto concentrado que se diluiría antes de su uso. Para productos no concentrados, la cantidad a utilizar es preferiblemente entre aproximadamente 5000 y 10000 mg/L. Preferiblemente, el intervalo está entre aproximadamente 1000 y 5000 mg/L.

25 La cantidad de agentes quelantes a utilizar debe estar entre aproximadamente 1000 y 5000 mg/L. El límite superior de este intervalo podría aplicarse si las composiciones se formularan como un concentrado. Para productos no concentrados, la cantidad de agente quelante que se va a usar es preferiblemente entre aproximadamente 500 y 5000 mg/L. Preferiblemente, el intervalo está entre aproximadamente 1000 y 3000 mg/L, más preferiblemente entre aproximadamente 2000 y 3000 mg/L.

30 Las cantidades antes mencionadas de agentes quelantes son a pesar de que el EDTA disódico está en una concentración de entre 100 mg/L y 500 mg/L de la composición, y el citrato de sodio está en una concentración de entre 1000 mg/L y 5000 mg/L de la composición.

Preparación

35 Mediante un método, si se forma una composición de dos componentes que contiene dos agentes quelantes y una sal de iones metálicos, estos compuestos se pueden combinar de la siguiente manera. Con una buena agitación, se puede disolver un agente quelante en agua, seguido de una sal de iones metálicos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el orden de adición se puede invertir.

40 Además, antimicrobianos/péptidos antimicrobianos, antibióticos, compuestos de antibiopelícula, compuestos cuaternarios de amonio y tensioactivos también pueden combinarse ventajosamente con agentes quelantes en una composición antimicrobiana. La composición puede comprender: (a) una pequeña cantidad de al menos uno o dos agentes quelantes; (b) una pequeña cantidad de una sal de iones metálicos o glicoproteína secuestradora de hierro o péptido antimicrobiano o un antibiótico o un compuesto antibiopelícula; y (c) una cantidad escasa de al menos un compuesto del grupo que
45 consiste en un agente estabilizante y/o un agente gelificante y/o un tensioactivo, en donde, la cantidad de cada uno de los componentes (a), (b) y es suficiente para formar, en combinación, una composición antiinfecciosa eficaz para la prevención y el tratamiento de infecciones de heridas agudas y crónicas (infecciones de cortes, contusiones, sitios quirúrgicos, laceraciones, abrasiones, pinchazos, incisiones, disparos, quemaduras, pioderma, dermatitis atópica, eccema, úlceras por presión, úlceras venosas y arteriales de las piernas, úlceras del pie diabético, etc.).

50 La concentración de componentes activos en las composiciones puede variar según se desee o sea necesario para disminuir la cantidad de tiempo que se usa la composición para prevenir o tratar infecciones de heridas y para desinfección. Estas variaciones en la concentración de componentes activos las determinan fácilmente los expertos en la técnica.

55 Composiciones

60 Las composiciones de la invención comprenden o se forman combinando: EDTA disódico en una concentración de entre 100 mg/L y 500 mg/L de la composición; y citrato de sodio en una concentración entre 1000 mg/L y 5000 mg/L de la composición.

La presente invención puede incluir composiciones antiinfecciosas únicas y mejoradas para la prevención y el tratamiento de infecciones de heridas que comprenden al menos dos agentes quelantes y una sal de iones metálicos.

65 En una realización, dos agentes quelantes y una composición que contiene una sal de iones metálicos incluyen un compuesto antimicrobiano. Los agentes quelantes y una composición que contiene una sal de iones metálicos con un

- 5 compuesto antimicrobiano y antibiopelícula tienen un efecto inhibitor mejorado sobre el crecimiento bacteriano asociado a la infección de heridas y la formación de biopelículas. Además, la adición de un compuesto antimicrobiano a una composición que contiene agentes quelantes y una sal de iones metálicos puede hacer que la composición sea eficaz contra patógenos asociados con infecciones de heridas y contaminación microbiana que provocan enfermedades transmitidas por alimentos.
- 10 En una realización, una composición antimicrobiana-antibiótica mejorada comprende al menos dos agentes quelantes, una sal de ión metálico y uno o más agentes antimicrobianos que comprenden antisépticos (por ejemplo, triclosán, sal de clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio, etc.), antibióticos y bacteriocinas (por ejemplo, nisina, epidermina, gallidennina, cinamicina, duramicina, lacticina 481, etc.) y glicoproteínas secuestradoras de hierro (ovotransferrina, lactoferrina y serrotransferrina). Además, las composiciones para el cuidado de heridas o desinfectantes pueden comprender ingredientes como citrato (p. ej., ácido cítrico, citrato de zinc, citrato de sodio, citrato de potasio, etc.), minerales (p. ej., sales minerales como cloruro de zinc, gluconato de zinc, zinc lactato, citrato de zinc, sulfato de zinc, acetato de zinc, plata, sulfato de plata, sulfadiazina de plata, nitrato de plata, carbonato de plata, etc.) y triterpenoides (p. ej., ácido oleanólico y ácido ursólico) y quitosano.
- 15 En una realización, una composición comprende un antibiótico y dos agentes quelantes y también una sal de ión metálico. Los antibióticos son bien conocidos. Los grupos de antibióticos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de β -lactama (por ejemplo, penicilina, ampicilina, amoxicilina, metilina, etc.), cefalosporinas (por ejemplo, cefalotina, cefamicina, etc.), aminoglucósidos (por ejemplo, estreptomycin, tobramicina, etc.), polienos (p. ej., anfotericina, nistatina, etc.), macrólidos (p. ej., eritromicina, etc.), tetraciclinas (p. ej., tetraciclina, doxiciclina, etc.), nitroimidazol (p. ej., metronidazol), quinolonas (p. ej., ácido nalidíxico), rifamicinas (por ejemplo, rifampina) y sulfonamidas (por ejemplo, sulfanilamida), nitroaromáticos (por ejemplo, cloranfenicol) y piridinas (por ejemplo, isoniazida).
- 20 En una realización, una composición comprende un antiséptico, dos agentes quelantes y una sal de ión metálico. Los antisépticos son agentes que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos en las superficies externas del cuerpo. Los antisépticos incluyen, pero no se limitan a, triclosán, sal de clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio.
- 25 En una realización, una composición comprende un compuesto antibiopelícula, dos agentes quelantes y una sal de iones metálicos. Los compuestos de antibiopelícula incluyen, pero no se limitan a, DisperinB, DNasa I, Proteinasas K, apirasa, ácido cis-2-decanoico, alginato liasa, lactoferrina, galio, celulasa y 5-fluorouracilo.
- 30 En una realización, una composición es eficaz para inhibir el crecimiento y la formación de biopelículas en la infección de heridas. La composición también es eficaz para romper o dispersar biopelículas preformadas, lo que hace que las bacterias incrustadas en biopelículas sean más susceptibles a la destrucción antimicrobiana. En condiciones ambientales apropiadas, tales como humedad y pH, las infecciones se pueden modular usando realizaciones de la invención.
- 35 Una realización también puede incluir otros vehículos, diluyentes y aditivos farmacéuticamente aceptables tales como antioxidantes, compuestos antiinflamatorios, vitaminas, enzimas degradantes de tejidos, tampones y solutos que hacen que la formulación sea isotónica en el recipiente pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, tensioactivos y agentes espesantes.
- 40
- Formulaciones para el cuidado de heridas
- 45 Se puede añadir una composición de la invención a una variedad de formulaciones adecuadas para aplicar/administrar la composición a heridas, que incluyen, pero no se limitan a, soluciones desinfectantes, lociones, cremas, geles, aerosoles, gel en aerosol, vendajes, apósitos, envolturas, gasas, cintas, adhesivos y dispositivos de irrigación de heridas. Para proporcionar tales formulaciones, se combina una composición de esta invención con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 50 Las formulaciones que incluyen, pero no se limitan a, composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden uno o dos agentes quelantes y una sal de iones metálicos en combinación con un antiséptico, un antibiótico, un antimicrobiano, una glicoproteína secuestradora de hierro, una bacteriocina, una matriz extracelular o un quitosano pueden estar preparados por cualquier método conocido.
- 55 En general, los métodos de fabricación de composiciones antiinfecciosas pueden comprender combinar un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de ambos agentes quelantes y una sal de iones metálicos con un antiséptico, un antibiótico, una bacteriocina, un pepino antimicrobiano o quitosano.
- 60 Se pueden usar una variedad de vehículos y excipientes para formular una realización de esta invención y son bien conocidos. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, etanol, humectantes tales como polipropilenglicol, glicerol y sorbitol, agentes gelificantes tales como derivados de celulosa, copolímeros de bloque de polioxipropileno/polioxietileno, carboximetilcelulosa, pluronic F-127, alginato de sodio, polietilenglicol, agentes espesantes como Carbopol™ 934.
- 65

Método de tratamiento

Otra realización puede incluir un método para tratar infecciones de heridas y también para descontaminar superficies de heridas. En general, las infecciones de heridas se pueden tratar aplicando a la herida infectada de un sujeto una cantidad eficaz de uno o más agentes quelantes y una sal de iones metálicos en combinación con uno o más agentes antimicrobianos eficaces para reducir las infecciones de heridas.

Antes de vender carnes como pollo, res y cerdo para su consumo, es necesario detener o retardar el crecimiento de microorganismos patógenos y es preferible matar microorganismos patógenos como bacterias que pueden causar intoxicaciones alimentarias por su presencia en la carne. Por tanto, la invención proporciona un método para prevenir o tratar el deterioro de la carne que comprende el uso tópico de la composición de la invención en carne o productos cárnicos. La carne o productos cárnicos pueden ser uno o más de ternera, cerdo, cordero, cabra, caballo, pollo y pescado. La carne o los productos cárnicos pueden incluir intestinos o partes intestinales de cerdos, vacas, ovejas, cabras y caballos utilizados para hacer tripas de salchichas. También pueden incluir colágeno o celulosa utilizados para hacer tripas artificiales para salchichas.

Las composiciones se pueden aplicar mediante uno o más de los siguientes métodos: revestimiento, pulverización, nebulización, inyección, remojo, lavado, inmersión y enjuague.

Para su uso en el tratamiento o desinfección de la carne, el rango de concentración preferido de ingredientes puede incluir:

- (i) Citrato de sodio: 1.000 mg/L – 5.000 mg/L.
- (ii) EDTA disódico: 100 mg/L -500 mg/L
- (iii) Cloruro de zinc: (a) 1.000 mg/L -5.000 mg/L. (b) 500 mg/L -1.000 mg/L. (c) 100 mg/L - 500 mg/L. y (d) 10 mg/L-100 mg/L.

En una realización, al menos dos agentes quelantes y una sal de iones metálicos juntos se formulan como un medicamento farmacéuticamente aceptable como se describe en el presente documento que comprende un vehículo y una cantidad eficaz de composición que comprende uno o más agentes quelantes y una sal de iones metálicos como ingredientes activos.

Un régimen de dosificación ejemplar de una composición para el cuidado de heridas es la aplicación de una composición a la superficie de la herida de un sujeto (animal o humano) al menos una o dos veces. Según esta realización, un sujeto aplicaría una composición a la superficie de la herida de una a tres veces al día, dependiendo del tipo de herida y la gravedad de la infección. Para animales o mascotas, la composición se puede usar como loción o crema, o como gel o aerosol o como apósito dos o tres veces al día.

En una realización adicional, una composición antiinfecciosa para heridas mejorada no presenta ningún problema de resistencia a los antibióticos ni problemas de biocompatibilidad/seguridad. Además, la composición que comprende dos agentes quelantes (EDTA y citrato de sodio) y una sal de iones metálicos (cloruro de zinc o sulfato de zinc o lactato de zinc) tiene el estado GRAS (generalmente reconocido como seguro) y todos estos ingredientes son tanto alimentos como aditivos de piensos.

La presente invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Se pretende que estos ejemplos sean representativos de realizaciones específicas de la invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto inhibitor del citrato de sodio, EDTA y cloruro de zinc solo y en combinación sobre el crecimiento y la formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), que es ilustrativo de realizaciones de la presente invención.

Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *S. aureus* en TSB (por sus siglas en inglés) y se usó como inóculo. Se inocularon microplacas de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y juntos (cloruro de sodio + EDTA + cloruro de zinc) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células plactónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando un lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una composición que comprende citrato de sodio, EDTA y cloruro de zinc mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 1).

Ejemplo 2: Efecto inhibitor del citrato de sodio, EDTA y cloruro de zinc solo y en combinación sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina (MRSP), que se proporciona para apósitos de antecedente.

Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *S. pseudintermedius* resistente a la meticilina en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon e incubaron a 37°C microplacas de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y juntos (cloruro de sodio + EDTA + cloruro de zinc) durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células plactónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando el lector de microplacas Lab Systems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una composición que comprende citrato de sodio, EDTA y cloruro de zinc mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 2).

Ejemplo 3: Efecto inhibitor del citrato de sodio, EDTA y cloruro de zinc solos y en combinación sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *P. aeruginosa* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon microplacas de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y juntos (cloruro de sodio + EDTA + cloruro de zinc) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células plactónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando un lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una composición que comprende citrato de sodio, EDTA y cloruro de zinc mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 3).

Ejemplo 4: Efecto inhibitor del citrato de sodio, EDTA y cloruro de zinc solos y en combinación sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *L. monocytogenes* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon microplacas de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y juntos (cloruro de sodio + EDTA + cloruro de zinc) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células plactónicas en base a la absorbancia a 600 nm usando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm utilizando un lector de placas de microtitulación. Una composición que comprende citrato de sodio, EDTA y cloruro de zinc mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 4).

Ejemplo 5: Efecto inhibitor de las combinaciones de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solo, y de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* [MRSA] resistente a meticilina, que es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en la que tanto el citrato de sodio como el EDTA están presentes simultáneamente, y con fines comparativos de otro modo.

Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *S. aureus* (MRSA) en TSB y se usó como inóculo. Microplacas de 96 pocillos que contienen TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ fueron inoculados e incubados a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células plactónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Las combinaciones de Citrato de sodio + EDTA y citrato de sodio + ZnCl₂ mostraron un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, o EDTA, o cloruro de zinc solos (Figura 5).

Ejemplo 6: Efecto de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y de las combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina (MRSP), que se proporciona para propósitos de antecedente.

Se cultivó un caldo de cultivo durante la noche de MRSP en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon microplacas de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y las combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células plactónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando un lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Las combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ mostraron un efecto inhibitor

mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 6).

5 **Ejemplo 7:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

10 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *P. aeruginosa* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon microplacas de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células plactónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando un lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Las combinaciones de citrato de sodio + EDTA y EDTA + $ZnCl_2$ mostraron un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 7).

20 **Ejemplo 8:** Efecto inhibitor del citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ en *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, que se proporciona para propósitos de antecedente.

25 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *S. choleraesuis* ATCC 10708 en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y las combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de las células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm utilizando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 8).

30 **Ejemplo 9:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ sobre *Escherichia coli* O157: H7, que se proporciona para propósitos de antecedente.

35 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *E. coli* O157:H7 en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon e incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. A Las combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ mostraron un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, o EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 9).

45 **Ejemplo 10:** Efecto inhibitor del citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ solos y en combinación sobre *Escherichia coli* O157:H7, que se proporciona con fines de referencia.

50 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *E. coli* O157: H7 en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y juntos (cloruro de sodio + EDTA + cloruro de zinc) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de las células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una composición que comprende citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 10).

60 **Ejemplo 11:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ solo, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ sobre *Staphylococcus epidermidis*, que es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en las que tanto sodio el citrato y el EDTA están presentes simultáneamente, y con fines comparativos de otro modo.

65 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *S. epidermidis* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$, y EDTA + $ZnCl_2$ e

5 incubados a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 11).

10 **Ejemplo 12:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre estafilococos coagulasa negativos (CoNS-42), que se proporciona para propósitos de antecedente.

15 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de CoNS-42 en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 12).

20 **Ejemplo 13:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386, que es ilustrativo de realizaciones de la presente invención en las que tanto sodio el citrato y el EDTA están presentes simultáneamente, y con fines comparativos de otro modo.

25 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *S. agalactiae* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon e incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 13).

30 **Ejemplo 14:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre *Klebsiella pneumoniae*, que se proporciona con fines de referencia.

35 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *K. pneumoniae* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon e incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 14).

40 **Ejemplo 15:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre *Acinetobacter baumannii*, que es ilustrativo de realizaciones de la presente invención donde tanto sodio el citrato y el EDTA están presentes simultáneamente, y con fines comparativos de otro modo.

45 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *A. baumannii* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon e incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 15).

50 **Ejemplo 16:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre *Stenotrophomonas maltophilia*, que es ilustrativo de realizaciones de la presente

invención donde tanto el citrato de sodio como Los EDTA están presentes simultáneamente y con fines comparativos de otro modo.

5 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *S. maltophilia* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 16).

15 **Ejemplo 17:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y de las combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre enterococos resistentes a vancomicina (VRE), que es ilustrativo de realizaciones de la presente invención donde tanto el citrato de sodio como el EDTA están presentes simultáneamente, y con fines comparativos de otro modo.

20 Se hizo crecer un caldo de cultivo de VRE durante la noche en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 17).

30 **Ejemplo 18:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre *Enterococcus faecalis*, que se proporciona con fines de referencia.

35 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *E. faecalis* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 18).

45 **Ejemplo 19:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ en *Proteus mirabilis*, que es ilustrativo de realizaciones de la presente invención donde tanto el citrato de sodio como el EDTA están presentes simultáneamente y con fines comparativos de otro modo.

50 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *P. mirabilis* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon e incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 19).

55 **Ejemplo 20:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y ZnCl₂ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ sobre *Candida albicans*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

60 Se hizo crecer un caldo de cultivo durante la noche de *C. albicans* en TSB y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + ZnCl₂ y EDTA + ZnCl₂ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de

microtitulación. Una combinación de citrato de sodio + EDTA mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio o EDTA solos (Figura 20).

5 **Ejemplo 21:** Efecto inhibitor de citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ solos, y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ sobre *Malassezia pachydermatis*, que se proporciona para propósitos de antecedente.

10 Se cultivó un caldo de cultivo durante la noche de *Malassezia pachydermatis* en caldo de dextrosa Sabouraud y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de las células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm usando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Las combinaciones de citrato de sodio + EDTA, citrato de sodio + $ZnCl_2$ y EDTA + $ZnCl_2$ mostraron un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, o EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 21).

15 **Ejemplo 22:** Efecto inhibitor del citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ solos y en combinación sobre *Malassezia pachydermatis*, que se proporciona con fines de antecedentes.

20 Se cultivó un caldo de cultivo durante la noche de *Malassezia pachydermatis* en caldo de dextrosa Sabouraud y se usó como inóculo. Se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían TSB en ausencia y presencia de cada compuesto (citrato de sodio o EDTA o cloruro de zinc) por separado y juntos (cloruro de sodio + EDTA + cloruro de zinc) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se determinó el crecimiento de células planctónicas basado en la absorbancia a 600 nm utilizando el lector de microplacas Labsystems Multiskan Ascent. La biopelícula se midió desechando el medio en los pocillos, enjuagando el pocillo tres veces con agua y tiñendo las células unidas con cristal violeta. A continuación, se solubilizó el colorante con ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación. Una composición que comprende citrato de sodio, EDTA y $ZnCl_2$ mostró un efecto inhibitor mejorado sobre la formación de biopelículas, en comparación con el citrato de sodio, EDTA o cloruro de zinc solos (Figura 22).

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de una infección de la herida o infección de la piel inhibiendo la formación de biopelículas y/o interrumpiendo las biopelículas preformadas en una infección de la herida de la piel, y/o inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococci* resistente a vancomicina, *Proteus mirabilis*, la composición que comprende o se forma combinando:
- 5
- EDTA disódico en una concentración de entre 100 mg/L y 500 mg/L de la composición; y citrato de sodio en una concentración entre 1000 mg/L y 5000 mg/L de la composición.
- 10
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, donde la composición comprende o se forma combinando:
- 15
- a. EDTA disódico y citrato de sodio, o
b. citrato de sodio, EDTA disódico y cloruro de zinc.
3. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la composición es para uso contra bacterias y biopelículas bacterianas asociadas con una o más de infecciones en heridas, infecciones de fibrosis quística, mastitis, otitis e infecciones asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos y hospitales.
- 20
4. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en: agua, un tampón, un agente estabilizante, un agente gelificante, un tensioactivo, una hierba, una vitamina, un mineral, una matriz extracelular, un antimicrobiano, un antibiótico y un ajustador de pH.
- 25
5. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, preparada como una o más de una solución desinfectante, una solución de inmersión, una loción, una crema, un ungüento, un gel, un spray, un apósito, una gasa, un vendaje, un aerosol de gel termorreversible, una envoltura, un adhesivo, una cinta, un remojo, un bálsamo y un liposoma o nanopartícula o un sistema de suministro de dispositivo adecuado.
- 30
6. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un compuesto antiinfeccioso seleccionado del grupo que consiste en DispersinB, alginato liasa, nisina, lactoferrina, serotransferrina, ovotransferrina, ovoalbúmina, ovomucoide, sulfato de protamina, clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio, triclosan, sulfadiazina de plata, cloruro de benzalconio, peróxido de hidrógeno, ácido cítrico, citrato de potasio, 5-fluorouracilo, ácido cis-2-decenoico, DNasa I, proteinasa K, plata, galio, plata, bacteriocinas y péptidos antimicrobianos.
- 35
7. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición se utiliza para prevenir o tratar infecciones de uno o más cortes, contusiones, sitios quirúrgicos, laceraciones, abrasiones, pinchazos, incisiones, disparos, quemaduras, pioderma, otitis, ubre de vaca (mastitis), dermatitis atópica, eccema, úlceras por presión, úlceras venosas y arteriales de las piernas, úlceras del pie diabético, fibrosis quística (FQ) e infecciones bacterianas asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos o adquiridas de los hospitales o la comunidad, opcionalmente donde el uso es para uno o más seres humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de zoológico, animales deportivos y animales de compañía, tales como perros, caballos, gatos, ganado, cerdos, cabras y oveja.
- 40
8. Un método para tratar el deterioro de la carne o desinfectar productos cárnicos mediante uso tópico, comprendiendo el método aplicar a la carne o productos cárnicos una composición, en el que la composición comprende o se forma combinando:
- 45
- EDTA disódico en una concentración de entre 100 mg/L y 500 mg/L de la composición; y citrato de sodio en una concentración de entre 1000 mg/L y 5000 mg/L de la composición.
- 50
9. El método de la reivindicación 8, donde los productos cárnicos comprenden una o más tripas de salchicha de intestino o partes intestinales de porcinos, bovinos, ovinos, caprinos y equinos, y colágeno o celulosa utilizados para fabricar tripas artificiales de salchichas.
- 55
10. El método de las reivindicaciones 8 ó 9, donde el método comprende uno o más de recubrimiento, atomización, nebulización, inyección, remojo, enjuague, inmersión y aclarado.

FIG. 1

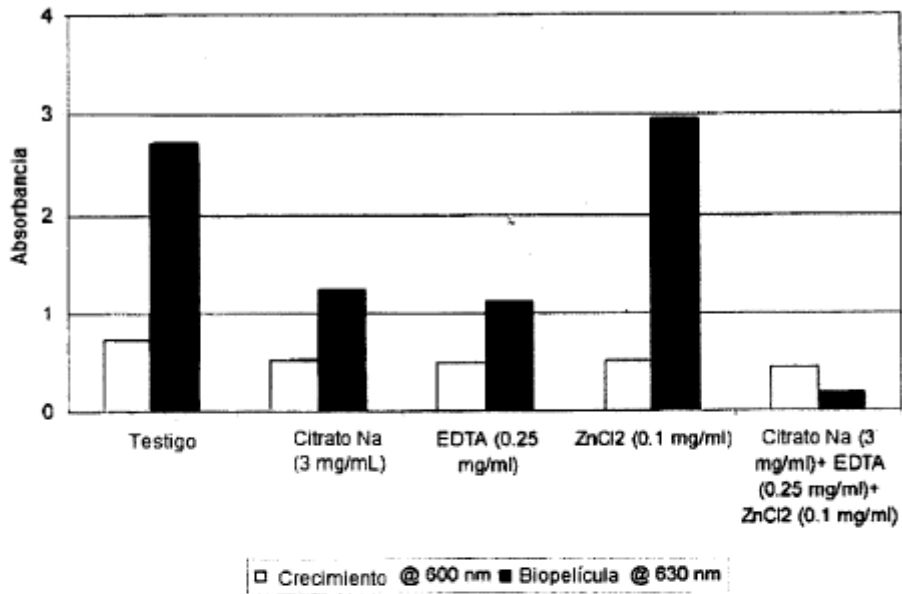


FIG. 2

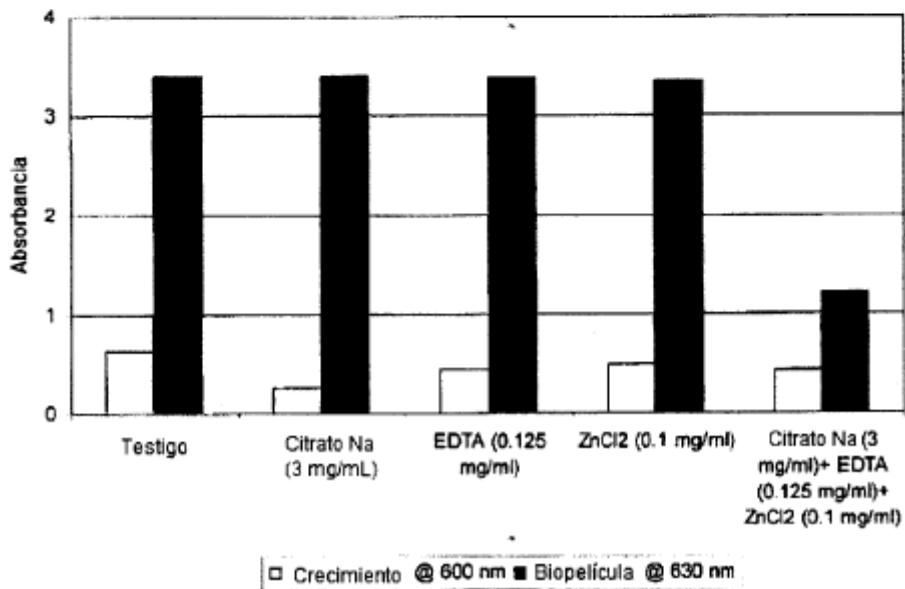


FIG. 3

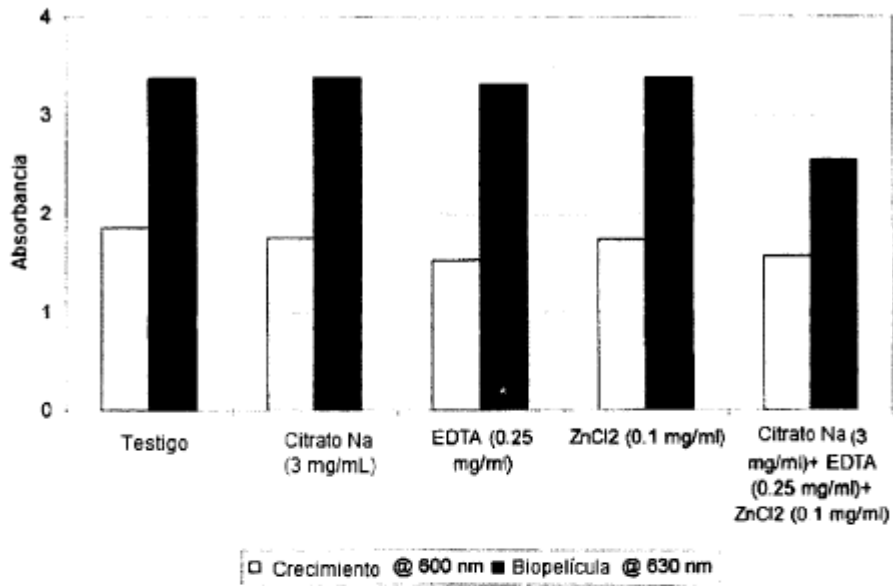


FIG. 4

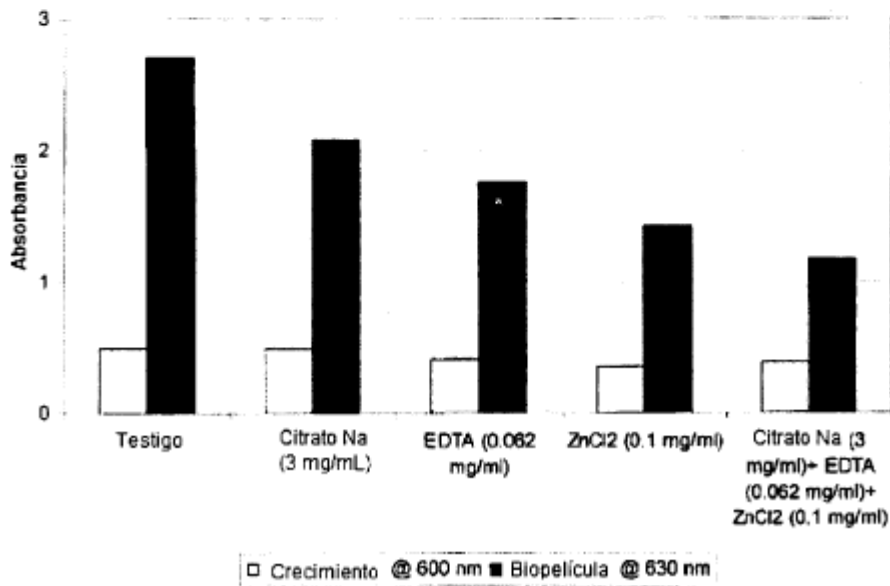


FIG. 5

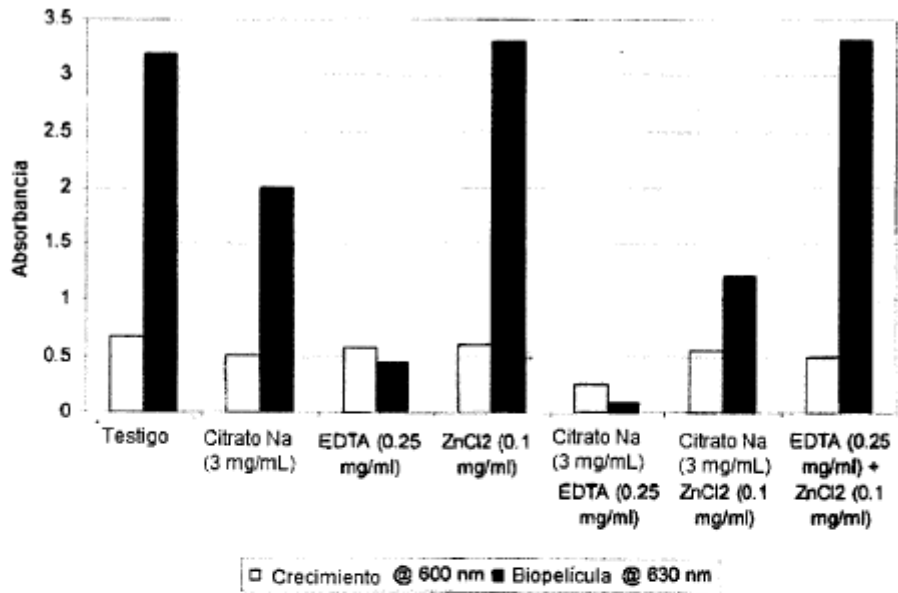


FIG. 6

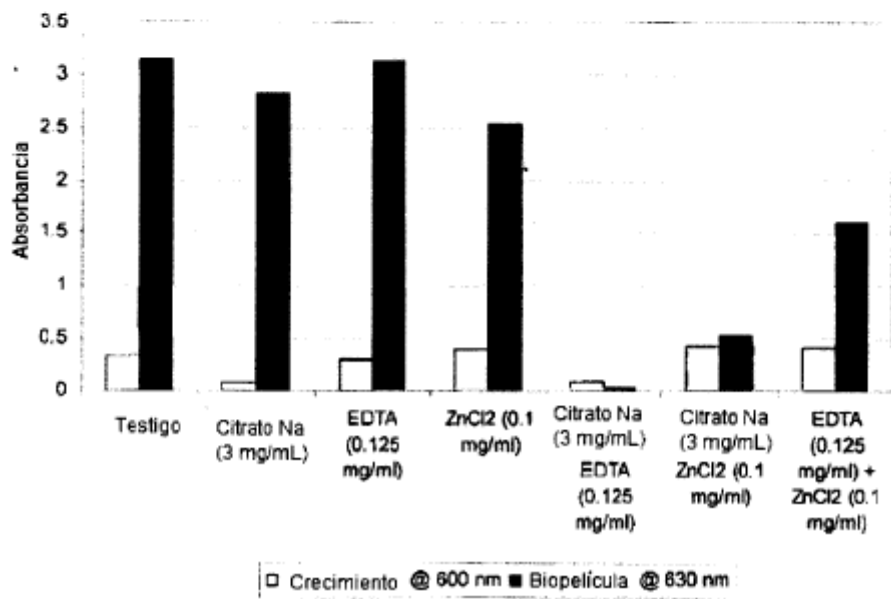


FIG. 7

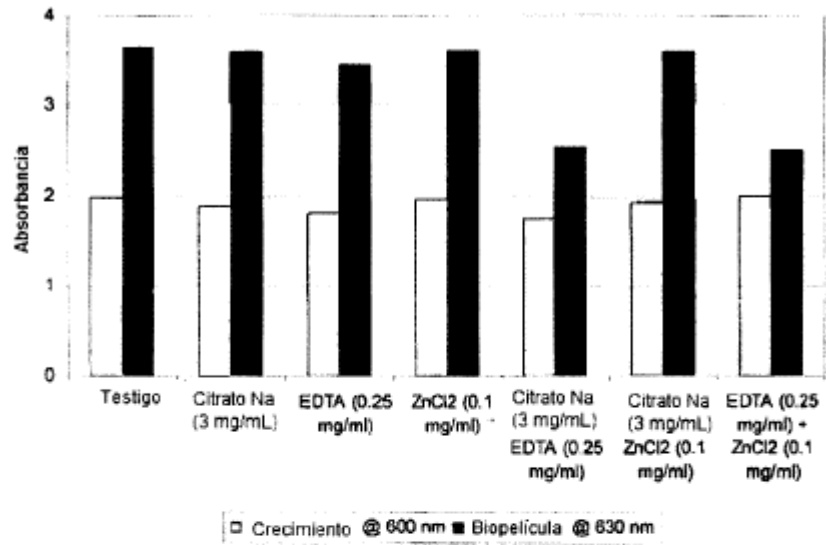


FIG. 8

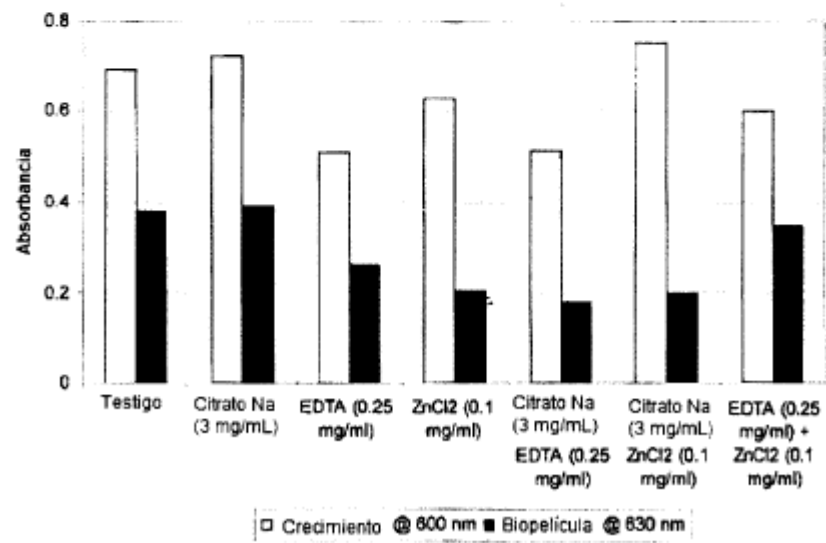


FIG. 9

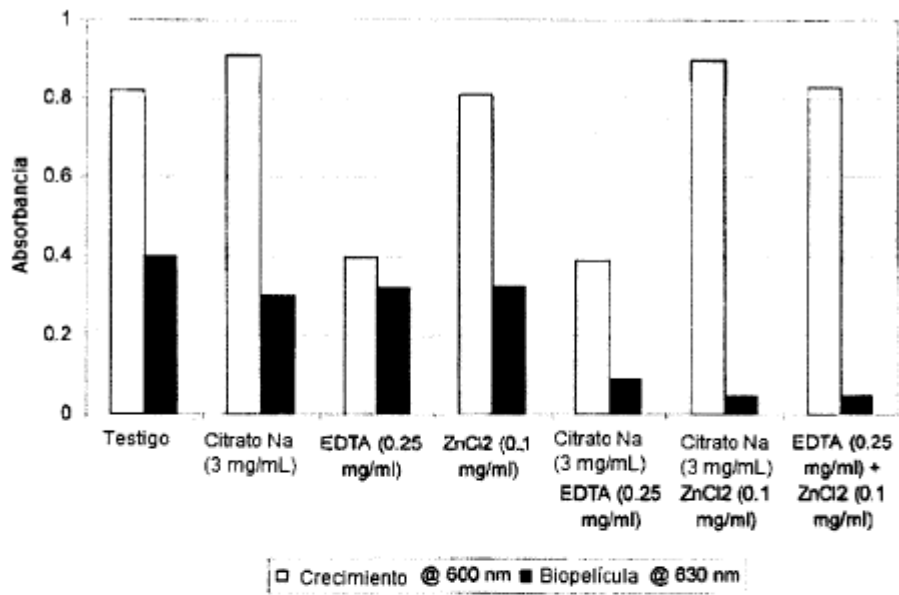


FIG. 10

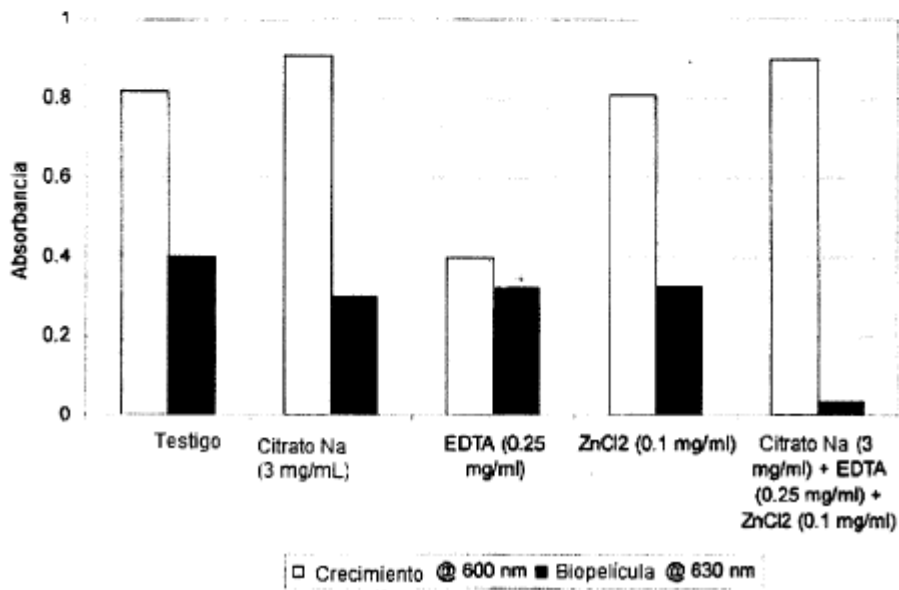


FIG. 11

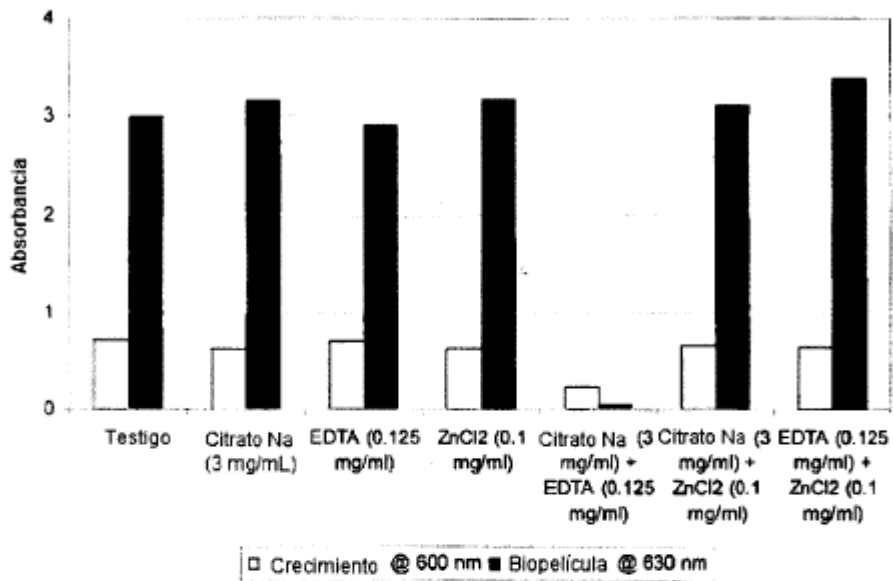


FIG. 12

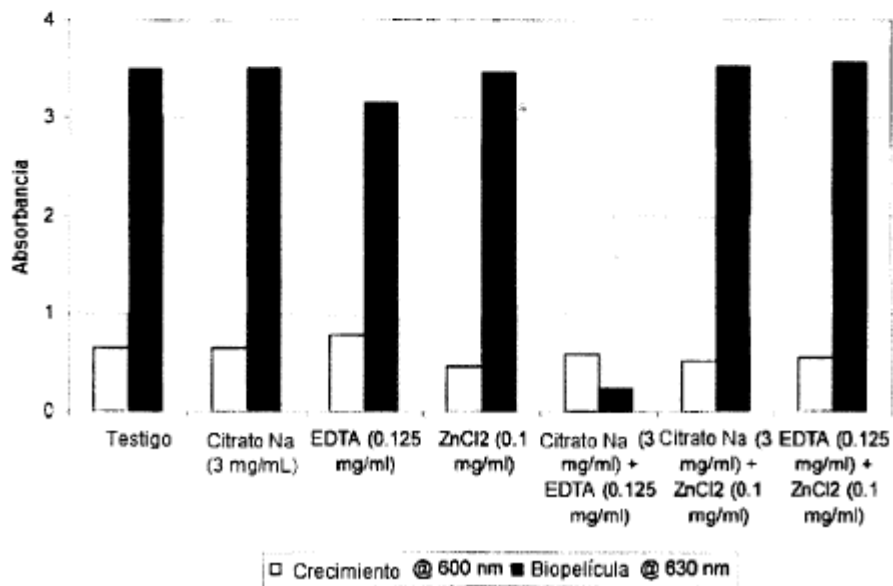


FIG. 13

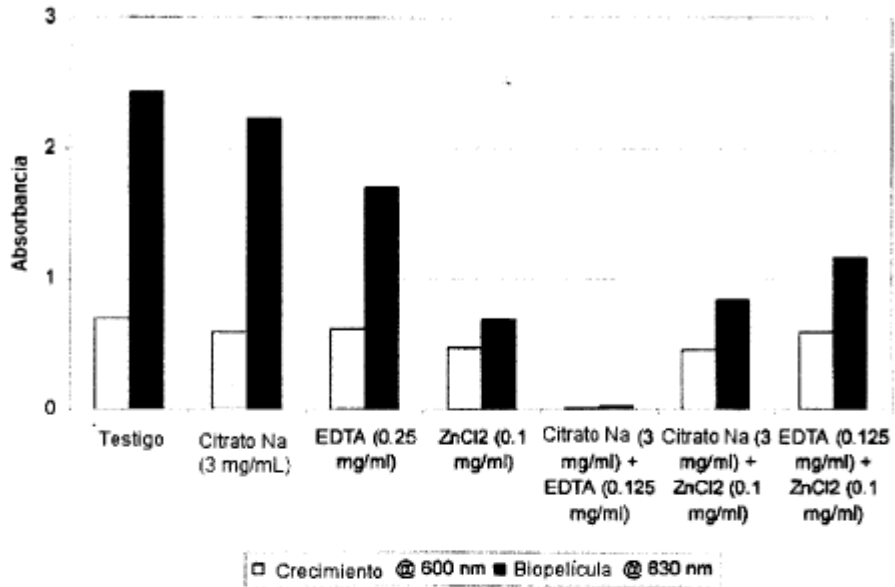


FIG. 14

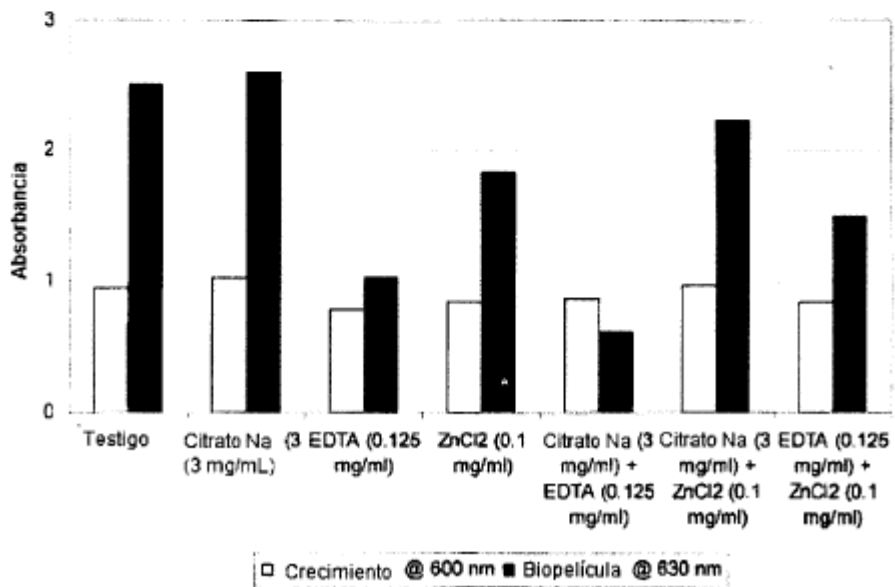


FIG. 15

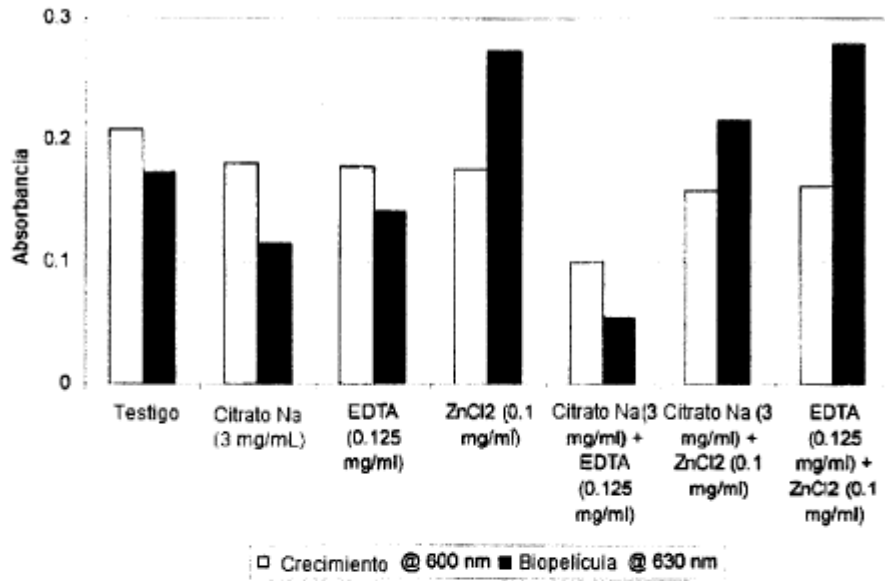


FIG. 16

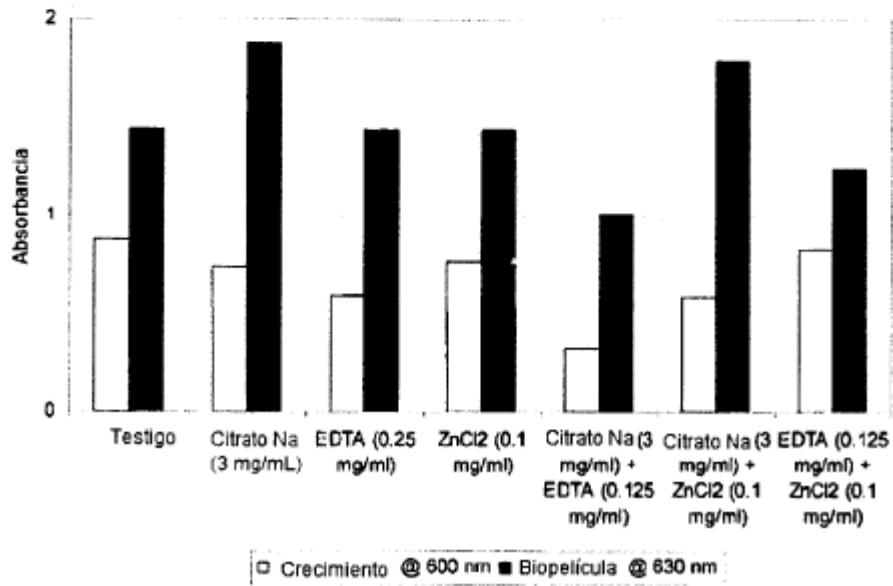


FIG. 17

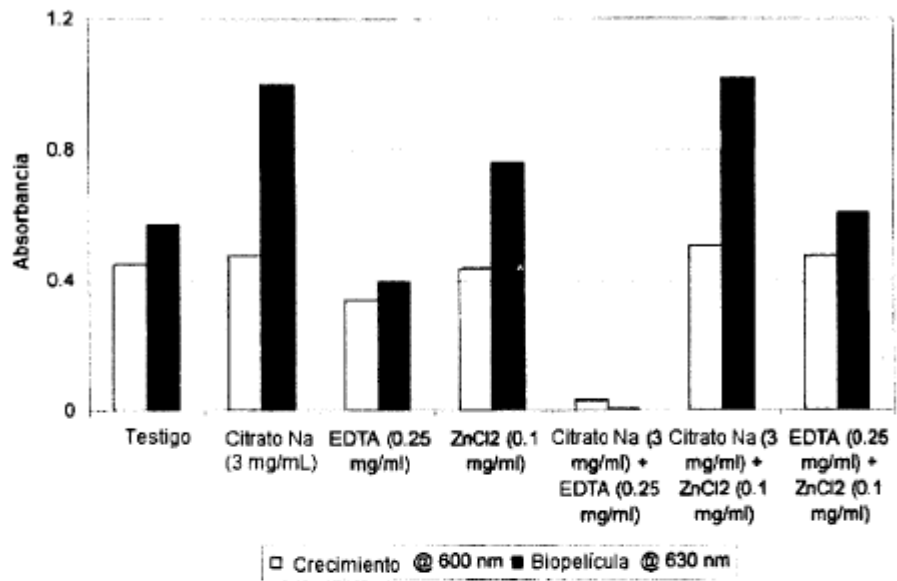


FIG. 18

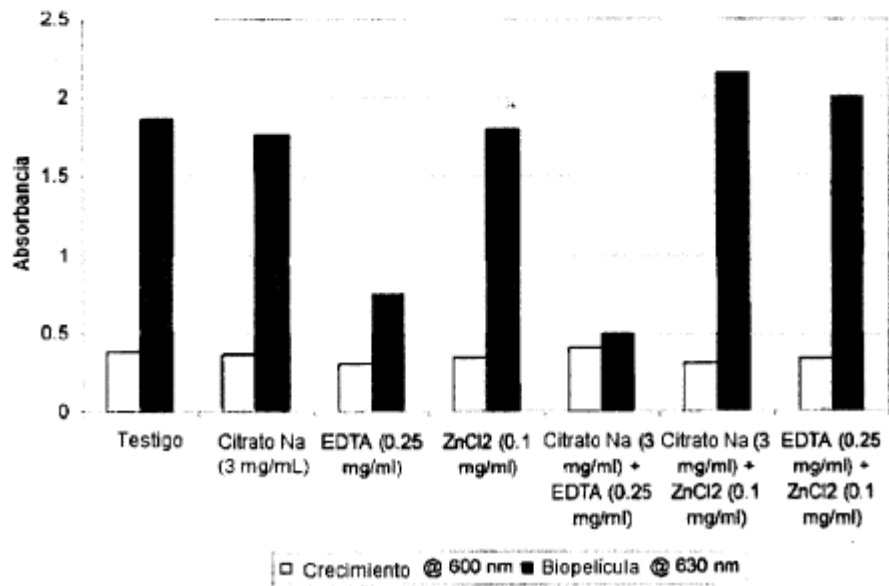


FIG. 19

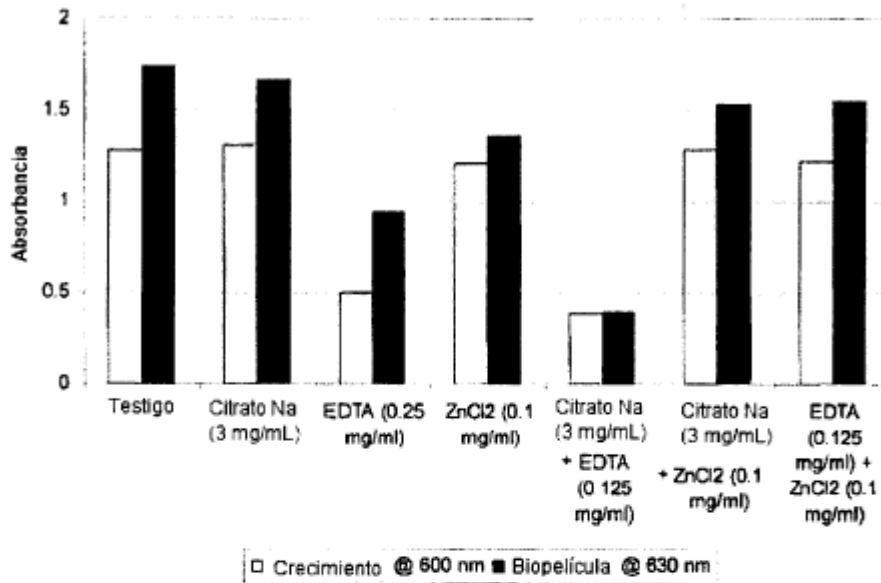


FIG. 20

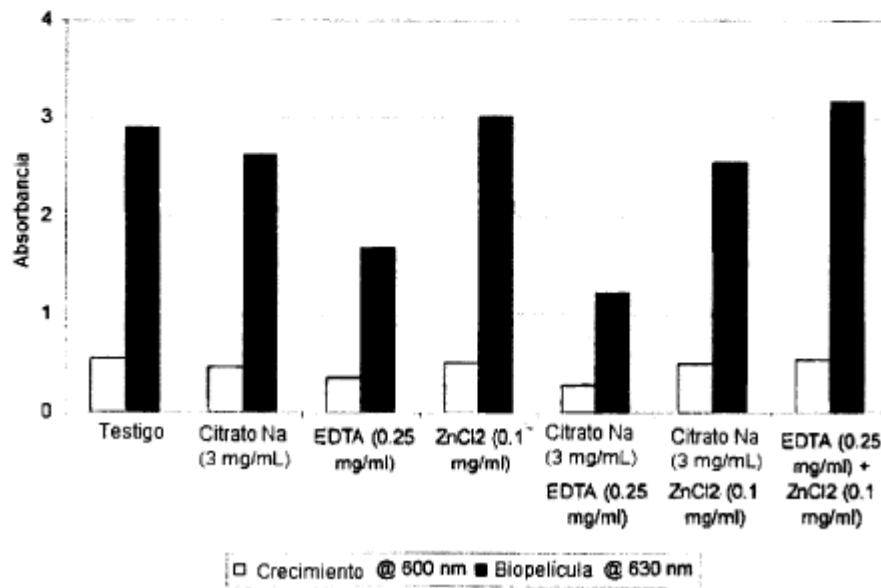


FIG. 21

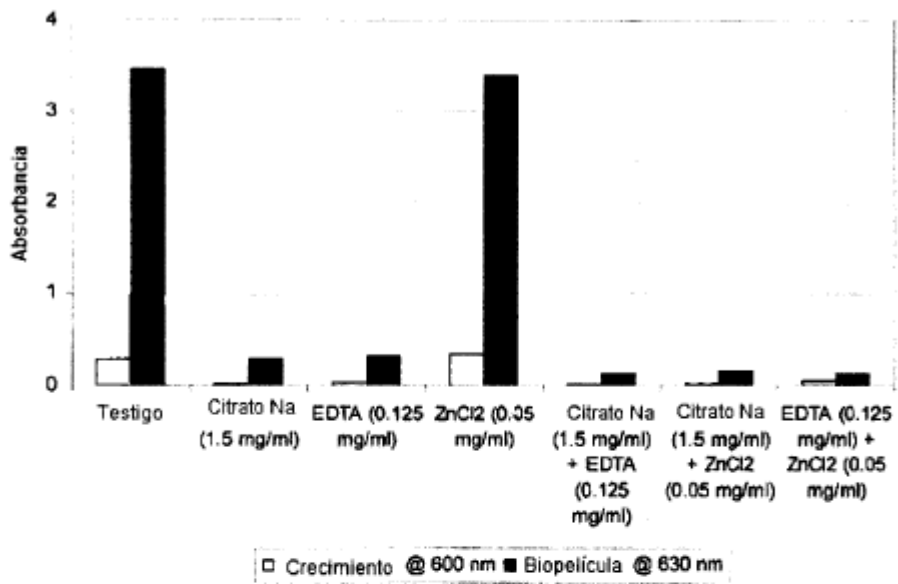


FIG. 22

