



MD/EP 4037666 T2 2024.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 4037666 (13) T2

(51) Int. Cl.:A61K 9/00 (2006.01.01)
A61K 9/48 (2006.01.01)
A61K 31/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2023 0240 (22) Data de depozit: 2021.12.07 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european:21835439.7, 2021.12.07 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:4037666, 2022.08.10 (31) Numărul cererii prioritare: 20770786; 2021900932; 2021221810 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2020.12.08; 2021.03.30; 2021.08.25 (33) Țara cererii prioritare: NZ; AU; AU	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 09/2024, 2024.09.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 18/2024, 2024.05.01 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2023, 2023.03.31
(71) Solicitant: RUMINANT BIOTECH CORP LIMITED, NZ (72) Inventatori: LAY Mark Christopher, NZ; THOMAS Hayden Peter, NZ; GLADDEN Neil Richard, NZ; HAYMAN David Leslie, NZ; CORBETT Geoffrey Earle, NZ; BHUSAL Prabhat, NZ (73) Titular: RUMINANT BIOTECH CORP LIMITED, NZ (74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin	

(54) Îmbunătățiri ale dispozitivelor și metodelor de furnizare a substanțelor la animale

(57) Rezumat:

Invenția furnizează o formă de dozare cu eliberare întârziată și un bolus configurat pentru administrare la un animal, în care respectiva formă de dozare și respectivul bolus sunt configurate pentru a elibera animalului o substanță hidrofobă într-o perioadă de timp. De preferință, substanța hidrofobă este o haloformă. De asemenea, este furnizată utilizarea formei de dozare cu eliberare întârziată sau a bolusului invenției pentru a reduce producția de metan la un animal rumegător. De asemenea, este furnizată metoda de fabricare a unui bolus conform invenției.

Revendicări: 15

Figuri: 18

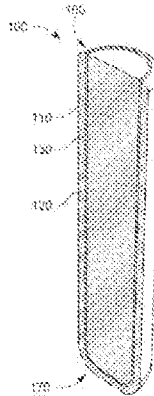


FIG. 18

MD/EP 4037666 T2 2024.09.30

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****Domeniul invenției**

Prezenta invenție se referă la îmbunătățiri ale dispozitivelor și metodelor de creștere a animalelor și de furnizare a unor substanțe la animale, în mod specific la dispozitive și metode de administrare a cel puțin unei substanțe avantajoase la un animal și la metode de fabricare a dispozitivelor.

Baza invenției

În agricultură este adesea necesară furnizarea de substanțe animalelor în diferite scopuri, inclusiv, dar nelimitativ, tratamentul sau prevenirea bolilor și creșterea producției.

Există diverse dispozitive și metode de furnizare la animale a substanțelor cum ar fi medicamente. Însă, o clasă de compuși dificil de furnizat animalelor sunt compușii hidrofobi. Proprietățile acestor compuși îngreunează dezvoltarea tehnologiei pentru eliberarea controlată a acestor substanțe hidrofobe, în special prin stomacul unui animal.

Un obiectiv specific al administrării substanțelor la animale este reducerea efectelor adverse ale agriculturii. De exemplu, se cunoaște administrarea diferiților inhibitori de metan și nitrificare la animale pentru a reduce sau atenua efectele adverse ale compușilor care conțin metan și nitrați produși de animale.

Cu toate acestea, în ciuda eforturilor actuale, schimbările climatice creează o gamă largă de impacturi sociale și de mediu la nivel global. Este larg înțeles faptul că aceste impacturi vor continua să crească în timp. Prin urmare, a existat o presiune globală de reducere a emisiilor de gaze cu efect de seră (GES) dăunătoare în efortul de a evita cele mai grave efecte ale schimbărilor climatice.

Sectorul agricol este considerat o sursă majoră de emisii GES. Emisiile totale de metan de la animale la nivel mondial reprezintă aproximativ 7.1 gigatone de echivalent CO₂ pe an, reprezentând 14.5% din toate emisiile GES antropogenice. Prin urmare, acest sector va juca un rol cheie în reducerea emisiilor generale de GES.

Principalele GES eliberate de agricultură sunt metan (CH₄) și protoxid de azot (N₂O), principala sursă de emisie a metanului fiind atribuită animalelor. Cea mai mare parte a metanului este emisă la eructația vitelor. Cantitatea de metan produsă pentru fiecare fermă este direct legată de consumul total de hrană al animalelor.

Țările care au un sector agricol puternic, cum ar fi Noua Zeelandă, se confruntă cu obiective dificile de reducere a emisiilor agricole. De exemplu, guvernul Noii Zeelande a introdus politici menite să reducă emisiile de metan cu 24-50% înainte de 2050. În Noua Zeelandă, se estimează că producția de metan de la animale cuprinde până la jumătate din totalul emisiilor GES ale țării. Reducerea metanului este o componentă esențială a atingerii obiectivelor de emisii GES și reducerea efectelor încălzirii globale.

Eliberarea GES de către animale are, de asemenea, efecte adverse asupra productivității animalelor. Orice furaj care este convertit într-un compus care este ulterior expirat sau eliberat de animal este o sursă de energie care nu a fost convertită într-o utilizare productivă. În consecință, pentru eficiență, este importantă optimizarea conversiei furajelor în productivitate animală sub formă de creștere în greutate sau producția de lapte. Se menționează următorul stadiu tehnic în contextul prezentei invenții: WO 2020/245303 divulgă un bolus intraruminal cuprinzând un nutrient mineral dispersat într-o matrice erodabilă, unde nutrientul mineral este sub formă de chelat aminoacidic. EP2767289 divulgă un bolus care cuprinde un material de matrice și una sau mai multe substanțe benefice din punct de vedere biologic conținute în și/sau pe matrice. WO2020/113279 se referă la procese de preparare a compozițiilor de ulei de Asparagopsis, cuprinzând extragerea a cel puțin unui bioactiv dintr-o biomasă de Asparagopsis într-un ulei pentru formarea compozițiilor. GB2353707 divulgă un bolus erodabil, dizolvabil sau compozit, acoperit parțial sau complet cu un material insolubil sau puțin solubil în apă, care în uz este îndepărtat treptat din bolus prin erodare de către reticulum și conținutul său. WO95/19763 divulgă un bolus constând dintr-un miez care conține un liant, un agent de solubilizare, agentul benefic de eliberat și, atunci când este necesar, un densificator. EP0164241 divulgă un dispozitiv de eliberare a medicamentelor având un miez polimeric biodegradabil hidrolizabil în care este dizolvat sau suspendat un medicament benefic la administrare în tractul digestiv al animalului rumegător.

Obiectul invenției

Un obiectiv al prezentei invenții este prevederea unor dispozitive și metode îmbunătățite de furnizare a substanțelor la un animal, de ex. substanțe hidrofobe și/sau inhibitori ai metanului.

Un obiectiv al invenției este prevederea unor dispozitive și metode de reducere a emisiilor GES.

Un obiectiv al invenției este prevederea unor dispozitive și metode de îmbunătățire sau optimizare a productivității animalelor.

Alternativ, un obiectiv al invenției este prevederea unor dispozitive și metode de îmbunătățire a creșterilor productive ale animalelor de ex. prin reducerea producției metanului.

Un obiectiv al invenției este prevederea unei compoziții de reducere a emisiei GES de către unul sau mai multe animale de ex. un animal rumegător.

Un obiectiv al invenției este prevederea unor dispozitive și metode care pot elibera haloformi selectați din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora la diferite rate într-o perioadă de timp.

Alternativ, un obiectiv al invenției este prevederea unor metode de fabricare a dispozitivelor de furnizare a haloformilor selectați din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora la un animal de ex. pentru reducerea emisiei GES.

Alternativ, un obiectiv al invenției este eliminarea unora dintre dezavantajele din stadiul anterior.

Rezumatul invenției

Invenția este definită în setul de revendicări atașat.

Conform unui aspect al invenției, se prevede un bolus definit în revendicări configurat pentru administrare unui animal rumegător, unde bolusul este configurat să elibereze un haloform selectat din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora la animal într-o perioadă de timp.

Conform unei aplicări a invenției, bolusul este configurat să elibereze o cantitate eficientă dintr-un haloform selectat din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora.

Se divulgă în prezenta o metodă de reducere a emisiei de gaze (de preferință metan) de la un animal rumegător, metoda cuprinzând etapa de administrare la animalul rumegător a unui bolus cuprinzând cel puțin un agent inhibitor.

Conform unui alt aspect al invenției, se prevede o utilizare a unui inhibitor de metan și a unui vehicul într-un bolus pentru reducerea producției de metan într-un animal rumegător.

Conform unui alt aspect al invenției, se prevede o utilizare a unui inhibitor de metan și a unui vehicul într-un bolus pentru reducerea emisiei de metan de la un animal rumegător.

Se divulgă în prezenta o utilizare a unui haloform în prepararea unui bolus pentru reducerea emisiei unui sau mai multor gaze de seră ("GES") de la un animal rumegător.

Într-o aplicare preferată, bolusul poate fi configurat pentru administrare la un rumegător, care poate include vite sau vaci de lapte, oi, capre, bivoli, căprioare, elani, girafe sau cămile.

Într-o aplicare, bolusul poate fi adaptat pentru a reduce eliberarea unui sau mai multor gaze de seră ("GES") de la rumegător, inclusiv metan.

Într-o altă aplicare, bolusul poate fi un bolus cu eliberare lentă, configurat să elibereze respectivul cel puțin un agent inhibitor în animalul rumegător într-o perioadă de timp de ex. în rumenul animalului.

Într-un aspect, se prevede un bolus pentru administrare unui animal rumegător, unde bolusul conține:

un miez, unde miezul include cel puțin o substanță care se va administra animalului rumegător în amestec cu un vehicul; și

un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului;

unde bolusul este configurat să elibereze substanța prin înveliș într-o perioadă de timp, unde inhibitorul de metan este un haloform, haloformul fiind selectat din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora.

Într-o aplicare a bolusului din invenție, învelișul este format din cel puțin un acid polilactic (PLA).

Într-o aplicare a bolusului din invenție miezul cuprinde un amestec din cel puțin o ceară și un haloform.

Inventatorii au descoperit în mod surprinzător că tehnologia descrisă în prezenta poate asigura mai multe beneficii. Aceste beneficii pot fi rezultatul interacțiunilor sinergice unice dintre diferitele aspecte ale tehnologiei. Prin urmare, tehnologia din prezenta invenție este descrisă pe baza înțelegerii actuale de către inventatori a acestor interacțiuni. Se va înțelege că orice aspect descris în prezenta sau interacțiunea a două sau mai multe aspecte poate forma o invenție distinctă.

În cadrul prezentei specificații se va face referire la termenul "substanță" sau "substanță administrată unui animal". În contextul bolusului din invenție, aceasta se va înțelege ca însemnând un inhibitor de metan așa cum este definit în revendicări.

Utilizarea unui inhibitor de metan poate oferi o serie de avantaje. De exemplu, un inhibitor de metan va reduce sau elimina producția de metan de către rumegătoare, de ex. în rumen. Prin urmare, există mai puțin metan în rumen care ar putea fi emis de rumegătoare, reducând astfel în mod eficient emisiile GES.

În plus, reducerea producției de metan poate oferi beneficii în productivitatea animalelor. De exemplu, reducerea metanului asigură că o cantitate relativ mai mare de hrană ingerată este disponibilă pentru digestie și conversie în proteină (lapte sau carne). Astfel, fermierii pot îmbunătăți eficiența prin asigurarea unei productivități mai mari pentru un anumit volum de furaj sau prin reducerea furajelor în consecință.

Inhibitorul de metan este selectat din lista cuprinzând cloroform, bromoform, iodoform sau combinații ale acestora.

Într-o formă deosebit de preferată, haloformul poate fi bromoform (CHBr_3). Utilizarea bromoformului poate oferi o serie de avantaje. De exemplu, are o eficiență ridicată la o doză relativ mică, permițând unui dispozitiv să furnizeze cantități suficiente de agent inhibitor într-o perioadă extinsă de timp. În plus, bromoformul are de asemenea o densitate relativ mare care se adaugă la greutatea totală a bolusului și permite reținerea bolusului în rumen, adică se scufundă în partea ventrală a rumenului în loc să plutească, ceea ce poate reduce regurgitația.

Totuși, în ciuda acestor avantaje, inventatorii s-au confruntat cu numeroase provocări și probleme în dezvoltarea unui bolus pentru eliberarea controlată a unui haloform, în special bromoform, la un rumegător.

Bolusul din invenție cuprinde un miez.

Miezul include agentul inhibitor de metan amestecat cu un vehicul.

În unele aplicări, vehiculul poate avea o structură care susține sau facilitează afinitatea pentru vehicul de către agentul inhibitor. De exemplu, vehiculul poate avea grupe funcționale polare.

În unele aplicări, vehiculul poate fi o substanță relativ polară, de ex. are un % g/g relativ mare de grupe funcționale polare. Inventatorii au descoperit în mod surprinzător că vehiculul și agentul inhibitor pot interacționa unul cu celălalt, iar interacțiunea poate afecta viteza de eliberare a agentului inhibitor din bolus. Acest lucru va reieși mai clar din următoarea descriere.

Exemplele de grupe funcționale adecvate pentru vehicul sunt esteri, acizi grași, alcooli grași, carbonili și amine grase. Fără a se limita la un mecanism specific, inventatorii cred că agenții inhibitori pot interacționa cu grupele funcționale polare din ceară, posibil prin crearea legăturilor de hidrogen. Cantitatea de grupe funcționale polare prezente în vehicul va afecta afinitatea vehiculului și a agentului de inhibare unul pentru celălalt.

Inventatorii au descoperit că poate fi adecvată o gamă de substanțe pentru utilizare ca vehicul în prezenta invenție. De exemplu, vehiculul poate fi selectat din lista cuprinzând ceruri, acid miristic, acid stearic, alcool stearil, alcool cetilic, alcool cetostearilic sau o combinație a acestora.

Într-o aplicare deosebit de preferată, vehiculul poate fi o substanță ceroasă. De exemplu, vehiculul poate fi selectat din lista cuprinzând ceară de albine, parafină, PEG4000, Carnauba, ulei de ricin hidrogenat, Candellila, Jojoba sau lanolină sau o combinație a acestora.

Într-o aplicare deosebit de preferată, vehiculul poate conține parafină și ulei de ricin hidrogenat.

Într-o aplicare deosebit de preferată, vehiculul poate conține parafină și ulei de ricin hidrogenat într-un raport de circa 50:50 (părți de greutate).

Într-o altă aplicare, vehiculul poate conține un amestec de două sau mai multe componente. De exemplu, vehiculul poate conține un amestec din cel puțin o substanță relativ polară cu o substanță relativ nepolară. De exemplu, în unele forme, vehiculul poate include un amestec de parafină (un amestec de alcani fără grupe funcționale polare) și ulei de ricin hidrogenat și/sau ceară de carnauba (având o cantitate relativ mare de grupe funcționale polare). Prin urmare, polaritatea totală a vehiculului poate fi ajustată pentru a obține afinitatea dorită pentru agentul inhibitor. Aceasta se poate folosi pentru a obține o viteză de eliberare dorită a agentului inhibitor.

Pe lângă cele de mai sus, se pot utiliza ca vehicule și vehicule solide, cum ar fi cărbune activ sub formă de pulbere, zeolit sau bentonit. În consecință, discuția din prezenta nu se va interpreta ca limitând domeniul de aplicare al prezentei invenții.

Într-o altă aplicare, vehiculul poate include de asemenea una sau mai multe componente suplimentare. De exemplu, pot fi încorporate componente suplimentare, cum ar fi zinc sau oxid de zinc. De preferință, în vehicul poate fi cuprinsă o bucată de metal (de preferință oțel). Componentele suplimentare pot fi utilizate pentru a obține o densitate dorită pentru miez și/sau bolus.

Se va înțelege de asemenea că pot fi adăugate componente suplimentare într-o cavitate a bolusului separate de vehicul și nu amestecate cu acesta. Acest lucru poate fi deosebit de benefic pentru a forma un miez având un profil de eliberare dorit, unde densitatea bolusului poate fi ajustată la o cantitate dorită prin includerea componentelor suplimentare.

Alți aditivi adecvați pentru încorporare în vehicul pot include de asemenea dioxid de siliciu coloidal, cărbune, bentonit și zeolit.

Alte aspecte ale vehiculului și efectul acestuia asupra eliberării agentului inhibitor din bolus, împreună cu interacțiunea vehiculului și a învelișului, vor reieși mai clar din descrierea următoare.

Într-o aplicare preferată, vehiculul poate avea un punct de topire în mare măsură între 50-90°C.

Într-o aplicare deosebit de preferată, vehiculul are un punct de topire mai mic decât punctul de fierbere al agentului inhibitor. Acest lucru poate fi util deoarece vehiculul poate fi topit și amestecat cu agentul inhibitor fără pierdere substanțială de agent inhibitor din cauza evaporării.

Într-o aplicare preferată, miezul poate avea un punct de topire mai mare de 37°C.

Într-o aplicare deosebit de preferată, miezul poate avea un punct de topire mai mare de 40°C.

Punctul de topire al miezului poate fi benefic pentru funcția prezentei tehnologii în mai multe moduri. De exemplu, un punct de topire peste 37°C, mai preferabil 40°C, poate ajuta vehiculul la
5 stabilizarea agentului inhibitor când bolusul este în rumen. Acest lucru ar putea fi benefic pentru controlul eliberării agentului inhibitor, de ex. deplasarea agentului inhibitor prin materialul care formează învelișul.

Într-o aplicare, bolusul poate fi adaptat să atingă o rată de eliberare maximă de aproximativ 0.05 g până la 2 g de bromoform pe zi în rumen.

10 Într-o aplicare, bolusul poate fi adaptat să elibereze bromoform într-o cantitate între 0.02 g și 0.5 g pe zi în rumen.

Într-o aplicare deosebit de preferată, bolusul poate fi adaptat să atingă o rată de eliberare maximă de aproximativ 0.1 până la 0.5 g de bromoform pe zi în rumen.

Într-o aplicare preferată, bolusul este configurat să elibereze bromoform în cantitate între 0.02 g și 0.3 g pe zi în rumen.

15 Într-o aplicare a invenției, miezul bolusului poate conține haloformul, de preferință bromoform, într-o cantitate de 30% (din greutate) până la 80% (din greutate), de preferință într-o cantitate de 55% (din greutate) până la 75% (din greutate), mai preferabil într-o cantitate de 50% (din greutate).

Într-o aplicare deosebit de preferată, miezul cuprinde haloformul, de preferință bromoform, într-o concentrație de cel mult 55% (din greutate).

20 Inventatorii au descoperit că viteza de eliberare a agentului inhibitor în rumen crește în timp. Acesta poate fi rezultatul mai multor factori. Prin urmare, rata de eliberare începe de la zero la administrarea la animalul și crește până la un maxim. Totuși, cele de mai sus nu trebuie privite ca limitative, fiind avute în vedere și alte rate de eliberare în scopul prezentei invenții.

Bolusul din invenție include un înveliș.

25 În cadrul prezentei specificații, referirea la termenul "*înveliș*" ar trebui înțeleasă ca însemnând o structură care poate primi și susține un miez care conține cel puțin un agent inhibitor.

În aplicări preferate, învelișul cuprinde o carcasă având o cavitate în care este amplasat un miez.

Se va înțelege însă de asemenea că acest înveliș poate lua alte forme. De exemplu, învelișul poate include două sau mai multe cavități care pot primi și susține fiecare un miez separat.

30 Într-o aplicare, învelișul poate include un capăt deschis.

Bolusul poate fi utilizat cu un capăt deschis, de ex. administrat unui animal cu capătul deschis. În aceste aplicări, capătul deschis asigură o deschizătură pentru a expune conținutul miezului la fluidele din rumen.

35 Într-o altă aplicare preferată, învelișul poate acoperi și înconjura complet miezul, de ex. are o cavitate etanșă în care se află miezul.

De exemplu, bolusul poate include un înveliș cu o cavitate în care poate fi amplasată cel puțin o porțiune a miezului și un capăt deschis pentru a facilita introducerea miezului în cavitate. Se poate folosi un capac pentru a acoperi capătul deschis.

40 Capacul poate fi format separat de înveliș și prins de acesta detașabil sau permanent. Alternativ, capacul poate fi format integral cu învelișul.

Într-o altă aplicare, învelișul poate fi prevăzut în cel puțin două părți, fiecare dintre ele având o cavitate pentru a primi câte o porțiune a miezului. Împreună, aceste cel puțin două părți înconjoară complet miezul și definesc o cavitate închisă și etanșată în care se află miezul.

45 În alte aplicări, învelișul poate fi format în jurul miezului de ex. prin turnare. Alternativ, învelișul și capacul pot defini împreună o cavitate în mare măsură închisă și etanșată în care este amplasat miezul.

Inventatorii cred că prevederea unei cavități în mare măsură sau complet închise și etanșate este preferată deoarece poate ajuta la obținerea unei eliberări controlate dorite a agentului inhibitor din bolusul din prezenta invenție. De exemplu, într-o astfel de aplicare, agentul inhibitor poate trece prin materialul care formează învelișul, de ex. prin difuzie în masă.

50 În unele aplicări, învelișul poate fi configurat să aibă suficientă integritate structurală pentru a rămâne intact o perioadă de timp predeterminată.

Într-o aplicare preferată, învelișul poate fi configurat să se degradeze într-o perioadă de timp predeterminată.

55 În cadrul prezentei specificații, referirea la termenul "*perioadă de timp predeterminată*" se va înțelege ca însemnând perioada de timp în care agentul inhibitor se va elibera în animal.

Într-o aplicare deosebit de preferată, perioada de timp predeterminată poate fi cel puțin două luni, de preferință șase luni, mai preferabil 12 luni.

Inventatorii au descoperit în mod surprinzător că respectivele învelișuri din prezenta invenție pot ajuta la eliberarea controlată a agentului inhibitor. De exemplu, învelișul poate rezista la condițiile din

rumen pe perioada de timp predeterminată. În acest timp, învelișul protejează miezul de fluidul din rumen, dar poate facilita sau contribui la eliberarea controlată a agentului inhibitor. Cu toate acestea, proiectarea învelișului poate permite dezintegrarea sau degradarea învelișului pe perioada de timp predeterminată. Acest lucru poate contribui la atenuarea efectelor adverse ale administrării dispozitivului la un animal și ar putea, de asemenea, să asigure că un animal poate fi tratat cu bolusuri multiple, de ex. un al doilea bolus se administrează la sau spre sau după sfârșitul perioadei de timp predeterminate.

În unele aplicări ale invenției, grosimea învelișului poate fi selectată astfel încât să contribuie la rata de eliberare a agentului inhibitor. De exemplu, inventatorii au identificat că grosimea învelișului poate afecta rata de eliberare a agentului inhibitor din bolus. În aceste aplicări, un înveliș relativ mai gros va avea o rată de eliberare relativ mai lentă decât un înveliș relativ mai subțire.

Într-o aplicare preferată, învelișul poate avea o grosime de cel puțin 1 mm.

Într-o altă aplicare preferată, învelișul poate avea o grosime mai mică de 3 mm.

Într-o altă aplicare preferată, învelișul poate avea o grosime între 1.5 și 2 mm sau între 0.5 și 2 mm.

Într-o aplicare deosebit de preferată, învelișul are o grosime de 1 mm.

Grosimea învelișului poate fi deosebit de importantă pentru a obține o eliberare controlată dorită pentru agentul inhibitor în aplicări precum cele în care miezul este încapsulat în întregime de înveliș. Acest lucru va reieși mai clar din următoarea discuție.

Într-o aplicare, dimensiunile cavității pot varia pe lungimea învelișului.

Într-o aplicare preferată, cavitatea include cel puțin două regiuni care au o secțiune transversală diferită între ele, de ex. o primă regiune având o primă suprafață în secțiune transversală și o a doua regiune având o a doua suprafață în secțiune transversală.

Într-o aplicare deosebit de preferată, prima regiune are o suprafață în secțiune transversală relativ mai mică și a doua regiune are o suprafață în secțiune transversală relativ mai mare.

Într-o altă aplicare preferată, prima regiune poate fi situat mai aproape de capătul deschis decât a doua regiune.

O cavitate cu regiuni având suprafețe în secțiune transversală diferite poate facilita o eliberare mai controlată a agentului inhibitor pentru a răspunde mai bine cerințelor unui animal. De exemplu, o suprafață în secțiune transversală relativ mai mică poate fi prevăzută mai aproape de capătul deschis pentru a furniza o doză relativ mai mică de agent inhibitor, în timp ce suprafața în secțiune transversală relativ mai mare poate fi prevăzută mai aproape de capătul distal; aceasta poate fi utilă când doza de agent inhibitor trebuie să crească în timp de ex. ca urmare a creșterii animalului.

De asemenea, se va înțelege că poate fi prevăzută și configurația inversă, de ex. suprafața în secțiune transversală relativ mai mare este prevăzută mai aproape de capătul deschis și suprafața în secțiune transversală relativ mai mică poate fi prevăzută mai aproape de capătul distal. Această configurație poate fi utilă atunci când se dorește o doză inițial mai mare de agent inhibitor, urmată de o doză mai mică la un moment ulterior. De exemplu, această configurație poate fi utilizată atunci când un animal are o cerere mare de agent inhibitor, de ex. în perioadele de consum de hrană și cerințe energetice relativ ridicate, cum ar fi în timpul lactației, dar care sunt urmate de o perioadă de aport de hrană relativ scăzut, de ex. în timpul perioadei de repaus mamar.

În plus, se va înțelege că suprafața în secțiune transversală a cavității poate crește treptat și continuu de la prima regiune la a doua regiune, de ex. nu există o "treaptă" definită între prima regiune și a doua regiune.

În alte aplicări, învelișul poate include o a treia regiune având o a treia suprafață în secțiune transversală. Aceasta poate fi utilizată suplimentar pentru a controla doza de agent inhibitor la animal. În consecință, cele de mai sus nu se vor interpreta ca limitând domeniul de aplicare al tehnologiei din prezenta.

Într-o aplicare, grosimea unui perete al învelișului poate varia pe lungimea învelișului. Într-o astfel de aplicare, grosimea peretelui la sau spre un capăt al învelișului poate fi mai mare decât la capătul distal. De exemplu, grosimea peretelui la sau spre capătul deschis poate fi mai mică decât cea a capătului distal.

Această configurație poate fi deosebit de benefică pentru a ajuta la controlul eliberării agentului inhibitor în timp. De exemplu, pereții relativ mai subțiri se vor degrada relativ mai repede decât pereții relativ mai groși. Această structură poate fi utilizată pentru a controla rata de degradare a învelișului pe lungimea sa. De exemplu, poate fi utilizată pentru a asigura că capătul deschis este singurul loc în care fluidele din rumen pot intra în contact cu miezul și îl pot eroda.

În aplicări preferate, învelișul poate fi realizat dintr-un material prin care agentul inhibitor poate migra în uz de ex. printr-un proces de difuzie în masă.

Într-o aplicare preferată, învelișul poate fi realizat din cel puțin un material plastic. De exemplu, învelișul poate fi realizat dintr-un plastic degradabil sau un material care se degradează în timp în rumen.

Într-o aplicare deosebit de preferată, învelișul poate fi realizat dintr-un material selectat din lista cuprinzând unul sau mai mulți dintre acid poli lactic (PLA), acid poli glicolic (PGA), acid poli lactic glicolic (PLGA), polipropilenă, policaprolactona (PCL), acid poli(d-lactic) (PDLA), polibutilen succinat (PBS), polibutilen adipat tereftalat (PBAT), polimer SLA, ABS sau o combinație a acestora. Într-o aplicare deosebit de preferată, învelișul cuprinde PLA și PBS.

Materialul pentru înveliș poate cuprinde PLA, PBAT și/sau PBS în diferite raporturi, așa cum se indică în exemplele 1 - 7 în tabelul de mai jos (% din greutate):

	PLA (% g) PBS	PBS (% g)	PBAT (% g)
1	100		
2	70	30	
3	40	60	
4	20	80	
5	70		30
6	40		60
7	20		80

Într-o aplicare deosebit de preferată, materialul pentru înveliș cuprinde PLA și PBS într-un raport de greutate de la 100:0 la 40:60 PLA:PBS.

Într-o aplicare deosebit de preferată, învelișul cuprinde PLA și PBS într-un raport de greutate de la 100:0 la 40:60 PLA:PBS, unde învelișul are o grosime între 0,4 și 1,5 mm.

Într-o altă aplicare, miezul bolusului din invenție este acoperit de mai multe învelișuri dispuse concentric (de ex. similar unei cepe). Aceste învelișuri multiple (de ex. 2 sau 3 sau chiar mai multe învelișuri) au avantajul că bolusul se va degrada (de ex. prin abraziune) în rumen mai puțin rapid. În consecință, haloformul din miez va dura mai mult în rumen și producția de metan este redusă un timp mai îndelungat. În aplicările cuprinzând mai multe învelișuri, materialul și grosimea învelișurilor pot fi așa cum s-a descris în prezenta pentru alte aplicări. În aplicări preferate, un bolus din invenție cuprinde cel puțin două straturi de înveliș, un înveliș exterior și un înveliș interior, materialul fiecărui înveliș cuprinzând un polimer biodegradabil și de preferință un polimer biodegradabil selectat din grupul constând din acid polilactic (PLA), polibutilen succinat (PBS), polibutilen adipat tereftalat (PBAT) și combinații ale acestora.

În plus, învelișul poate fi realizat de asemenea dintr-un material nebiodegradabil, cum ar fi EVA, siliconi, acilați etc. Prin urmare, discuția din prezenta nu se va considera ca limitând domeniul de aplicare al prezentei invenții.

În plus, materialul din care este realizat învelișul poate include unul sau mai mulți alți compuși de ex. plastifianți, agenți de întărire, coloranți etc.

Totuși, în aplicări alternative, învelișul poate fi realizat din unul sau mai multe materiale neadsorbante, adică un material în care sau prin care agentul inhibitor nu migrează. Utilizarea unui material neabsorbant pentru înveliș poate ajuta la controlul vitezei de eliberare a agentului inhibitor în anumite aplicări, cum ar fi un bolus cu capăt deschis. De exemplu, în aceste aplicări, concentrația agentului inhibitor în miez nu este scăzută prin absorbție în materialul învelișului.

În unele aplicări, bolusul poate include un strat protector. În aceste aplicări, stratul protector poate fi poziționat între cel puțin o porțiune a miezului și înveliș. De exemplu, stratul protector poate minimiza sau preveni complet contactul dintre porțiunea miezului și înveliș. Acest lucru poate fi util pentru a preveni dizolvarea agentului inhibitor (sau a altor compuși) pentru a controla mai bine eliberarea agentului inhibitor și pentru a îmbunătăți stabilitatea dispozitivului. Acest lucru ar putea fi deosebit de util în cazul în care agentul inhibitor are o solubilitate ridicată în materialul din care este realizat învelișul.

Alternativ, într-o aplicare în care stratul protector este prevăzut numai între o porțiune a miezului și înveliș, acesta poate reduce, dar nu previne complet, migrarea agentului inhibitor în înveliș. Stratul protector reduce suprafața de contact dintre miez și înveliș și, prin urmare, poate reduce viteza de eliberare a agentului inhibitor comparativ cu cazul în care stratul de barieră nu este prevăzut.

Alternativ, bolusul poate să nu includă un strat protector. Această configurație poate fi utilă atunci când agentul inhibitor are o solubilitate relativ scăzută în materialul din care este construit învelișul. De asemenea, poate fi utilă când compoziția învelișului și/sau vehiculului sunt selectate pentru a controla viteza de eliberare, de ex. viteza de difuzie a agentului inhibitor prin înveliș.

Într-o altă aplicare, bolusul poate fi adaptat pentru a avea viteze de dizolvare a miezului și învelișului care asigură o dizolvare în mare măsură uniformă a ambelor componente în rumen în timp.

Într-o aplicare, cavitatea din înveliș poate forma un rezervor configurat să primească o cantitate de agent inhibitor. De exemplu, rezervorul poate fi o cavitate închisă în înveliș care poate primi și reține cantitatea de agent inhibitor.

Într-o aplicare, bolusul poate include un mecanism de distribuire.

Într-o aplicare, vehiculul poate avea o afinitate relativ mai mare pentru agentul inhibitor comparativ cu afinitatea corpului pentru agentul inhibitor. Așa cum se discută în altă parte în prezentul document, aceasta se poate obține prin polaritatea relativă a substanțelor care formează vehiculul și compatibilitatea adecvată a acestor materiale cu agentul inhibitor.

Într-o altă aplicare, învelișul poate fi format dintr-o substanță având o duritate Shore D de cel puțin 40. Într-o astfel de aplicare, se crede că un înveliș cu o duritate Shore D mai mică, de 40, are ca rezultat un bolus prea moale, ceea ce ar putea împiedica administrarea bolusului la un animal sau altfel ar fi deteriorat sau degradat prematur înaintea administrării întregii cantități de agent inhibitor.

Într-o altă aplicare, învelișul poate fi format dintr-o substanță având o duritate Shore D mai mică de 80.

Într-o altă aplicare, învelișul poate fi configurat să faciliteze eliberarea controlată a agentului inhibitor din miez. Fără limitare la un mecanism specific, inventatorii cred că agentul inhibitor poate fi eliberat prin înveliș prin mecanismul de difuzie în masă.

Într-o altă aplicare, invenția prevede un bolus pentru administrare unui animal rumegător, bolusul cuprinzând:

un miez, unde miezul cuprinde un haloform definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde bolusul este configurat să elibereze haloformul.

Într-o altă aplicare, invenția prevede un bolus definit în revendicări pentru administrare unui animal rumegător, bolusul cuprinzând:

un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau întregul miez; unde bolusul este configurat să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora.

Într-o altă aplicare, invenția prevede un bolus pentru administrare unui animal rumegător, bolusul cuprinzând:

un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde bolusul este configurat să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde învelișul cuprinde un polimer biodegradabil și de preferință un polimer biodegradabil selectat din grupul constând din acid polilactic (PLA), polibutilen succinat (PBS), polibutilen adipat tereftalat (PBAT) și combinații ale acestora.

Într-o altă aplicare, invenția prevede un bolus pentru administrare unui animal rumegător, bolusul cuprinzând:

un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde bolusul este configurat să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde învelișul are o grosime a stratului între 0,4 și 1.5 mm.

Într-o altă aplicare, invenția prevede un bolus pentru administrare unui animal rumegător, bolusul cuprinzând:

un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde bolusul este configurat să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde învelișul cuprinde un polimer biodegradabil și de preferință un polimer biodegradabil selectat din grupul constând din acid polilactic (PLA), polibutilen succinat (PBS), polibutilen adipat tereftalat (PBAT) și combinații ale acestora; și unde învelișul are o grosime a stratului între 0,4 și 1.5 mm.

Într-o altă aplicare, invenția prevede un bolus pentru administrare unui animal rumegător, bolusul cuprinzând:

un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde bolusul este configurat să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință

ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde învelișul cuprinde un polimer biodegradabil și de preferință un polimer biodegradabil selectat din grupul constând din acid polilactic (PLA), polibutilen succinat (PBS), polibutilen adipat tereftalat (PBAT) și combinații ale acestora; și unde învelișul are o grosime a stratului mai mică de 2 mm.

5 Într-o altă aplicare, invenția prevede un bolus pentru administrare unui animal rumegător, bolusul cuprinzând:

un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau întregul miez; unde bolusul este configurat să elibereze haloformul;

10 și unde miezul mai cuprinde cel puțin o bucată de metal (cum ar fi pelete metalice și/sau o tijă de metal), de preferință metalul fiind oțel sau zinc. Avantajul acestei aplicări este că densitatea bolusului crește și este mai puțin probabil ca bolusul să fie regurgitat de animal. De preferință bolusul din invenție mai cuprinde un densificator și de preferință densificatorul cuprinde cel puțin o bucată de metal, de preferință densificatorul este prevăzut în miez.

15 Într-o altă aplicare, invenția prevede un bolus pentru administrare unui animal rumegător, bolusul cuprinzând:

un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde bolusul este configurat să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință

20 ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde învelișul cuprinde acid polilactic (PLA); și unde învelișul are de preferință o grosime a stratului mai mică de 2 mm. Într-un alt aspect, bolusul din invenție este o formă de dozaj cu eliberare întârziată pentru administrare unui animal rumegător, unde forma de dozaj cu eliberare întârziată cuprinde: un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform); și un strat de acoperire care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde forma de dozaj cu eliberare întârziată este configurată să elibereze haloformul.

25 Într-o altă aplicare, bolusul din invenție este o formă de dozaj cu eliberare întârziată pentru administrare unui animal rumegător, unde forma de dozaj cu eliberare întârziată cuprinde: un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform); și un strat de acoperire care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde forma de dozaj cu eliberare întârziată este configurată să elibereze haloformul; și unde miezul mai cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora.

30 Într-o altă aplicare, bolusul din invenție este o formă de dozaj cu eliberare întârziată pentru administrare unui animal rumegător, unde forma de dozaj cu eliberare întârziată cuprinde: un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un strat de acoperire care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde forma de dozaj cu eliberare întârziată este configurată să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde stratul de acoperire cuprinde un polimer biodegradabil și de preferință un polimer biodegradabil selectat din grupul constând din acid polilactic (PLA), polibutilen succinat (PBS), polibutilen adipat tereftalat (PBAT) și combinații ale acestora.

35 Într-o altă aplicare, bolusul din invenție este o formă de dozaj cu eliberare întârziată pentru administrare unui animal rumegător, unde forma de dozaj cu eliberare întârziată cuprinde: un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un strat de acoperire care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde forma de dozaj cu eliberare întârziată este configurată să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde stratul de acoperire are o grosime a stratului între 0,4 și 1.5 mm.

40 Într-o altă aplicare, bolusul din invenție este o formă de dozaj cu eliberare întârziată pentru administrare unui animal rumegător, unde forma de dozaj cu eliberare întârziată cuprinde: un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un strat de acoperire care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde forma de dozaj cu eliberare întârziată este configurată să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde stratul de acoperire cuprinde un polimer biodegradabil și de preferință un polimer biodegradabil selectat din grupul constând din acid polilactic (PLA), polibutilen succinat (PBS), polibutilen adipat tereftalat (PBAT) și combinații ale acestora; și unde stratul de acoperire are o grosime a stratului între 0,4 și 1.5 mm.

50 Într-o altă aplicare, bolusul din invenție este o formă de dozaj cu eliberare întârziată pentru administrare unui animal rumegător, unde forma de dozaj cu eliberare întârziată cuprinde: un miez, unde

miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un strat de acoperire care acoperă cel puțin o porțiune a miezului sau de preferință întregul miez; unde forma de dozaj cu eliberare întârziată este configurată să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde stratul de acoperire cuprinde un polimer biodegradabil și de preferință un polimer biodegradabil selectat din grupul constând din acid polilactic (PLA), polibutilen succinat (PBS), polibutilen adipat tereftalat (PBAT) și combinații ale acestora; și unde stratul de acoperire are o grosime a stratului mai mică de 2 mm.

Într-o altă aplicare, bolusul din invenție este o formă de dozaj cu eliberare întârziată pentru administrare unui animal rumegător, unde forma de dozaj cu eliberare întârziată cuprinde: un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un strat de acoperire care acoperă miezul; unde forma de dozaj cu eliberare întârziată este configurată să elibereze haloformul; și unde miezul mai cuprinde cel puțin o bucată de metal (cum ar fi pelete metalice și/sau o tijă de metal), de preferință metalul fiind oțel sau zinc. Un avantaj al acestei aplicări este că densitatea forme de dozaj cu eliberare întârziată crește și este mai puțin probabil ca forma de dozaj cu eliberare întârziată să fie regurgitată de animal.

Într-o altă aplicare, bolusul din invenție este o formă de dozaj cu eliberare întârziată pentru administrare unui animal rumegător, unde forma de dozaj cu eliberare întârziată cuprinde: un miez, unde miezul cuprinde un inhibitor de metan definit în revendicări (de preferință bromoform) amestecat cu un vehicul; și un strat de acoperire care acoperă o porțiune a miezului sau întregul miez; unde forma de dozaj cu eliberare întârziată este configurată să elibereze haloformul; și unde vehiculul cuprinde ceară, de preferință ulei de ricin hidrogenat, parafină sau un amestec al acestora; și unde stratul de acoperire cuprinde acid polilactic (PLA); și unde stratul de acoperire are de preferință o grosime a stratului mai mică de 2 mm. Experimentele au arătat că grosimea stratului mai mică de 2 mm este preferabilă fiindcă această grosime lasă haloformul să pătrundă din materialul miezului spre exterior la o viteză optimă.

Într-o formă de dozaj cu eliberare întârziată sau un bolus din invenție, de preferință mai puțin de 50% din haloformul conținut în miez este eliberat într-o perioadă de trei luni. Într-o aplicare preferată a forme de dozaj cu eliberare întârziată sau a unui bolus din invenție, miezul cuprinde cel puțin 100 grame de haloform. Miezul bolusului sau forme de dozaj cu eliberare întârziată din invenție conține de preferință între 30% g și 70% g haloform (de preferință bromoform).

Se înțelege că eliberarea controlată a agentului inhibitor prin înveliș poate fi influențată de mai mulți factori. De exemplu, afinitatea agentului inhibitor pentru vehicul poate avea un rol în difuzia agentului inhibitor prin înveliș. Se înțelege că vehiculele mai polare sau vehiculele care conțin un grad ridicat de grupe funcționale polare va avea o afinitate mai mare cu agentul inhibitor decât vehiculele mai puțin polare sau vehiculele cu un grad mai scăzut de grupe funcționale.

Afinitatea relativă a materialelor care formează învelișul și miezul pentru agentul inhibitor poate afecta de asemenea eliberarea controlată a agentului inhibitor din miez. De exemplu, un înveliș cu o afinitate relativ mai mică pentru agentul inhibitor comparativ cu afinitatea vehiculului pentru agentul inhibitor ar putea fi un factor în controlul ratei de eliberare a agentului inhibitor din miez. Aceste aspecte ale invenției vor reieși mai clar din descrierea din prezenta.

În cadrul prezentei specificații, referirea la termenul "*mecanism de eliberare*" se va înțelege ca însemnând o configurație de eliberare a unei cantități predeterminate de agent inhibitor în timp. De exemplu, mecanismul de eliberare poate cuprinde o configurație cu supapă care poate elibera o cantitate de agent inhibitor printr-o ieșire. Alternativ, mecanismul de eliberare poate fi un mecanism tip seringă având un piston și un dispozitiv de acționare; în timp, dispozitivul de acționare deplasează pistonul în rezervor pentru a evacua agentul inhibitor din rezervor.

Alte aplicări vor fi evidente specialiștilor în domeniu la lecturarea următoarei descrieri care prezintă cel puțin un exemplu al unei aplicări practice a invenției.

Scurtă descriere a desenelor

Se vor descrie mai jos exclusiv exemplificativ și nelimitativ una sau mai multe aplicări ale invenției în legătură cu desenele următoare, în care:

Figura 1A este o vedere frontală a unui bolus conform unui aspect al invenției.

Figura 1B este o vedere în secțiune transversală în perspectivă a bolusului din Figura 1A.

Figura 2A este o vedere frontală a unei aplicări alternative a unui bolus conform unui alt aspect al invenției.

Figura 2B este o vedere în secțiune transversală în perspectivă a bolusului din Figura 2A.

Figura 3A este o vedere frontală a unei aplicări alternative a unui bolus conform unui alt aspect al invenției.

Figura 3B este o vedere în secțiune transversală în perspectivă a bolusului din Figura 3A.

Figura 4A este o vedere frontală a unei aplicări alternative a unui bolus conform unui alt aspect al invenției.

Figura 4B este o vedere în secțiune transversală în perspectivă a bolusului din Figura 4A.

Figura 5 este o vedere frontală a unei aplicări alternative a unui bolus conform unui alt aspect al invenției.

Figura 6A este o vedere frontală în secțiune transversală a unei aplicări alternative a unui bolus conform unui alt aspect al invenției.

5 **Figura 6B** este o vedere în secțiune transversală în perspectivă a bolusului din Figura 6A.

Figura 7 este o schemă de flux care indică etape reprezentative într-o metodă de preparare a unui bolus conform unui aspect al invenției.

Figura 8 este un grafic care indică difuzia/viteza de eliberare zilnică a bromoformului din bolus în mediu.

Figura 9 este un grafic care indică variabilitatea rezultatelor difuziei.

10 **Figura 10** este un grafic indicând concentrația bromoformului într-un mediu de difuzie în timp.

Figura 11 este un grafic care indică masa bromoformului eliberat (%) în timp.

Figura 12 este un grafic care indică vitezele de eliberare a bromoformului din diferite vehicule în tuburi falcon deschise la capăt.

Figura 13A este un grafic care indică viteza de eliberare a bromoformului din parafină ca vehicul.

15 **Figura 13B** este un grafic care indică viteza de eliberare a bromoformului din ceară de carnauba ca vehicul.

Figura 13C este un grafic care indică viteza de eliberare a bromoformului din ceară de albine ca vehicul.

Figura 14 este un grafic care indică viteza de eliberare medie a bromoformului dintr-un bolus rigidizat conform unei aplicări a prezentei invenții.

20 **Figura 15A** este o vedere laterală care indică o proiectare a unui bolus rigidizat conform unei aplicări alternative a prezentei invenții.

Figura 15B este o vedere laterală în secțiune transversală a unei proiectări a unui bolus rigidizat conform unei aplicări alternative a prezentei invenții.

Figura 15C este o vedere laterală în secțiune transversală a unei proiectări a unui bolus rigidizat conform unei aplicări alternative a prezentei invenții.

25 **Figura 15D** este o vedere în secțiune transversală a structurii interne a unei proiectări a unui bolus rigidizat conform unei aplicări alternative a prezentei invenții.

Figura 16A reprezintă contracția specimenului de tracțiune din turnarea prin injecție.

Figura 16B indică bromoformul absorbit vs compoziția bromoformului în ceară de albine pentru compoziții diferite ale PLA amestecat cu PBS și PBAT.

30 **Figura 16C** indică bromoformul absorbit vs compoziția bromoformului în ceară de albine pentru PLA imprimat 3D și 2003D PLA turnat prin injecție.

Figura 16D indică rata de absorbție a bromoformului vs compoziția bromoformului în ceară de albine pentru compoziții diferite ale PLA amestecat cu PBS și PBAT.

35 **Figura 16E** indică rata de absorbție a bromoformului vs compoziția PLA în ceară de albine cu diferite concentrații ale bromoformului.

Figura 17 indică analiza de duritate a amestecurilor PLA înainte și după expunere la bromoform.

Figura 18A indică eliberarea bromoformului din bolusuri cu grosime de 1 mm încărcate cu bromoform 67% (din greutate) (albastru) și 55% (din greutate) (portocaliu).

Figura 18B indică eliberarea cumulativă a bromoformului din bolusuri.

40 **Figura 18C** indică graficul cumulativ la 7, 8 și 9 zile pentru bolus de 57-1 mm.

Figura 18D indică viteza de eliberare din diferite bolusuri.

Termenul "bromet" folosit în figuri se referă la un bolus care conține bromoform.

Scurtă descriere a aplicărilor preferate ale invenției

45 Prezenta invenție se referă la un bolus pentru furnizarea unui inhibitor de metan selectat din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora. Prezenta invenție este exemplificată în legătură cu o aplicare preferată. Aceasta nu se va interpreta însă ca limitând domeniul de aplicare al invenției. Un specialist în domeniu va înțelege modul de aplicare a specificațiilor din prezenta la dispozitive de furnizare a altor substanțe la animale.

50 În legătură mai întâi cu Figurile 1A și 1B, se prevede un bolus (100). Bolusul (100) este configurat să reducă sau să elimine eliberarea unuia sau mai multor gaze de seră ("GES") de la un animal rumegător. De exemplu, bolusul (100) poate reduce sau elimina producția GES de către animalul rumegător, reducând astfel gazele eliberate de animal.

În plus sau alternativ, bolusul (100) poate îmbunătăți productivitatea animalelor prin prevenirea conversiei hranei în unul sau mai multe GES de la un animal rumegător.

55 Bolusul (100) include un miez (110) și un înveliș (120).

În unele aplicări, bolusul (100) include și un strat protector (130). Stratul protector (130) este configurat să separe miezul (110) de înveliș (120).

Învelișul (120) este în general cilindric și are un capăt deschis indicat în general ca (60) și un capăt închis, rotunjit (170). Capătul deschis (160) poate permite contactul fluidelor din rumenul animalului rumegător cu miezul (110).

Alte aspecte ale bolusului (100) vor reieși mai clar din discuția următoare.

5 **Miez**

Miezul (110) include cel puțin un agent inhibitor, care poate fi opțional amestecat cu un vehicul adecvat. Vehiculele preferate în mod special includ PEG4000, PEG400, ceruri naturale și sintetice, acizi grași, alcoolii grași, amine grase, fosfolipide-lecitină și adsorbanți și combinații ale acestora.

10 Cerurile adecvate includ ceară de albine, parafină, ulei de ricin hidrogenat, ceară de carnauba, ceară Candellila, ceară Jojoba și lanolină.

În plus, se pot amesteca în mod adecvat cu agentul inhibitor minerale precum zeolit, bentonit, caolin, cărbune activat sau o combinație a acestora. este posibilă de asemenea includerea altor compuși cum ar fi zinc (i.e. în formă pulverulentă) sau oxid de zinc.

15 Alternativ, miezul (110) poate include o formă concentrată (în mare măsură pură) a agentului inhibitor.

Agentul inhibitor este un agent inhibitor de metan selectat din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora. Formele preferate în mod special includ bromoform (CHBr_3) - așa cum se discută detaliat mai jos.

20 Specialiștii în domeniu vor înțelege că se pot selecta sau folosi alte vehicule în funcție de aplicație. Se are în vedere că anumite vehicule pot fi selectate pentru a asigura un profil de eliberare dorit pentru agentul inhibitor sau, alternativ, pentru a asigura proprietățile fizice dorite ale materialului miezului - densitate sau volum etc.

În aplicări preferate, vehiculul folosit în prezenta invenție este o substanță ceroasă naturală, cu un punct de topire preferat între 50-90°C, mai preferabil 60-80°C.

25 Inventatorii au descoperit că un vehicul cu acest interval al punctului de topire a permis topirea vehiculului și amestecarea cu agentul inhibitor, formând un miez omogen (110) și ulterior solidificarea la temperatura camerei.

30 Un vehicul preferat în mod special este un amestec conținând ulei de ricin hidrogenat cu una sau mai multe dintre parafină, ceară de albine și ceară de carnauba. De preferință, vehiculul este un amestec conținând ulei de ricin hidrogenat și parafină.

Se va înțelege că raportul dintre vehicul și agentul inhibitor poate fi selectat pentru a optimiza funcția bolusului (100) de ex. conform profilului de eliberare dorit pentru agentul inhibitor.

35 După formare, miezul (cuprinzând vehicul și agent inhibitor) are de preferință un punct de topire de cel puțin 45°C. Acest punct de topire minim va ajuta să se asigure că miezul (110) nu se topește la administrarea bolusului (100) la animalul rumegător. În plus, va ajuta să se asigure că este improbabil ca bolusul (100) să se topească la expunerea accidentală la temperaturi ridicate, de ex. temperaturi care pot fi întâlnite în mod rezonabil în timpul transportului și/sau depozitării.

Se va înțelege că intervalul punctelor de topire pentru miez (110) poate fi adaptat variind raportul dintre agentul inhibitor și vehiculul care formează miezul (110).

40 Un raport preferat dintre agentul inhibitor și vehicul poate include în mare măsură 80:20% g/g până la în mare măsură 50:50% g/g sau de preferință în mare măsură 70:30% g/g până la în mare măsură 60:40 w/w % sau, mai preferabil, în mare măsură 66:33% g/g.

Agent inhibitor

45 Agentul inhibitor este unul sau mai mulți compuși de inhibare a metanului selectați din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora.

Inhibitorii de metan sunt selectați din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora.

50 Inventatorii au descoperit în mod surprinzător că bromoformul este deosebit de bine adecvat pentru utilizare într-un bolus (100) conform prezentei invenții. Prin urmare se va face referire în prezenta la agentul inhibitor ca bromoform. Totuși, acesta nu va fi interpretat ca limitând domeniul de aplicare al prezentei invenții, fiind posibile și alternative care fac parte din domeniul de aplicare al prezentei invenții.

55 Bromoformul este reactiv și are un timp de înjumătățire scurt la animale (0.8 ore la șobolani, 1.2 ore la șoareci, Dep. de Sănătate SUA, 2003). Este lichid la temperatura camerei și este mai dens decât apa. Testele anterioare au demonstrat că nu există reziduuri în carnea și țesutul tăurașilor sacrificați după o perioadă de 48 de ore (Kinley et al. Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed, Journal of Cleaner Production 259 (2020) 120836) și nu există o creștere semnificativă a nivelului de lapte (Roque et al. Inclusion of Asparagopsis armata in lactating dairy cows' diet reduces enteric metan emission by over 50 percent; Journal of Cleaner Production 234 (2019) 132-138).

Bromoformul are o eficiență relativ mare de ex. efect per doză administrată. Acest lucru permite furnizarea unor cantități suficiente într-un miez (110) pentru prepararea unui bolus (100) care poate asigura eliberarea controlată a agentului inhibitor într-o perioadă prelungită.

În plus, bromoformul are o densitate relativ mare. aceasta poate ajuta la obținerea unei rețineri mai mari a bolusului (100) în rumen, densitatea bolusului putând fi optimizată pentru a susține scufundarea bolusului (100) în partea ventrală a rumenului în loc de plutire.

În ciuda punctelor de mai sus, există o îngrijorare predominantă privind utilizarea bromoformului la animale. Se crede că acest compus are efecte adverse cum ar fi faptul că este carcinogenic la anumite niveluri de expunere.

În plus, există dificultăți tehnice la administrarea bromoformului la animale. Acestea includ volatilitatea substanței și capacitatea sa de a dizolva substanțe care ar putea fi folosite pentru furnizarea sa. În plus, este dificilă obținerea unei doze exacte (și relativ mici) într-o perioadă de timp.

Înveliș

Învelișul (120) include o cavitate (nenumărată în figuri) dimensionată astfel încât să primească miezul (110). Învelișul (120) formează structura externă a bolusului (100).

Învelișul (120) este configurat să asigure integritatea structurală a bolusului (100), dar este adaptat și să se degradeze în timp. Degradarea învelișului (120) poate facilita eliberarea agentului inhibitor în perioada de timp predeterminată.

Învelișul (120) este de preferință netoxic și rezistă la eroziunea în rumenul rumegătorului o perioadă de timp suficientă pentru a facilita eliberarea agentului inhibitor din miez (110) la viteza dorită. Specialiștii în domeniu vor înțelege că viteza de dizolvare a învelișului (120) și miezului (110) poate fi configurată să permită eliberarea controlată a agentului inhibitor în rumenul animalului rumegător.

De preferință, învelișul (120) este alcătuit dintr-un material biodegradabil, neabsorbant, sau un material altfel compatibil cu eliminarea deșeurilor în abatoare. Se va înțelege că în prezenta invenție se poate folosi orice material adecvat pentru administrare internă la un animal rumegător cu vitezele de dizolvare dorite.

Într-o aplicare preferată, învelișul (120) este selectat de preferință dintr-un material biodegradabil, materialele biodegradabile preferate în mod special incluzând polimeri precum acid polilactic (PLA), acid poliglicolic (PGA), acid polilactic glicolic (PLGA), polipropilenă, polimer SLA, ABS și combinații ale acestora. Într-o aplicare deosebit de preferată, învelișul (120) este realizat dintr-un material cuprinzând PLA și PBAT.

Într-o aplicare preferată învelișul (120) este alcătuit din PLA. PLA este disponibil în trei forme, D-, L- și un amestec racemic de D și L. Toate cele trei tipuri de PLA se pot utiliza în învelișul (120) unui bolus din prezenta invenție.

Într-o formă preferată, se preferă PLA, fiindcă se degradează în acid lactic și se utilizează de obicei ca implant medical. În funcție de tipul PLA folosit, PLA se descompune în corp în șase luni până la doi ani.

Specialiștii în domeniu vor înțelege că se pot folosi alte materiale biodegradabile ca înveliș (120).

Într-o aplicare opțională, în bolusul din prezenta invenție se pot include alți agenți de umplură, lianți, surfactanți, agenți activi și/sau absorbanti.

După cum se poate vedea în figurile 1A și 1B, bolusul (100) are o formă în mare măsură cilindrică. Învelișul (120) include o suprafață externă netedă pentru a ajuta la ingerarea bolusului (100) de către animalul rumegător.

Specialiștii în domeniu vor înțelege că mărimea, grosimea și/sau dimensiunile bolusului (100), inclusiv miezul (110), stratul protector (130), dacă este prevăzut, și învelișul (120) pot fi ajustate în funcție de doza agentului inhibitor de furnizat la rumegător. De exemplu, un bolus cu o dimensiune mai mică (100) poate fi adaptat pentru utilizare la animale rumegătoare mai mici, cum ar fi oi sau capre, iar un bolus cu dimensiune mai mare (100) poate fi folosit la animale rumegătoare mai mari, cum ar fi vite. Un bolus pentru un animal mare, cum ar fi vite, poate avea o lungime de 13cm, un diametru de 3.4cm și o greutate de 257gm (în cadrul cererii, "gm" se referă la gram). Alternativ, se pot folosi mai multe bolusuri mai mici în combinație. În aplicări preferate, bolusul și forma de dozaj întârziată din invenție are o lungime de cel puțin 5 cm și, cel mai preferabil, o lungime de cel puțin 10 cm. În aplicări preferate, bolusul și forma de dozaj întârziată din invenție are un diametru de cel puțin 2 cm și o lungime de cel puțin 10 cm. De preferință, bolusul și forma de dozaj întârziată din invenție are o greutate între 100 și 300 grame.

În plus, învelișul (120) poate fi de asemenea configurat să controleze vitezele de eliberare a miezului (110) și/sau degradarea bolusului (100). De exemplu, suprafața internă în secțiune transversală a cavității poate fi adaptată să controleze cantitatea miezului (110) prezent în bolus (100). Într-o astfel de aplicare, volumul intern al cavității poate fi adaptat să crească în dimensiune de la capătul deschis (160) la capătul închis (170). Aceasta poate fi utilă pentru creșterea cantității de agent inhibitor în timp, care ar putea corespunde creșterii animalului când aportul de hrană al animalului crește.

În plus sau alternativ, grosimea în secțiune transversală a pereților care formează învelișul (120) poate crește pe lungimea învelișului (120). De exemplu, pereții pot fi mai groși la un capăt al învelișului (120) decât la celălalt. Într-o astfel de aplicare, grosimea peretelui la capătul deschis (160) poate fi mai mică decât la capătul închis (170). Aceasta poate ajuta să se asigure dizolvarea controlată a compoziției miezului din bolus.

Strat protector

Stratul protector (130) este o componentă opțională a bolusului (100) din prezenta invenție și poate fi inclus pentru a oferi stabilitate suplimentară bolusului (100). Stratul protector (130) poate fi configurat să prevină parțial sau complet contactul între miez (110) și înveliș (120). Stratul protector (130) este selectat de preferință dintre un material ceros, epoxi sau un material siliconic.

Specialiștii în domeniu vor înțelege că stratul protector (130) poate fi selectat în funcție de utilizarea dorită și/sau profilul de eliberare. De exemplu, dacă se dorește mai mult control al vitezei de eliberare a agentului inhibitor, alegerea materialului, formei și configurației stratului protector (130) poate facilita obținerea profilului de eliberare dorit.

Compoziție exemplificată

Ca o aplicare exemplificativă, bolusul poate cuprinde un miez închis de un înveliș. Bolusul poate avea o lungime de aproximativ 13 cm și un diametru de aproximativ 3,4 cm cu o greutate aproximativă de 257 gm.

Învelișul poate fi realizat din PLA (3052D), de ex. prin turnare prin injecție, având o grosime de 1 mm.

Matricea miezului poate fi realizată dintr-un amestec de ulei de ricin hidrogenat și parafină într-un raport de 50:50 (din greutate). Această matrice poate conține bromoform ca un agent inhibitor într-o concentrație de circa 50% (din greutate).

Metodă de tratament

Referirile la metodele of treatment din aplicările și exemplele prezentei invenții se vor interpreta ca referiri la compuși, compozițiile și dispozitivele din prezenta invenție pentru utilizare în acele metode.

Bolusul (100) este furnizat oral în rumenul animalului rumegător tratat, intrând în rumen prin esofag. În rumen, fluidele stomacale (și alte materii cum ar fi fibre vegetale) erodează sau dizolvă miezul (110) pentru a elibera agentul inhibitor în timp.

Capătul deschis (160) permite contactul fluidelor stomacale și materiilor fibroase cu miezul (110). În plus, ajută la controlul eliberării miezului (110) în rumen.

Miezul (110) și învelișul (120) sunt proiectate să faciliteze eliberarea agentului inhibitor într-o perioadă de timp în care un animal este tratat conform unei metode divulgate în prezenta.

Bolusul (100) este adaptat să elibereze agentul inhibitor într-o perioadă de cel puțin șase luni, de preferință 12 luni, posibil până la doi ani.

De preferință, vitezele de eliberare a agentului inhibitor pot fi calculate pe baza greutateii animalului rumegător tratat și tipul agentului inhibitor folosit. Se va înțelege așadar că vitezele de eliberare dorite pot varia de la animal la animal. În mod tipic, vitezele de eliberare dorite pot fi calculate pe baza cantității de agent inhibitor/greutatea animalului. Alternativ, vitezele de eliberare dorite pot fi de asemenea calculate pe baza cantității de hrană consumate de animal. Vitezele de eliberare deosebit de preferate pentru bromoform includ de la aproximativ 0.1 - aproximativ 0.5 g/zi, mai preferabil aproximativ 0.2 g/zi.

În plus, specialiștii în domeniu vor înțelege că un animal rumegător poate fi tratat cu bolusuri multiple (100) conform prezentei invenții pentru a obține un dozaj preferat al agentului inhibitor. Acest lucru poate permite prepararea unui bolus (100) având o concentrație și o încărcare totală de agent inhibitor. Bolusurile multiple (100) pot fi administrate unui animal concomitent sau succesiv, permițând furnizarea dozajului dorit la animal. Acest lucru poate fi deosebit de benefic pentru a permite utilizarea bolusului (100) cu animale care necesită doze diferite de agent inhibitor, de ex. animale mai mari sau mai mici, sau compensarea creșterii naturale în timp.

Bolusul (100) este adaptat să furnizeze o doză de agent inhibitor direct în rumenul animalului. De exemplu, bromoformul poate fi eliberat la o viteză la care poate reduce sau elimina eficient producția metanului în timpul digestiei. Se va reduce astfel emisia gazelor de seră de către animal, reducând așadar impactul agriculturii asupra mediului.

În plus, bolusul (100) poate îmbunătăți conversia hranei de către rumegător. De exemplu, prin reducerea producției metanului în timpul digestiei, se crede că acest lucru poate duce la o utilizare mai eficientă a hranei ingerate, având ca rezultat creștere îmbunătățită și creștere în greutate sau o altă producție îmbunătățită, cum ar fi cea de lapte. În plus, compozițiile pentru miez și efectele sinergice care apar din combinația de vehicul și agent inhibitor pot permite prevederea unui dispozitiv de administrare cu eliberare lentă, pe termen lung, pentru a îmbunătăți productivitatea animalelor și/sau pentru a reduce emisia gazelor de seră.

Prima aplicare alternativă a învelișului

Figura 2A-2B reprezintă o aplicare alternativă a unui bolus (200) conform unei aplicări a invenției.

Aspectele bolusului (200) sunt similare cu cele ale bolusului (100) și așadar referințele identice se referă la componente identice.

5 Se prevede o serie de nervuri (240) pe o suprafață externă a învelișului (120). Nervurile (240) pot conferi rezistență structurală suplimentară bolusului (200) și pot ajuta la prevenirea ruperii acestuia în cazul umflării miezului (110). În plus sau alternativ, nervurile (240) pot ajuta de asemenea la administrarea bolusului (200) la animalul rumegător.

10 Așa cum se ilustrează, nervurile (240) sunt prevăzute ca o serie de "cercuri" concentrice. Nervurile (240) pot fi însă o serie de nervuri paralele sau neparalele (neilustrate) care se extind pe lungimea bolusului (200).

A doua aplicare alternativă a învelișului

Figurile 3A-3B reprezintă o aplicare alternativă a unui bolus (300) conform unei aplicări a invenției.

15 Aspectele bolusului (300) sunt similare cu cele ale bolusului (100) descris mai sus și așadar referințele identice se referă la componente identice.

Bolusul (300) include elemente suplimentare pe suprafața externă a învelișului (120), inclusiv adâncituri sau șanțuri (350).

20 Șanțurile (350) pot susține descompunerea unor porțiuni ale învelișului (120) pe măsură ce se degradează, ducând la un și mai bun control al profilului de eliberare pentru agentul inhibitor.

A treia aplicare alternativă a învelișului

Figurile 4A-4B reprezintă o aplicare alternativă a unui bolus (400) conform unei aplicări a invenției.

25 Aspectele bolusului (400) sunt similare cu cele ale bolusului (100) descris mai sus și așadar referințele identice se referă la componente identice.

Bolusul (400) include un înveliș (120) având o cavitate (neilustrată în figuri) configurat să primească și să rețină miezul (110).

30 Învelișul (120) se îngustează pe lungime. De exemplu, distanța dintre suprafețele externe ale părților distale ale învelișului (120) crește pe lungimea bolusului (400). De exemplu, așa cum se indică în Figura 4A, lățimea (X) este mai mică decât lățimea (Y).

Alternativ, bolusul (400) poate avea pereți laterali cu grosime în mare măsură constantă, dar care sunt structurați și orientați pentru a defini o îngustare a bolusului (400).

Această configurație poate permite o degradare mai bine controlată a miezului (110) și așadar un control suplimentar pentru eliberarea agentului inhibitor.

A patra aplicare alternativă a învelișului

Figura 5A reprezintă o aplicare alternativă a unui bolus (500) conform unei aplicări a invenției.

Aspectele bolusului (500) sunt similare cu cele descrise mai sus și așadar referințele identice se referă la componente identice.

40 Bolusul (500) include un rezervor (580) adaptat să conțină o formă relativ concentrată a agentului inhibitor, de ex. bromoform, într-o formă lichidă în mare măsură pură.

Bolusul (500) include un mecanism de distribuie configurat să distribuie doze predeterminate de agent inhibitor din rezervor (580).

45 În aplicarea ilustrată, mecanismul de distribuie este o pompă (590) în legătură cu o supapă. la intervale predeterminate, pompa (590) distribuie o doză de agent inhibitor prin intermediul supapei (590) pentru a elibera agentul inhibitor în rumenul în care a fost administrat bolusul (500).

Mecanismul de distribuie poate fi configurat să elibereze o doză constantă, de ex. identică, de agent inhibitor la intervale definite.

50 Alternativ, mecanismul de distribuie poate fi configurat să varieze cantitatea de agent inhibitor eliberată la momente diferite. Aceasta poate fi utilă pentru a permite furnizarea de către bolus (500) a unei cantități eficiente de agent inhibitor în conformitate cu creșterea animalului. În plus sau alternativ, poate compensa modificări ale altor factori, de ex. variații sezoniere în producția metanului care ar necesita o doză mai mare de agent inhibitor.

55 Într-o altă aplicare, bolusul (500) poate include senzori (nereprezențați). De exemplu, pot fi incluși senzori de temperatură în bolus (500). În plus sau alternativ, pot fi incluși alți senzori în bolus, cum ar fi de mișcare și pH. Adăugarea acestor senzori poate furniza informații prețioase privind consumul de hrană al animalului și evaluează dacă cantitatea de agent inhibitor este suficientă pentru animal.

A cincea aplicare alternativă a învelișului

Figurile 6A și 6B reprezintă o aplicare alternativă a unui bolus (600) conform unei aplicări a invenției.

Bolusul (600) poate fi adaptat să includă elemente suplimentare în cavitatea învelișului, cum ar fi șanțuri sau nervuri (680) formate pe un perete intern al învelișului (120) care definește cavitatea.

Aspectele bolusului (600) sunt similare cu cele ale bolusului (100) și așadar referințele identice se referă la componente identice.

5 Se prevede o serie de nervuri (680) pe o suprafață internă a învelișului (120). Nervurile (680) pot conferi rezistență structurală suplimentară bolusului (600) și/sau pot reprezenta mijloace suplimentare de reținere a conținutului compoziției miezului în cavitatea învelișului. În plus sau alternativ, nervurile (680) pot ajuta de asemenea la reținerea miezului în înveliș. În plus, nervurile pot asigura de asemenea dizolvarea controlată a miezului din bolus (600) în animalul rumegător.

10 Într-o aplicare, suprafața externă a învelișului va rămâne netedă sau uniformă.

A șasea aplicare alternativă a învelișului

Figurile 15A - 15D reprezintă o altă aplicare a unui bolus (700) conform unui aspect al prezentei invenții. Dimensiunile bolusului din figura sunt indicate în mm. De preferință, bolusul are o lungime de 13 cm, un diametru de 3.4 cm și de preferință o greutate de circa 250 gm.

15 Bolusul (700) poate fi adaptat să includă elemente suplimentare cu structură de rigidizare internă pe înveliș.

Aspectele bolusului (700) sunt similare cu cele ale bolusului (100) și așadar referințele identice se referă la componente identice.

20 Bolusul (700) include cel puțin o nervură de rigidizare (710) într-o cavitate (nenumărată) definită de structura învelișului. Poate fi prevăzut și un capac (720), de ex. atașat detașabil de bolus (700) pentru a închide capătul deschis al bolusului (700). Atașarea poate fi realizată printr-o configurație de ajustaj prin frecare sau o configurație cu filet în care filetele corespunzătoare de pe înveliș și capac se cuplează între ele. Alternativ, capacul poate fi atașat de înveliș cu adeziv sau un alt dispozitiv de prindere mecanic.

25 Nervurile de rigidizare (720) pot îmbunătăți integritatea structurală a bolusului (700) și îl pot ajuta să-și mențină forma.

Metodă de preparare

Figura 7 este o schemă de flux indicând etapele reprezentative ale unei metode de preparare (800) a unui bolus de ex. (100), (200), (300), (400), conform prezentei invenții.

30 În termeni generali, metoda include etapa (810) de formare a învelișului (120) și etapa (820) de formare a unui miez (110).

Înveliș

35 Formarea învelișului (120) poate utiliza orice tehnică cunoscută în domeniu. De exemplu, un material adecvat poate fi extrudat într-o formă dorită, definind o cavitate. Alternativ, se poate utiliza și un proces de fabricare de stratificare a aditivilor pentru formarea învelișului definind o cavitate. Se are de asemenea în vedere utilizarea unui proces de turnare, de ex. matrițe de unică folosință sau turnare prin injecție, imprimare 3D sau topire la cald.

Miez

În etapa 820, se fabrică miezul (110).

Etapa 820 poate include una sau mai multe dintre etapele următoare:

40 Etapa 822 care cuprinde topirea materialului unui vehicul, furnizând un material de vehicul topit;

Etapa 824 care cuprinde adăugarea agentului inhibitor în materialul de vehicul topit;

Etapa 826 care cuprinde amestecarea agentului inhibitor și unui material de vehicul topit pentru a crea un amestec în mare măsură omogen.

Etapa 828 care cuprinde formarea amestecului în mare măsură omogen într-o formă dorită.

45 Se va înțelege că amestecul în mare măsură omogen conține agentul inhibitor la o concentrație suficientă pentru a obține profilul de eliberare dorit pentru agentul inhibitor la administrarea dispozitivului la un animal rumegător. Concentrația poate varia în funcție de tipul animalului rumegător tratat, de forma și dimensiunile dispozitivului sau profilul de eliberare dorit să se obțină.

50 Se va înțelege că etapa de formare a amestecului în mare măsură omogen într-o formă dorită poate cuprinde furnizarea amestecului la o matriță. Într-o formă deosebit de preferată, amestecul în mare măsură omogen este adăugat (turnat) într-o cavitate într-un înveliș (120) fabricat la etapa 810.

Alternativ, matrița poate fi o componentă separată care primește amestecul în mare măsură omogen. În aceste aplicări, după realizarea formei dorite, miezul poate fi furnizat apoi într-o cavitate într-un înveliș (120).

55 Metoda include și etapa de lăsare a amestecului în mare măsură omogen să se răcească. La răcire, materialul vehiculului se întărește și ia forma corespunzătoare matriței sau învelișului în care s-a furnizat.

Compoziții exemplificative

S-au preparat următoarele miezuri utilizabile în bolusul din prezenta invenție.

	Cantitate (g/g %)											
Exemplu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bromoform	20	20	20	25	12,5	8,3	25	12,5	8,3	25	12,5	8,3
Parafină	80	30	30	50	50	50	-	-	-	-	-	-
Ceară de albine		50	-	-	-	-	50	50	50	-	-	-
PEG 4000			50	-	-	-	-	-	-	50	50	50
PEG 400		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AC		-	-	25	-	-	25	-	-	25	-	-
Caolin		-	-	-	37.5	-	-	37.5	-	-	37.5	-
Zeolit		-	-	-	-	41,7	-	-	41,7	-	-	41,7

	Cantitate (g/g %)		
Exemplu	12	14	15
Bromoform	20	33	33
Parafină	-	66	-
Ceară de albine	-	-	66
PEG 4000	50	-	-
PEG 400	30	-	-
AC	-	-	-
Caolin	-	-	-
Zeolit	-	-	-

5 S-au preparat și următoarele miezuri cu conținut mare de bromoform utilizabile în bolusul din prezenta invenție.

	Cantitate (g/g %)											
Exemplu	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Bromoform	33	50	67	75	33	50	67	75	33	50	67	75
Ceară de albine	67	50	33	25	-	-	-	-	-	-	-	-
Parafină	-	-	-	-	67	50	33	25	-	-	-	-
Ceară de carnauba	-	-	-	-	-	-	-	-	67	50	33	25
Ulei de ricin hidrogenat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cărbune activat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bentonit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxid de zinc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Exemplu	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Bromoform	33	50	67	75	50	50	50	50	50
Ceară de albine	-	-	-	-	-	-	-	25	25
Parafină	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceară de carnauba	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Ulei de ricin hidrogenat	67	50	33	25	-	-	-	25	-
Cărbune activat	-	-	-	-	50	-	-	-	-
Bentonit	-	-	-	-	-	50	-	-	-
Oxid de zinc	-	-	-	-	-	-	50	-	-

10

Validare

Exemplul 1: Studiu de eliberare/difuzie

15 S-au efectuat teste cu bolusuri astumate mari imprimate 3D cu grosime de 2mm (LCB2) umplute cu 66.7% (din greutate) bromoform și 33.3% (din greutate) ceară de albine în RME (RME testul 2) pentru a determina rata de difuzie a bromoformului din bolus.

Proiectarea bolusului

Pentru acest studiu s-a folosit un bolus rigidizat așa cum se indică în Figura 15. Include o structură de rigidizare internă, precum și nervuri repartizate pentru susținerea peretelui, iar o parte superioară a fost adaptată pentru atașarea unui capac. S-a constatat că bolusul rigidizat este mai robust și și-a menținut mai bine forma decât un bolus nerigidizat când amestecul topit de bromoform/ceară de albine a fost turnat și răcit, precum și un bolus fizic mai solid pentru test.

Metodă

Materiale

Bromoform (clasa reactivilor, Sigma Aldrich, 96% bromoform, 4% etanol), ceară de albine (clasa alimentară, NZ ceară de albine, MP 65°C) și oxid de zinc de la Native Ingredients NZ.

Fabricarea bolusurilor

Bolusurile au fost desenate în Solidworks, convertite în fișiere .stl și deschise în FlashPrint pentru crearea comenzilor de imprimare. Bolusurile au fost imprimate în trei părți (înveliș, structură internă și capac) pe imprimante FlashForge Creator Pro 3D folosind E-Sun PLA+ la umplere 100%, rezoluție standard, înălțimea primului strat 0.27 mm, înălțimea stratului 0.18 mm, 2 carcase perimetrice, 3 straturi solide superioare, 3 straturi solide inferioare, tipar de umplere hexagonal, viteză de imprimare 60 mm/s, temperatură extruder 200°C și temperatură placă 50°C.

S-au preparat opt bolusuri LRB la 67% (din greutate) bromoform, opt bolusuri LRB la 75% (din greutate) bromoform și șase bolusuri LCB2 fără bromoform (control). Ingredientele sunt indicate mai jos (Tabel 1). Toate ingredientele au fost cântărite în pahare pe un cântar electronic 4dp calibrat. Soluțiile de bromoform au fost acoperite cu parafilm pentru a preveni evaporarea. Ingredientele au fost preparate prin topirea cerii de albine precântărite și a oxidului de zinc în pahare la 100°C (Thermoprism Oven), răcirea amestecului la 80°C, adăugarea bromoformului și mixarea amestecului pentru a preveni depunerea oxidului de zinc, înaintea turnării în bolusuri. Capacele au fost montate prin presare și lipite pentru a sigila bolusul.

Tabel 1. Compoziții preferate pentru bolusuri rigidizate scurte

Tip	Cantitate	Per bolus			Total		
		Oxid de zinc (g)	Ceară de albine (g)	Bromoform (g)	Oxid de zinc (g)	Ceară de albine (g)	Bromoform (g)
LCB2	6	28.0	80.4	0.0	168.0	482.7	0.0
LRB1	8	28.0	47.3	96.1	224.0	378.8	769.0
LRB1	8	28.0	39.7	119.0	224.0	317.3	952.0
Total					616.0	1178.7	1721.0

Bolusurile s-au așezat în flacoane de polipropilenă de 500 ml cu aproximativ 380 ml tampon fosfat 0.02M (Merck) în apă distilată, preparate în loturi de 2L sau mai mari, ajustate la pH 6.5 folosind 1M HCl (Merck) și un pH-metru pre-calibrat (folosind tampon pH 4.7 și 10 pH). Flacoanele au fost sigilate și introduse în incubator la 40°C. S-au colectat probe de 10 ml și întreaga soluție a fost schimbată la fiecare 24 de ore.

Probele de 10 ml au fost colectate folosind o autopipetă de 10 ml în tuburi Falcon de 15 ml. S-a adăugat 1 g de clorură de sodiu în fiecare tub Falcon. Pentru analiza GC-MS, s-a adăugat 1 ml de acetat de etil (clasa analitică, Merck) în fiecare tub Falcon. Când s-a folosit GC-FID, s-au adăugat 2 ml de acetat de etil în fiecare tub Falcon. Tuburile Falcon au fost acoperite, bine amestecate folosind un Vortex și centrifugate la 4000 rpm timp de 15 minute. Pentru analiza GC-MS, întregul acetat de etil a fost recuperat folosind o seringă de sticlă gradată și s-au înregistrat volumele.

Pentru analiza GC-FID, s-au recuperat 0.5 ml de acetat de etil. Pentru analiza GC-FID, s-au injectat 200 ul de probă folosind un autosampler și s-au analizat folosind o coloană capilară ZB5HT de 30 m folosind o pantă de temperatură de 30-300°C timp de 20 de minute, la un debit al azotului gazos de 5 ml/min, în regim splitless. Bromoformul a avut un timp de retenție de 7.5 minute. Zonele de vârf au fost comparate cu standardele de calibrare în acetat de etilenă pentru a determina masa bromoformului (mg). Aceasta a fost împărțită la volumul injectat pentru a obține concentrația bromoformului în acetat de etil (mg/L). Concentrația în acetat de etil a fost înmulțită cu volumul total al acetatului de etil adăugat în probă și împărțită la recuperare pentru a obține masa bromoformului în probă. Aceasta a fost apoi împărțită la volumul de probă colectată pentru a obține o concentrație în soluție, care a fost apoi înmulțită cu volumul soluției din flaconul Shott pentru a obține masa transferată din bolus în soluție. Recuperarea bromoformului din soluție a fost verificată folosind soluții standard realizate la diferite concentrații de bromoform și a fost

de obicei de 43%. Performanța GC-FID a fost verificată pentru fiecare serie de zece probe folosind o probă de calibrare ca referință.

Rezultate

- 5 S-a observat o rată de difuzie mai mică urmată de o creștere rapidă a ratei de difuzie pentru ambele bolusuri (Figura 8). Bolusul de 67% a avut un timp de întârziere de 4-5 zile înainte de a atinge rata maximă de difuzie, în timp ce 75% a atins rata maximă de difuzie cu 3 zile.
- 10 Rata de difuzie a fost mai mare pentru bolusul de 75% la 1010 mg/zi în comparație cu 66.7% care a fost de 730 mg/zi. Acesta a fost un rezultat surprinzător, dar și bun (deoarece înseamnă că ar putea fi utilizat un singur bolus pentru a doza tauri de 700 kg și pentru a obține reducerea metanului), ratele de difuzie estimate pentru un bolus LCB1 cu 67% bromoform fiind de 300 mg/zi și 462 mg/zi pentru un bolus LCB 1 cu 75% bromoform. Estimarea pentru bolusurile LRB a fost o rată de difuzie mai mică deoarece a prezentat o suprafață redusă la grosime de 1 mm (aproximativ 71% din cea a unui bolus LCB 1) (Tabelul 2). Teoretic, bolusul LRB ar trebui să furnizeze doar 220 mg/zi pentru 67% bromoform și 344 mg/zi pentru 75%.
- 15

Tabel 2. Rată de difuzie estimată pentru un bolus LRB din diferitele părți ale bolusului.

							Rate estimate (mg/cm2/zi)		Ceară expusă (mg/cm2/zi)		Total (mg/zi)		Contribuție (%)	
Părți bolus	Cantitate	Lungime (cm)	Lățime (cm)	Diametru (cm)	Suprafață (cm2)	Grosime (mm)	0.67	0.75	0.67	0.75	0.67	0.75	0.67	0.75
Capac	1	1.7		3.4	27.2	2	0.357	0.49	85.0	116.2	9.7	13.3	4.4	3.9
Nervuri	4	0.3		3.4	12.8	3	0.082	0.086	850	116.2	1.1	1.1	0.5	0.3
Zonă de difuzie activă	3	3		3.4	96.1	1	1.939	3.042	85.0	116.2	186.4	292.4	84.3	84.9
Intrare	1	3.0	1.2		3.6	3	0.082	0.086	85.0	116.2	0.3	0.3	0.1	0.1
Parte curbată					12.2	1	1.939	3.042	85.0	116.2	23.7	37.3	10.7	10.8
							Total (mg/zi)				221.2	344.4		Tot
							Real (mg/zi)				731	1064		Tot general
							Factor comun				3.30	3.09		

Table 3. Calculul suprafeței poroase pentru a obține aceeași rată de difuzie precum cea măsurată din bolusurile LRB folosind rate de difuzie determinate anterior.

		67% bromoform						75% bromoform					
Proportie deschisă	suprafată	mg/zi deschisă	prin suprafată	mg/zi închisă	prin suprafată		Proportie deschisă	suprafată	mg/zi deschisă	prin suprafată	mg/zi închisă	prin suprafată	
0.01		23.2		9.6			0.01		31.6		13.2		
0		0.0		1.1			0		0.0		1.1		
0.06		449.4		176.1			0.06		614.1		276.4		
0		0.0		0.3			0		0.0		0.3		
0.06		57.3		22.4			0.06		78.2		35.2		
Total (mg/zi)		529.8		209.6					724.0		326.2		
Total general (mg/zi)				739.4							1050.2		

Variabilitatea datelor de difuzie a fost inițial mare cu un coeficient de variație de circa 1 și aceasta a scăzut între 0.05-0.22 pe măsură ce bolusurile au atins ratele de difuzie maxime (Figura 9). Bolusul 75% s-a așezat în 2 zile, iar bolusul 67% în 4 zile.

S-a observat o eliberare de ordin zero pentru ambele bolusuri, indicând că viteza de eliberare a fost independentă de concentrația bromoformului în bolus (Figura 11).

Concluzie

Rata de difuzie pentru bolusurile LRB a fost 1010 mg/zi pentru bolusul 75% și 730 mg/zi pentru bolusul 66.7%, mai mare decât s-a estimat din studiile de difuzie anterioare.

Concentrația bromoformului în mediu pentru bolusul 75% este aproape de limita de solubilitate a bromoformului în apă (3.2 g/L), prin urmare ratele de difuzie pot fi mai mari decât cele măsurate în acest studiu.

Exemplul 2: Testul de eliberare a vehiculelor

Pentru acest studiu s-a efectuat testul de eliberare a diferitelor vehicule.

Metodă

Materiale

Bromoform (clasa reactivilor, Sigma Aldrich, 96% bromoform, 4% etanol), fluid ruminal (Dairy NZ Trial), parafine (MPs 46-48, 55 și 65°C, Sigma Aldrich), ulei de ricin hidrogenat (Lotus Oils), ceară de carnauba (PureNature NZ), oxid de zinc (PureNature NZ).

pH și capacitatea de tampon a fluidului ruminal

Fluidul ruminal colectat de la vaci de lapte NZ a fost decongelat și centrifugat înaintea analizei cu privire la pH și capacitatea de tampon. Un volum de 10 ml de fluid ruminal primit de la fiecare vacă a fost titrat față de 0.05 N NaOH cu monitorizare pH continuă. S-a înregistrat volumul NaOH pentru modificarea pH-ului cu o unitate.

Eliberarea și testarea diferitelor vehicule

S-au fabricat bolusuri mici acoperite așa cum se descrie în exemplul 1 de mai sus.

S-au amestecat parafinele, ceara de albine, ceara de carnauba și uleiul de ricin hidrogenat cu bromoform la 33%, 50%, 67% și 75% din greutate bromoform. Amestecurile s-au introdus în următoarele:

a. Parafine: bolusuri mici acoperite cu grosime de 2 mm și tub falcon de 15 ml;

b. Ulei de ricin hidrogenat, ceară de carnauba și ceară de albine: bolusuri mici acoperite cu grosime de 1, 2 și 3 mm și tuburi falcon de 15 ml.

S-au introdus în flacoane de polipropilenă de 500 ml cu 400 ml 0.02M tampon fosfat (Merck) în apă distilată, preparate în loturi de 2L sau mai mari, ajustate la pH 6.5 folosind 1M HCl (Merck) și un pH-metru pre-calibrat (folosind tampon pH 4, 7 și 10). Flacoanele au fost sigilate și introduse în incubator la 40°C. S-au colectat probe de 10 ml și întreaga soluție s-a schimbat la fiecare 2 zile (luni, miercuri, vineri), exceptând sfârșiturile de săptămână.

Probele au fost analizate prin GC-MS și GC-FID așa cum se descrie în exemplul 1 de mai sus.

Rezultate

pH și capacitate de tampon

pH-ul și capacitatea de tampon medii au fost 6.9 ± 0.2 (n=4), respectiv 7.47 ± 1.4 mMol/L/delta pH (n=4). Deși au fost publicate lucrări privind valorile pH pentru lichidul ruminal, nu sunt disponibile date privind capacitatea de tampon. Capacitățile de tampon obținute pentru lichidul ruminal indică faptul că mediul ruminal este rezistent, fiind de 5-6 ori mai mare decât al tamponului fosfat. Am constatat că pH-ul tamponului fosfat în experimentul de difuzie a rămas stabil chiar și în jurul valorii de 3 mg/ml de concentrație a bromoformului (Raport nr. BR 2021-01, Figura 4). Având în vedere volumul de lichid ruminal de 91 L, concentrația maximă a bromoformului în condiții extreme de ruptură completă a bolusului ar ajunge la aproximativ 1.09 mg/ml, care este mai mică decât cea observată anterior în PBS. Prin urmare, cu această concentrație și capacitatea de tampon puternică dată a lichidului ruminal, există o posibilitate mai mică de scădere a pH-ului în cazul ruperii bruște a bolusului.

Testul de eliberare a vehiculelor

Parafina a avut cea mai mare viteză de eliberare la 190 mg/cm²/zi, urmată de ceară de albine, carnauba și ulei de ricin hidrogenat (Figura 12). Carnauba și uleiul de ricin hidrogenat par opțiuni mai bune pentru vehicul, viteza de eliberare fiind 50 până la 40% mai mică față de ceara de albine.

Bromoformul a avut cea mai mare viteză de eliberare în bolusuri fabricate cu parafine la 3.5 până la 5.4 mg/cm²/zi în bolusurile acoperite mici cu grosime de 2 mm (Figurile 13A-C).

Bolusurile fabricate cu ceară de carnauba au avut viteze de eliberare de până la 5.5 mg/cm²/zi în bolusul cu grosime de 1 mm și 1.66 mg/cm²/zi în bolusul cu grosime de 3 mm.

Comparativ, bolusurile fabricate cu ceară de albine au avut o viteză de eliberare de 3 mg/cm²/zi la 75% (din greutate) bromoform (Figura 13C).

Bromoformul a dizolvat uleiul de ricin hidrogenat, s-a difuzat prin bolus și s-a acumulat pe fundul recipientului, dizolvând recipientul, și nu s-au putut determina viteze de eliberare fiindcă bromoformul nu a fost detectat în apă pentru probele colectate. Testele cu ulei de ricin hidrogenat trebuie repetate în flacoane de sticlă.

5 **Viteze de eliberare din bolus rigidizat**

Vitezele de eliberare medii pentru bolusuri rigidizate mari cu 67% (din greutate) și 75% (din greutate) bromoform, preparate așa cum s-a descris anterior în exemplul 1 de mai sus, dintr-un alt studiu sunt prezentate în Figura 14 și comparate cu vitezele de eliberare din aceleași bolusuri măsurate în laborator. Jumătate din bolusuri au fost în găleți de 20 L cu 1 kg de nisip umplut cu tampon la pH 6.5, iar cealaltă jumătate în găleți de 20 L cu 400 g de așchii de lemn și 1 kg de nisip. Vitezele de eliberare sunt comparabile în ziua 28 cu cele observate în laborator. S-a observat o mică diferență în concentrația de bromoform între gălețile conținând așchii de lemn și gălețile fără așchii de lemn. Bolusurile au rămas în mare parte intacte, cu o oarecare compresie din cauza nisipului, iar unora li s-au deschis capacele.

Exemplul 3: Studiu pe animale

15 S-a efectuat un studiu pe animale pentru a determina emisiile de metan de la un animal implantat cu un bolus din prezenta invenție. Experimentul a fost conceput ca un studiu complet randomizat, cu trei tratamente și trei măsurători repetate în timp în trei perioade la distanță de 8 până la 12 săptămâni.

20 Nouăsprezece juninci (312 ± 14 kg greutate în viu), inclusiv trei animale de rezervă, au fost selectate dintr-un grup de 50 pe baza trăsăturilor comportamentale și a greutatei în viu dintr-o fermă de cercetare din Manawatu, Noua Zeelandă. S-au repartizat în unul din cele trei tratamente: un bolus care nu conține bromoform (CONTROL; $n = 4$); un bolus care eliberează bromoform la o viteză de 300 mg/zi (MIC, $n = 6$); sau un bolus care eliberează 450 mg/zi (MARE, $n = 6$). Bolusurile SmaXtec au fost administrate în același timp pentru a monitoriza temperatura rumenului ca o monitorizare a sănătății animalelor și pentru a completa probele de sânge săptămânale.

25 Junicile au fost transportate de la ferma de cercetare la un centru de testare pentru adaptare la regim și măsurarea gazelor folosind camere de respirație. Junicile au fost adaptate la mediul ocularilor de vite și pășune proaspăt tăiată timp de 7 zile înainte de a primi bolusul de tratament alocat. Măsurătorile gazelor au început la 13 zile după administrarea bolusurilor. Fiecare junincă a fost în camerele de respirație timp de 48 de ore în perioada măsurătorilor de gaze, care a durat două săptămâni pentru patru grupuri de măsurare. La sfârșitul măsurătorilor în camerele de respirație, animalele au fost transportate înapoi la ferma de cercetare.

Fabricarea bolusurilor

30 Bolusurile s-au fabricat conform procedurii descrise în exemplul 1 de mai sus. Compozițiile folosite în acest studiu sunt indicate în tabelul 4 de mai jos.

Tabel 4. Compoziția bolusurilor rigidizate scurte pentru studiul de cercetare

Tip	Fracțiune de masă bromoform în ceară	Cantitate	Per bolus			Total		
			Oxid de zinc (g)	Ceară de albine (g)	Bromoform (g)	Oxid de zinc (g)	Ceară de albine (g)	Bromoform (g)
LCB2	0	6	28.0	80.4	0.0	168.0	482.7	0.0
LRB1	0.67	8	12.1	21.3	43.2	93.4	164.0	332.9
LRB1	0.75	8	12.1	17.8	53.5	93.4	137.4	412.1
<i>Administrare bolus</i>								

40 Cele trei versiuni de bolusuri au fost fabricate în primele 10 zile ale experimentului. Prima versiune a fost un bolus scurt care a fost regurgitat de toate animalele în cele 5 zile după administrarea bolusurilor. Deoarece bolusurile de control au fost mai lungi decât bolusurile de tratament și acestea nu au fost regurgitate în primele 3 zile, s-a presupus că dimensiunea bolusului a fost factorul major pentru regurgitare. Toate bolusurile de tratament din prima versiune au fost înlocuite cu bolusuri din a doua versiune în ziua 5 după administrare. Totuși, bolusurile mai lungi din a doua versiune au fost de asemenea regurgitate. Prin urmare, aceste bolusuri au fost apoi înlocuite cu un bolus de tratament din a treia versiune, care a fost un bolus semnificativ mai greu de aceeași dimensiune precum bolusul din a doua versiune. Bolusurile din a treia versiune nu au fost regurgitate până în prezent. În prezent, aproape toate junicile au fost dozate cu bolusuri din versiunea a treia, cu excepția a trei dintre junicile cu tratament MIC. Detalii privind regurgitarea și readministrarea bolusurilor sunt indicate în Tabelul 5.

Două bolusuri de control au fost regurgitate, dar numai unul a fost identificat deoarece ID-ul bolusului a fost ilizibil. Nici unul dintre bolusurile de control nu a fost readministrat deoarece nu a fost posibilă identificarea perechii junincă-bolus.

5 **Tabel 5.** Evenimente de administrare a diferitelor versiuni de bolus în primele trei săptămâni după administrarea inițială.

ID animal	Tratament	ID bolus V1*	ID bolus V2	Administrare bolus V2	ID bolus V3	Administrare bolus V3
780	CONTROL	1				
732	CONTROL	2				
739	CONTROL	3				
796	CONTROL	5				
797	CONTROL	4				
733	MIC	1	1	30/07/2021	1	13/08/2021
787	MIC	3	3	30/07/2021		Neregurgitat
788	MIC	2	2	31/07/2021		Neregurgitat
790	MIC	5	5	30/07/2021	5	7/08/2021
791	MIC	5	4	30/07/2021		Neregurgitat
743	MIC	6	6	30/07/2021	6	13/08/2021
794	MIC	7	7	30/07/2021	7	10/08/2021
784	MARE	9	9	1/08/2021	9	10/08/2021
785	MARE	10	10	30/07/2021	10	10/08/2021
736	MARE	11	14	30/07/2021	8	7/08/2021
792	MARE	12	12	31/07/2021	12	13/08/2021
795	MARE	13	13	30/07/2021	13	12/08/2021
798	MARE	14	11	1/08/2021	11	9/8/2021
731	MARE	15	8	30/07/2021	14	13/08/2021
*V1: toate bolusurile administrate în 27/07/21						

Consum de hrană și greutate în viu

10 Junicile au fost hrănite cu nuteț pe bază de raigras oferită *ad libitum*. Furajul a fost recoltat zilnic la aproximativ 10:00 la ferma de cercetare și transportat la centrul de testare. Furajul recoltat a fost împărțit în două loturi, primul lot a fost furnizat după-amiaza la ora 15:30 și al doilea lot a fost depozitată la 4°C până la hrănirea de a doua zi dimineața la ora 08:30. Au fost colectate probe din fiecare nuteț pentru determinarea substanței uscate și analiza furajelor. Materia uscată (DM) a fost determinată din subprobe în triplicat prin uscare în cuptor la 105°C timp de 24 de ore. O subprobă separată a fost uscată în cuptor la 65°C timp de 48 de ore pentru analizele chimice ale nutrienților. Ambele cuptoare de uscare utilizate au fost cuptoare cu circulație de aer (Avantgarde FED 720, Binder GmbH, Germania).

15 Cu două zile înainte de intrarea în camerele de respirație pentru măsurarea metanului, vacile au fost introduse în cuști metabolice pentru a le adapta la spații închise și legare. Când animalele s-au aflat în cuștile metabolice sau camerele de respirație, resturile de hrană au fost colectate de două ori pe zi și DM refuzată s-a determinat așa cum s-a descris mai sus. Aportul zilnic de substanță uscată al junincilor s-a determinat apoi din diferența de substanță uscată oferită și refuzată.

20 Greutatea în viu a fost înregistrată înaintea testării când animalele pășunau la ferma de cercetare de două ori (13/7/2021 și 16/7/2021). Animalele au fost cântărite din nou în data de 19/07/2021 la sosirea

la ferma de testare și la fiecare 7-10 zile. Greutatea în viu inițială a fost măsurată în 23/07/2021 înainte de administrarea bolusului, iar greutatea în viu finală a fost măsurată după ce animalele au ieșit din camerele de respirație. Datele finale ale greutății în viu sunt diferite pentru unele animale, deoarece măsurătorile au fost efectuate pe parcursul a două săptămâni.

5 **Măsurători de gaze**

Gazele de fermentare metan (CH_4), dioxid de carbon (CO_2) și hidrogen (H_2) au fost cuantificate în patru camere de respirație cu circuit deschis la Centrul de măsurare a metanului rumegătoarelor din Noua Zeelandă (AgResearch, Palmerston North, Noua Zeelandă). Fiecare cameră are 15.4 m^3 (3.5 m lungime $\times$ 2 m lățime $\times$ 2.2 m înălțime) cu un debit de aer de aproximativ $1.0 \text{ m}^3/\text{min}$, care a fost monitorizat continuu prin măsurarea presiunii diferențiale folosind un debitmetru Venturi. Temperatura din interiorul camerelor de respirație a fost de aproximativ 20°C , iar umiditatea relativă a fost în medie aproximativ 79%. Toate gazele au fost măsurate la intervale de ~ 2.8 minute folosind un analizor de emisii continue 4900C (Servomex Group Ltd, East Sussex, UK) și producția zilnică a fiecărui gaz a fost calculată din diferența dintre concentrația de intrare și ieșire din cameră (Pinares-Patino et al., 2012). Camerele de respirație au fost deschise de două ori pe zi (câte ~ 20 de minute) pentru curățare, hrănire, prelevare de probe de fecale și colectarea resturilor de furaj. Nu s-au efectuat măsurători în perioada în care camerele au fost deschise și datele lipsă au fost interpolate luând media ultimelor 12 valori ($\sim 45 \text{ min}$) înainte de deschiderea ușilor.

Analize statistice

Datele din prima perioadă a măsurătorilor de gaz au fost analizate folosind pachetele 'predictmeans' și 'lme4' din software-ul statistic R 4.0.3 (R Core Team, 2020). S-a realizat media datelor privind aportul de substanță uscată și emisiile de gaze pentru fiecare junincă pe parcursul celor două zile de măsurare. Juninca a reprezentat unitatea experimentală. Modelul mixt a inclus tratamentul ca efect fix și camera de respirație în grupul de măsurare ca efect aleatoriu.

Analizele de greutate au inclus tratamentul ca un efect fix și timpul ca măsurătoare repetată, juninca fiind subiectul măsurătorilor repetate. În această analiză au fost incluse doar greutatea inițială și finală în viu.

Rezultate

Aport de materii uscate și emisii de gaze

Dozajul junincilor cu bromoform la 300 mg/zi (MIC) sau 450 mg/zi (MARE) nu a afectat aportul de substanță uscată măsurat în cele două zile în care animalele au stat în camere de respirație comparativ cu grupul de control ($p = 0.42$). Atât producția de CH_4 (g/zi), cât și producția CH_4 (g/kg unitate de aport de substanță uscată) au scăzut cu mai mult de 99% în grupurile MIC și MARE comparativ cu CONTROL ($p < 0.01$). Scăderea emisiilor de CH_4 la tratamente MIC și MARE a fost însoțită de o creștere a emisiilor de H_2 pe zi (Tabelul 7). Deoarece ambele tratamente au scăzut complet emisiile de metan, trebuie determinată o doză mai mică pentru a obține niveluri de reducere a metanului între 30 și 90%. O scădere a dozei zilnice ar asigura că nu se utilizează mai mult bromoform decât este necesar pentru a crește durata de viață a bolusului și ar scădea riscul de efecte negative asupra animalelor și de contaminare posibilă a produselor de origine animală. Având în vedere că emisiile de metan sunt complet prevenite, este de remarcat faptul că aportul de substanță uscată nu a fost afectat negativ, așa cum s-a observat la hrănirea cu Asparagopsis conținând bromoform (Roque et al. 2019).

Tabel 7: Aportul de substanță uscată (DMI) și emisii de metan (CH_4) și hidrogen (H_2) măsurate în camere de respirație timp de două zile la juninci dozate cu bolusuri fără bromoform (CONTROL), 300 mg/zi bromoform (MIC) sau 450 mg/zi bromoform (MARE)

	CONTROL	MIC	MARE	SED	Valoare p
DMI [kg/zi]	5.20	4.98	4.50	0.79	0.420
CH_4 [g/zi]	120.25 ^a	0.34 ^b	0.77 ^b	2.74	< 0.01
CH_4 [g/kg DMI]	23.32 ^a	0.14 ^b	0.11 ^b	0.33	<0.01
H_2 [g/zi]	0.15 ^b	20.60 ^a	20.08 ^a	3.46	< 0.01

Concluzie

După cum s-a observat, rezultatele de mai sus indică faptul că tratamentul cu un bolus din prezenta invenție este foarte eficient câteva săptămâni după administrarea bolusurilor, așa cum s-a demonstrat prin reducerea de -99% a metanului.

Dacă nu se indică altceva în context, în prezenta descriere și în revendicări, termenii "cuprind", "cuprinzând" etc. se vor interpreta în sens inclusiv, spre deosebire de un sens exclusiv sau exhaustiv, adică în sensul de "inclusiv, nelimitativ".

Referirea la orice stadiu tehnic anterior în prezenta specificație nu se va interpreta ca o recunoaștere sau orice formă de sugestie că acel stadiu tehnic anterior face parte din cunoștințele generale comune în domeniu în orice țară din lume.

De asemenea, se poate spune că invenția constă în mare din părțile, elementele și caracteristicile indicate în specificație, individual sau colectiv, în oricare sau în toate combinațiile a două sau mai multe dintre părțile, elementele sau caracteristicile menționate.

Acolo unde descrierea de mai sus menționează numere întregi sau componente având echivalenți cunoscuți, acele numere întregi sunt încorporate în prezenta ca și cum ar fi menționate în mod individual.

Exemplul 4

Metode

Materiale

PLA (3052D), PBS (furnizor Convex) și PBAT (furnizor Convex) s-au liofilizat în recipiente cu folii de aluminiu folosind un liofilizator Labcono înaintea utilizării pentru a reduce conținutul de apă în amestecuri.

Fabricarea bolusurilor

S-au realizat amestecuri de PLA (3052D), PBS, PBAT amestecând peletele în următoarele raporturi:

Tabel 8: Compozițiile amestecurilor preparate (% din greutate)

	PLA	PBS	PBAT
1	100		
2	70	30	
3	40	60	
4	20	80	
5	70		30
6	40		60
7	20		80

Amestecurile au fost preparate prin amestecarea topiturii într-un extruder cu doi melci co-rotativi LabTech (LID 44: 1) cu o viteză a melcilor de 200 rpm. Profilul de temperatură a crescut în 11 secțiuni de încălzire ale cilindrului, de la 70°C la gâtul de alimentare la 220°C în cilindrul principal, crescând la 230°C la matriță. Amestecurile au fost granulate folosind un granulator cu lamă triplă cu o placă de 4 mm (Castin Machinery, NZ). Amestecurile au fost depozitate în recipiente cu folie de aluminiu și ambalate în pungi cu fermoar înaintea utilizării. Toate amestecurile au fost uscate peste noapte în cuptor la 40°C înainte de turnarea prin injecție. Barele de tracțiune (ASTM D368) și barele de impact (ISO 179) au fost produse într-o mașină de turnare prin injecție BOY 35A, cu un profil de temperatură de 70 până la 220°C de la alimentare la duză. Temperatura matriței a fost menținută constantă la 50°C. S-a folosit lanolină ca agent de demulare și s-a pulverizat în matriță înaintea producerii fiecărei bare de tracțiune.

Analiza bolusurilor

Contrația de la turnarea prin injecție a fost determinată prin măsurarea lățimii și grosimii specimenelor de tracțiune, scăderea acestora din lățimea și adâncimea matriței și împărțire la lățimea și adâncimea matriței, înmulțind cu 100 pentru a obține un procent. Barele de tracțiune au fost tăiate în secțiuni de ~2 cm folosind un ferăstrău, iar marginile au fost șlefuite cu hârtie abrazivă cu granulație 500 până când au devenit netede. Vasele Petri din sticlă, cu fund plat și cu diametru de 120 cm, au fost umplute cu amestecuri de ceară de albine/bromoform la următoarele concentrații de bromoform: 33, 50, 67, 75% din greutate. Trei probe din fiecare amestec PLA au fost etichetate, cântărite într-un cântar electronic 4 dp și au fost măsurate grosimea, lungimea și lățimea folosind șublere digitale. Acestea au fost apoi așezate și presate ușor în fiecare compoziție de bromoform/ceară de albine pentru a asigura un contact bun între ceara de albine și suprafețele PLA. S-au așezat apoi capace de sticlă pe vasele Petri și s-au sigilat cu bandă izolatoare înaintea introducerii în incubator la 40°C.

Probele au fost testate de asemenea cu privire la duritate folosind durometrul Shore D la o greutate de 7 kg și cu privire la proprietățile structurale prin XRD.

La fiecare două sau trei zile, probele au fost îndepărtate din vasele Petri, curățate folosind hârtie absorbantă, cântărite folosind cântarul electronic 4dp și măsurate cu șublerele digitale.

Absorbția bromoformului a fost determinată prin măsurarea modificării totale a masei probei și împărțirea la masa inițială a probei. Rata de absorbție a fost determinată împărțind modificarea masei probei între măsurători la suprafața probei în contact cu amestecul de bromoform/ceară de albine, împărțind la modificarea în timp între măsurători.

Umflarea a fost determinată prin măsurarea modificării volumului probei și împărțirea la volumul inițial al probei.

Rezultate

Turnare prin injecție

Contrația pentru PLA a fost de aproximativ 0.2%, crescând la aproximativ 1-1.2% pentru amestecuri PBS și PBAT în creștere (Figura 16). Persoanele cu competențe în domeniu cunosc modul de ajustare a contracției pentru a produce un bolus de dimensiuni dorite. Se va înțelege că sunt posibile diferite dimensiuni ale bolusului și acestea nu sunt critice pentru obținerea unei eliberări întârziate a haloformului pe baza specificațiilor din prezenta cerere de brevet.

A fost absorbit mai puțin bromoform la concentrațiile bromoformului în ceara de albine sub 50% din greutate, ceea ce sugerează o mobilitate limitată a bromoformului la concentrații scăzute ale bromoformului în ceara de albine și o capacitate puternică de reținere a cerii de albine pentru bromoform (Figura 16B). Pe măsură ce concentrația de bromoform a crescut în ceara de albine și fracțiunea de masă a PBAT și PBS a crescut în PLA, masa de bromoform absorbit a crescut și rata maximă de absorbție a crescut de asemenea (Figura 16C și D). Masele absorbite pentru amestecurile PLA au fost mai mici decât cele pentru 2003D PLA și PLA imprimat 3D (Figura 16E).

Exemplul 5

Metode

Probele au fost preparate și analizate așa cum se descrie în Exemplul 4, dacă nu se indică altceva.

Probele au fost testate de asemenea cu privire la duritate folosind durometrul Shore D la o greutate de 7 kg și cu privire la proprietățile structurale folosind XRD înainte și după expunerea la amestecurile bromoform/ceară de albine.

S-a utilizat PANalytica Empyrean XRD pentru analiza XRD cu un suport plat de probe cu un fascicul reglabil pentru a menține o zonă expusă de 1 cm pe 5 mm la toate unghiurile între 5 și 70 2Theta, cu următoarea configurație:

Tabel 9: Configurația pentru analiza XRD:

Configurație	Suprafață probă plată, proprietar=User-1, Data creării=30/05/2013 9:05:47 AM
Goniometru	Theta/Theta; treaptă minimă
	2Theta:0.0001; treaptă minimă
	Omega:0.0001
Platformă probă	Platformă pentru probe/suporturi plate
Sistem difractometru	EMPYREAN
Material anod	Cu
Lungime de undă K-Alpha1	1.540598
Lungime de undă K-Alpha2	1.544426
Raport K-Alpha2/K-Alpha1	0.5
Monocromator folosit	NU
Tensiune generator	45
Curent tub	40

Configurație	Suprafață probă plată, proprietar=User-1, Data creării=30/05/2013 9:05:47 AM
Goniometru	Theta/Theta; treaptă minimă
	2Theta:0.0001; treaptă minimă
	Omega:0.0001
Axă scanare	Gonio
Interval scanare	5-70
Treaptă scanare	0.01313
Nr. puncte	4417
Tip scanare	CONTINUĂ
Timp per treaptă	39.27

Datele XRD au fost exportate în Excel, filtrate cu o filtrare în 10 puncte și cu corecție față de referință între 5 și 60 2theta.

Rezultate

- 5 Figura 17 prezintă analiza durității amestecurilor PLA înainte și după expunerea la bromoform. Astfel, incluzând PBS în vehicul, amestecul devine mai puțin sensibil la expunerea la bromoform, ceea ce poate facilita durata de depozitare.

Exemplul 6:

Test de eliberare a unui bolus rigidizat mare (test Rissington)

- 10 Bolusurile au fost desenate în Solidworks, convertite în fișiere .stl și deschise în FlashPrint pentru crearea comenzilor de imprimare. Bolusurile au fost imprimate în trei părți (înveliș, structură internă și capac) pe imprimante FlashForge Creator Pro 3D folosind E-Sun PLA+ la umplere 100%, rezoluție standard, înălțimea primului strat 0.27 mm, înălțimea stratului 0.18 mm, 2 carcase perimetrice, 3 straturi solide superioare, 3 straturi solide inferioare, tipar de umplere hexagonal, viteză de imprimare 60 mm/s,

- 15 temperatură extruder 200°C și temperatură placă 50°C.
S-au preparat două compoziții individuale conținând 67% și 55% (din greutate) bromoform în ulei de ricin hidrogenat: parafină (în acest exemplu: raportul a fost 50:50) ca amestec de vehicul. Apoi, amestecul individual de ceară și bromoform a fost turnat în învelișul cu grosime de 1 mm după introducerea unei tije de zinc ca densificator. Capacul a fost montat și sigilat cu pistolul de lipit. Testul de eliberare a
20 fost efectuat conform metodei descrise în Exemplul 1 cu o ușoară modificare, folosind un mediu de 2 L, înlocuit zilnic. S-a prelevat un volum de 10 ml probă și s-a extras cu acetat de etil în mod adecvat înaintea injectării în GC
pentru a cuantifica eliberarea bromoformului.

- 25 Bromoformul a fost eliberat la o viteză mai mare din bolusul cu 67% (din greutate) bromoform (1150 mg/zi). Viteza de eliberare a fost mai lentă din bolusul cu 55% (din greutate) bromoform cu 9.5 mg/zi (Figura 18A).

- 30 S-au preparat apoi 4 tipuri diferite de bolusuri (câte 2) cu 57% (din greutate) bromoform cu înveliș de 1 mm și 2 mm și 55% (din greutate) și 67% (din greutate) bromoform cu înveliș de 2 mm, cu compoziție similară a vehiculului și cu tijă de zinc. Testul de eliberare s-a efectuat conform metodei descrise mai sus.
S-a constatat că viteza de eliberare a fost lentă cu învelișul de 2 mm și viteza de eliberare a fost lentă indiferent de conținutul de bromoform (Figurile 18B-D). Bolusul cu înveliș de 1 mm cu 57% (din greutate) bromoform a avut un timp de întârziere de 7 zile, ajungând la 240 mg în ziua 8 și 400 mg în ziua 9 (Figura 18D). Graficul cumulativ pentru 7, 8 și 9 zile a prezentat cea mai bună ajustare, indicând o viteză de eliberare de 319 mg/zi (Figura 18C).

- 35 Fiecare dintre bolusurile respective a fost testat în RME conform metodei descrise în exemplele de mai sus. Bolusurile au fost recuperate după 6 zile de studiu și examinate vizual. Bolusurile au rămas intacte, fără semne de rupere sau deformări.

Exemplul 7:

Proiectarea unui bolus conținând bromoform

- 40 Într-o aplicare preferată testată în acest exemplu, bolusul conține un înveliș și un miez alcătuite așa cum se definește mai jos:

Dimensiuni bolus	Lungime 13cm; diametru 3.4cm; greutate 257gm
------------------	--

Înveliș	Inclusiv un capac; grosime perete: 1 mm;
Matrice miez	Amestec de două sau mai multe ceruri, de ex. amestec ulei de ricin hidrogenat / parafină
Concentrație bromoform în miez	33% - 75% (din greutate)

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- EP-A1- 2 767 289
- EP-A2- 0 164 241
- WO-A1-95/19763
- WO-A1-2020/113279
- WO-A1-2020/245303
- GB-A- 2 353 707

(57) Revendicări:

1. Un bolus pentru administrare unui animal ruminant, bolusul cuprinzând:
un miez, unde miezul include un inhibitor de metan administrat animalului ruminant amestecat cu un vehicul; și
un înveliș care acoperă cel puțin o porțiune a miezului;
unde bolusul este configurat să elibereze inhibitorul de metan prin înveliș într-o perioadă predeterminată de timp,
unde inhibitorul de metan este un haloform, haloformul fiind selectat din lista cuprinzând bromoform, cloroform, iodoform și combinații ale acestora.
2. Bolusul conform revendicării 1, unde vehiculul și inhibitorul de metan au o afinitate relativ mai mare unul față de celălalt comparativ cu afinitatea învelișului și inhibitorului de metan unul față de celălalt.
3. Bolusul conform oricărei revendicări anterioare, unde haloformul este conținut în miez într-o cantitate între 30% g și 80% g.
4. Bolusul conform oricărei revendicări anterioare, unde vehiculul este o substanță polară selectată din grupul constând din acid miristic, acid stearic, alcool stearilic, alcool cetilic, alcool cetostearilic, ulei de ricin hidrogenat, ceară de albine, parafină, PEG4000, Carnauba, Candellila, Jojoba, lanolină și o combinație a acestora.
5. Bolusul conform oricărei revendicări anterioare, unde învelișul include un capăt deschis și unde bolusul include un capac configurat să închidă capătul deschis.
6. Bolusul conform oricărei revendicări anterioare, unde învelișul este format dintr-o substanță având o duritate Shore D de cel puțin 40 și/sau mai mică de 70.
7. Bolusul conform oricărei revendicări anterioare, unde învelișul este format dintr-un material plastic prin
care inhibitorul de metan poate migra.
8. Bolusul conform oricărei revendicări anterioare, unde învelișul este fabricat dintr-un material cuprinzând acid poli lactic (PLA) și polibutilenadipat-tereftalat (PBAT) și vehiculul cuprinde sau constă din ceară.
9. Bolusul conform oricărei revendicări anterioare, unde învelișul este fabricat dintr-un material care include unul sau mai mulți excipienți selectați din grupul incluzând plastifianți, agenți de întărire și/sau coloranți.
10. Un bolus conform oricărei revendicări anterioare, unde învelișul are o grosime a materialului sub 2 mm.
11. Bolusul conform oricărei revendicări anterioare, unde învelișul este configurat să se degradeze într-o perioadă predeterminată de timp.
12. Bolusul conform oricăreia din revendicările 1-11, unde bolusul este adaptat să elibereze inhibitorul de metan într-o perioadă de cel puțin două luni.

13. Utilizarea unui inhibitor de metan și a unui vehicul într-un bolus pentru reducerea producției metanului la un animal rumegător sau pentru reducerea emisiei metanului de la un animal rumegător.

14. O metodă de fabricare a unui bolus conform oricăreia din revendicările de la 1 la 12, cuprinzând:

formarea unui înveliș având o cavitate;

formarea unui miez care include inhibitorul de metan;

transferul miezului în cavitate.

15. Bolusul conform oricăreia din revendicările 1-12, unde miezul bolusului conține una sau mai multe particule metalice.

Figure 1

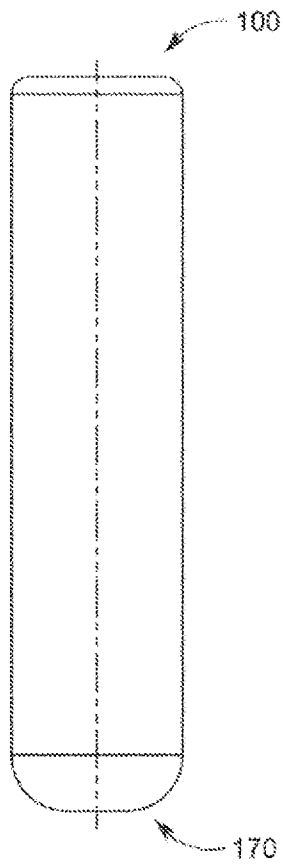


FIG. 1A

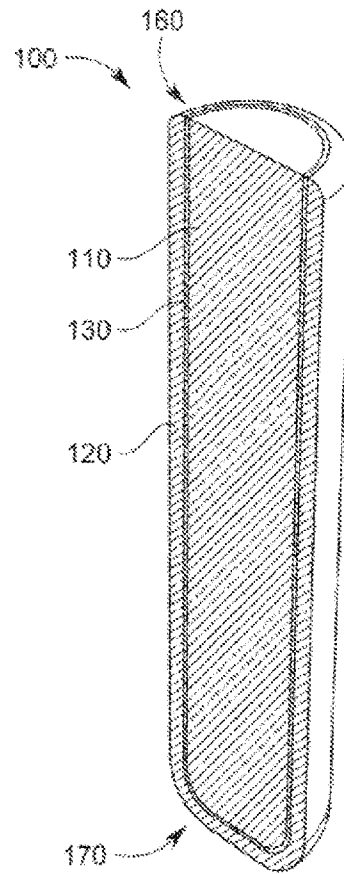


FIG. 1B

Figure 2

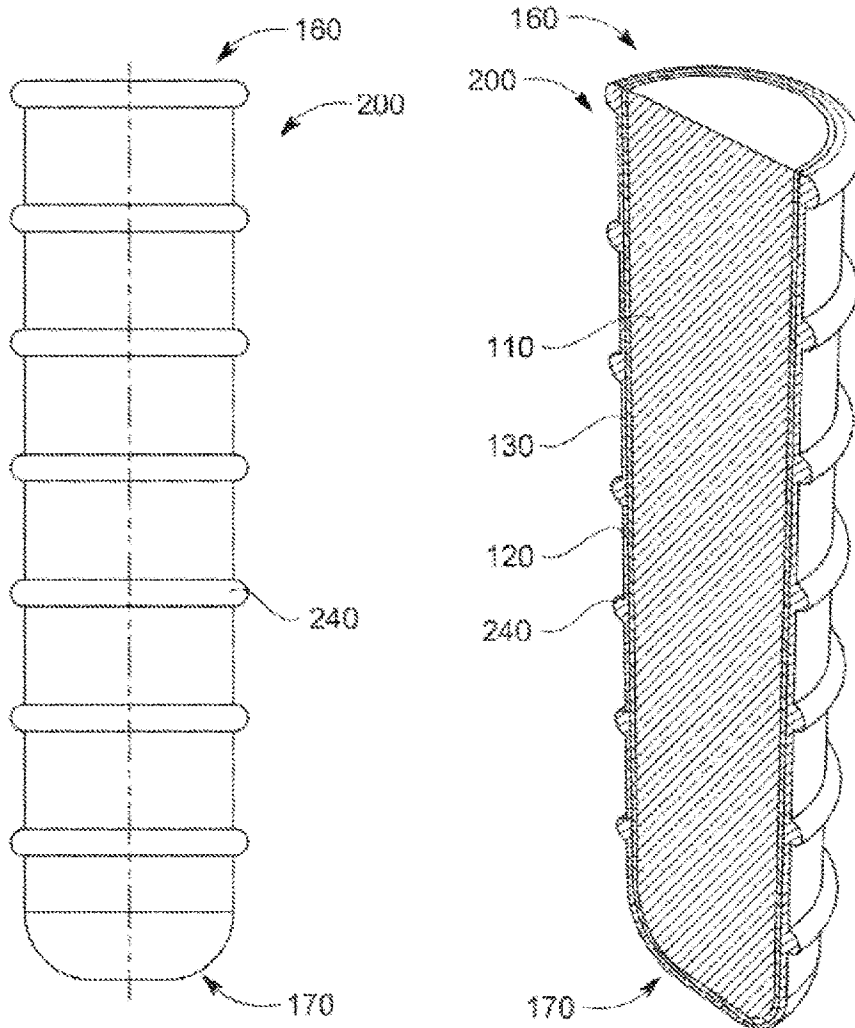


FIG. 2A

FIG. 2B

Figure 3

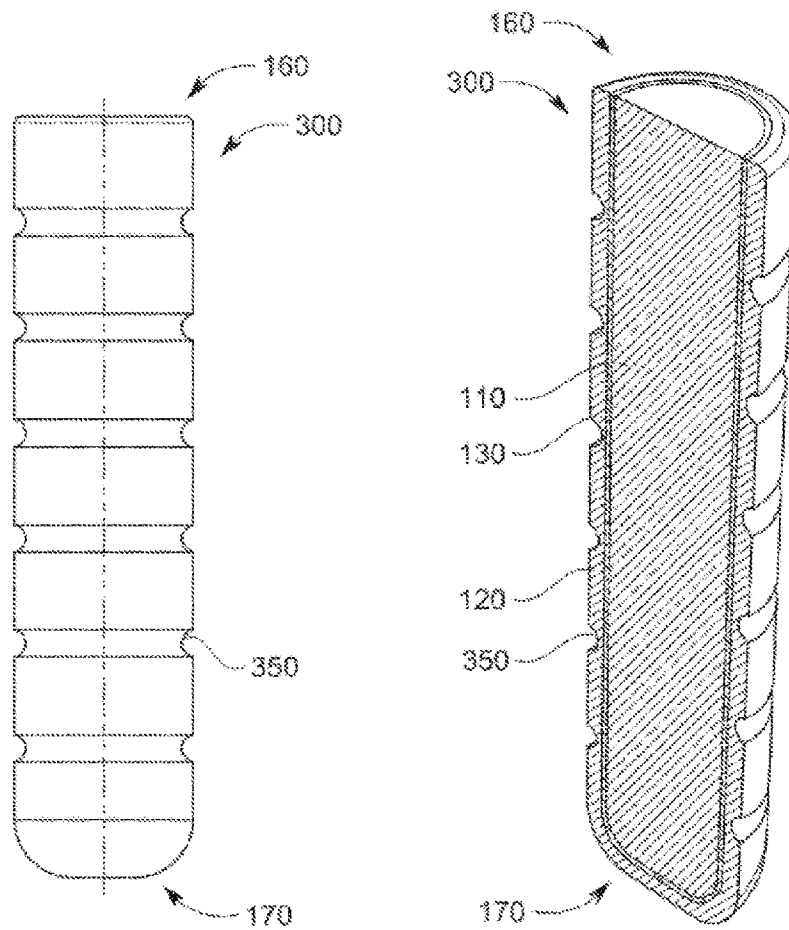


FIG. 3A

FIG. 3B

Figure 4

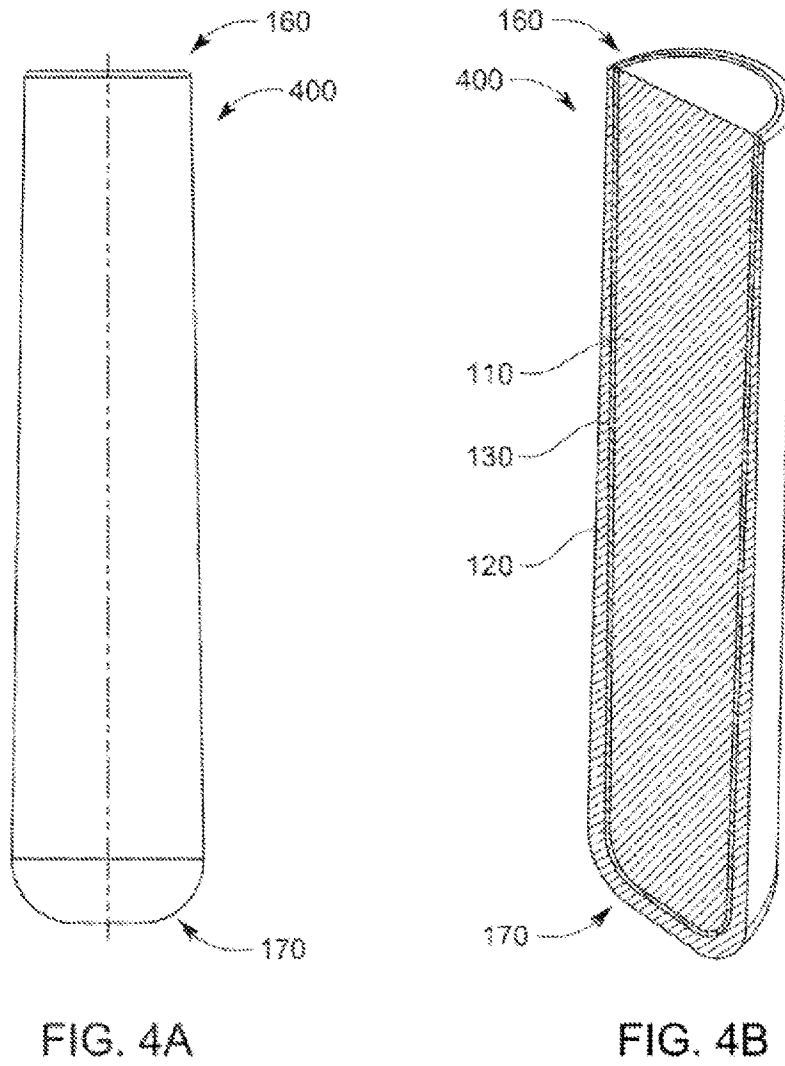


Figure 5

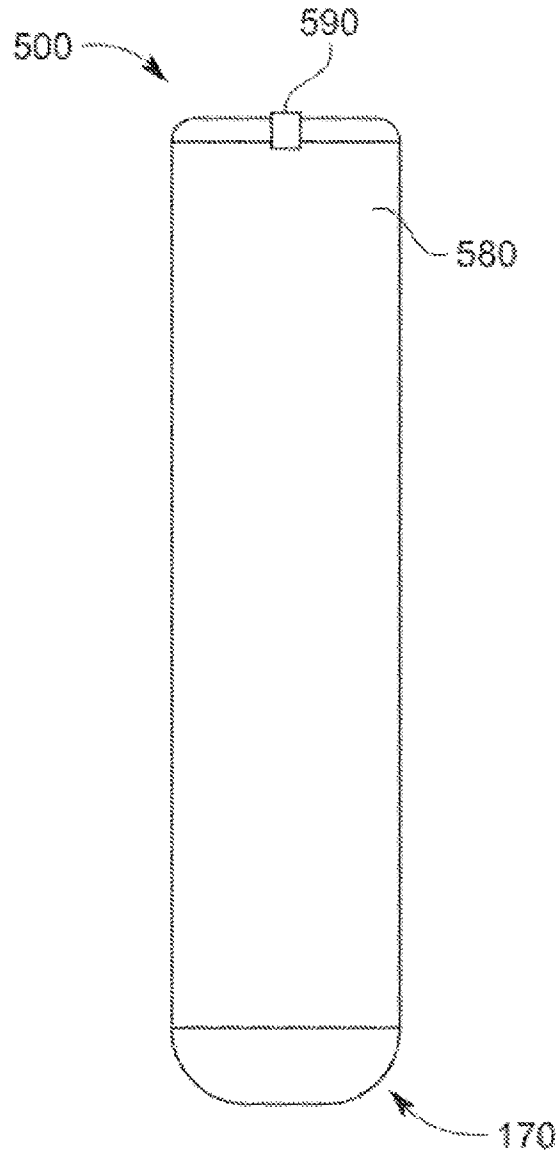


FIG. 5

Figure 6

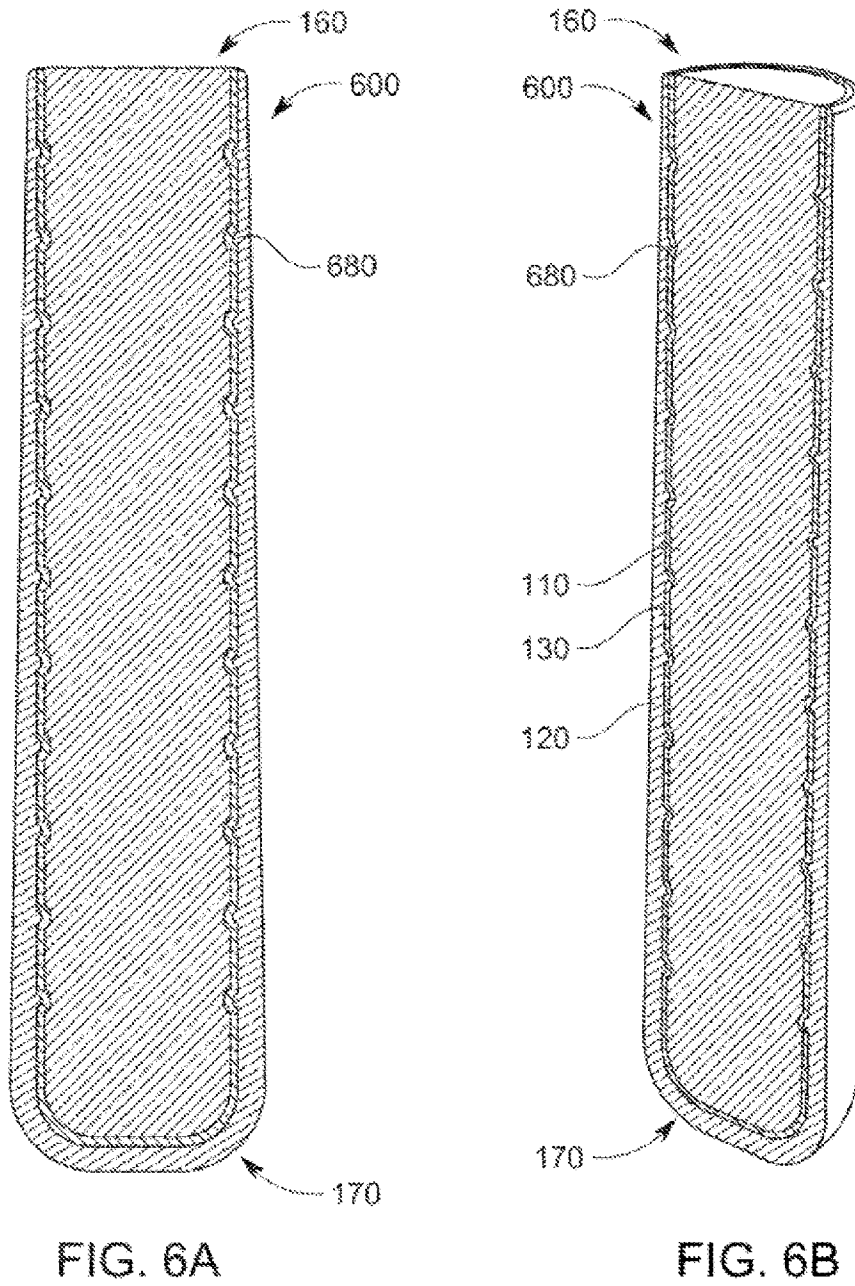


Figure 7

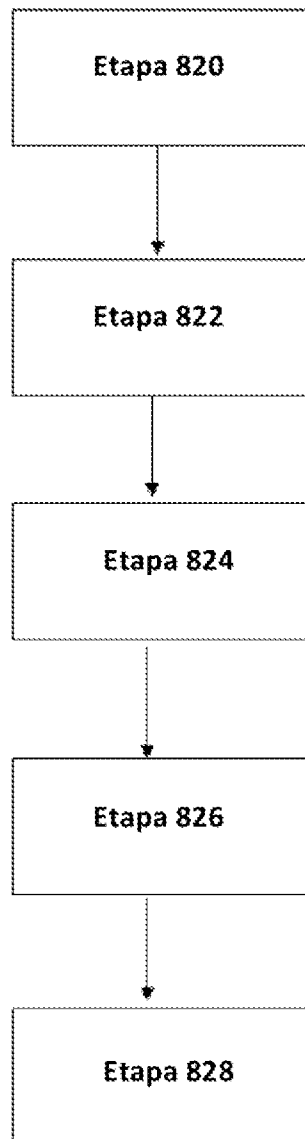


Figure 8

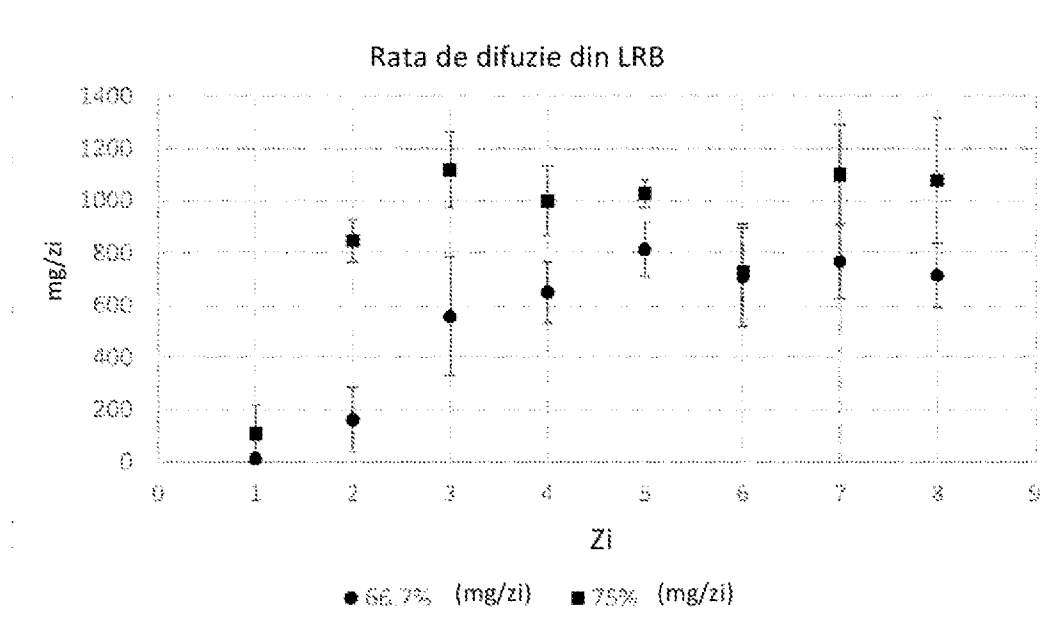


Figure 9

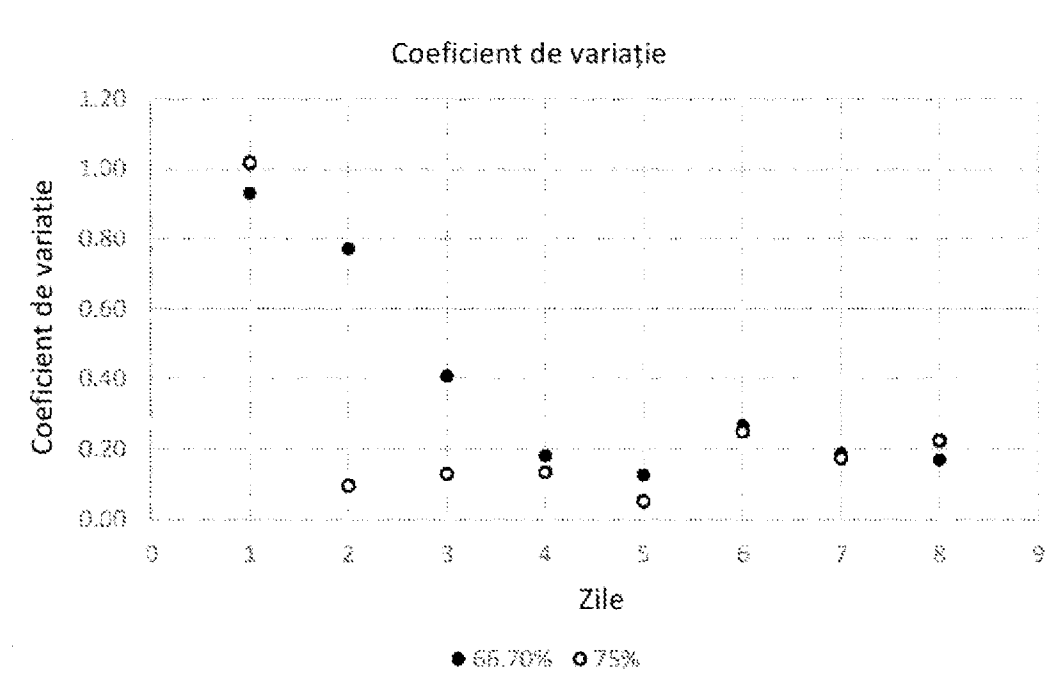


Figure 10

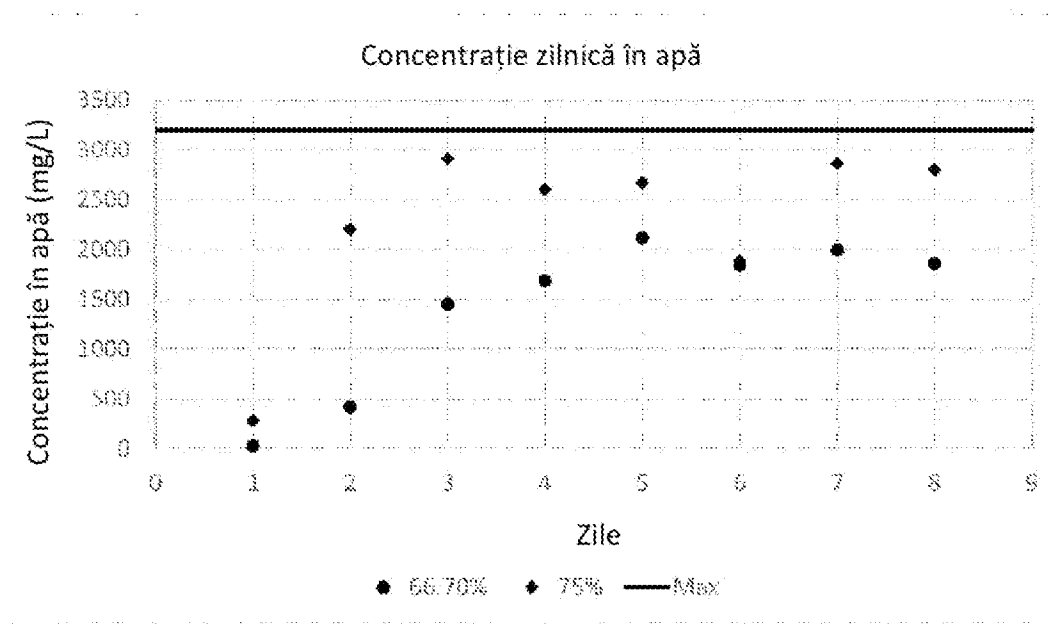


Figure 11

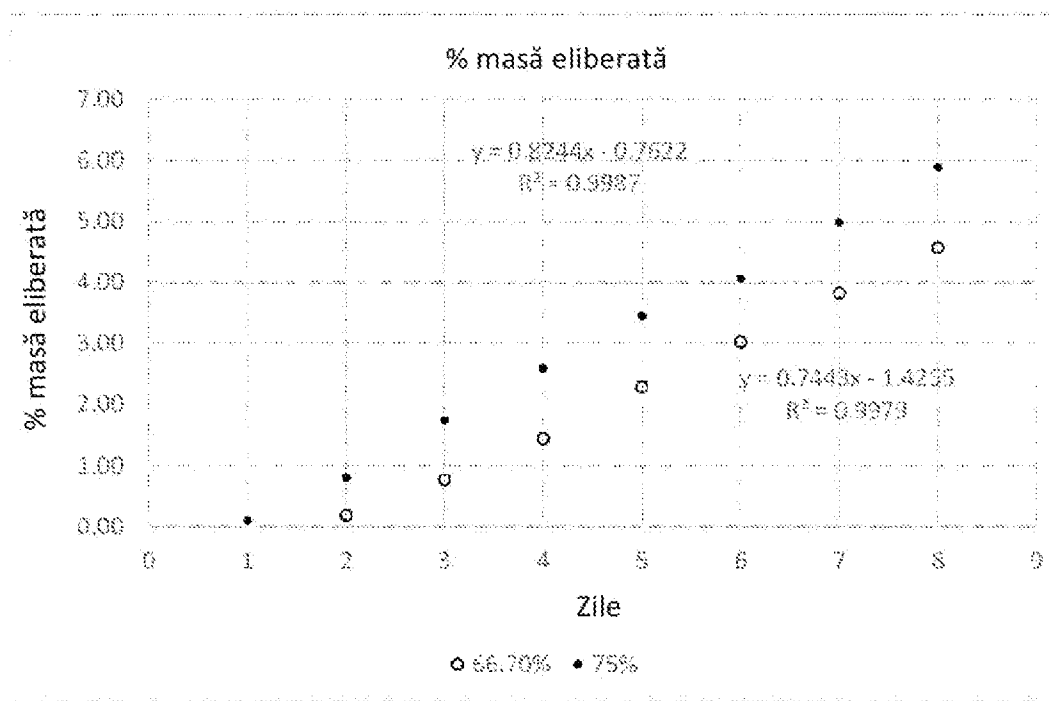


Figure 12

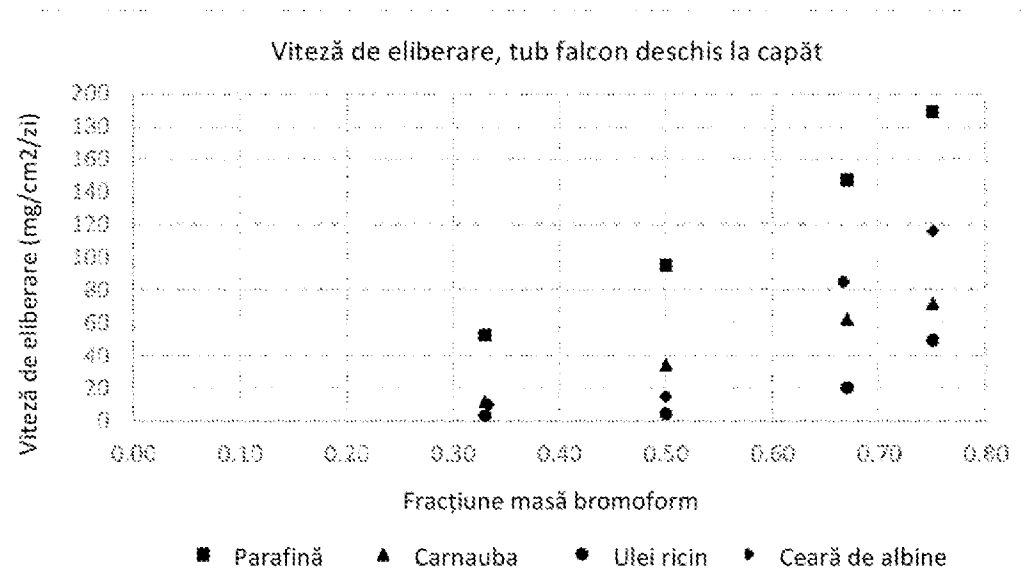


Figure 13A

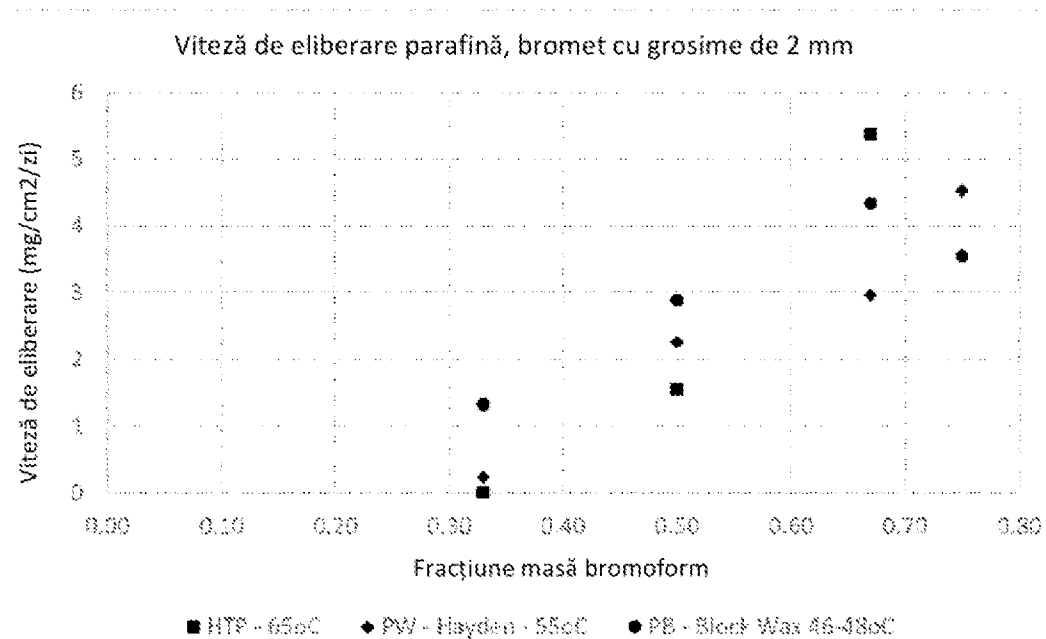


Figure 13B

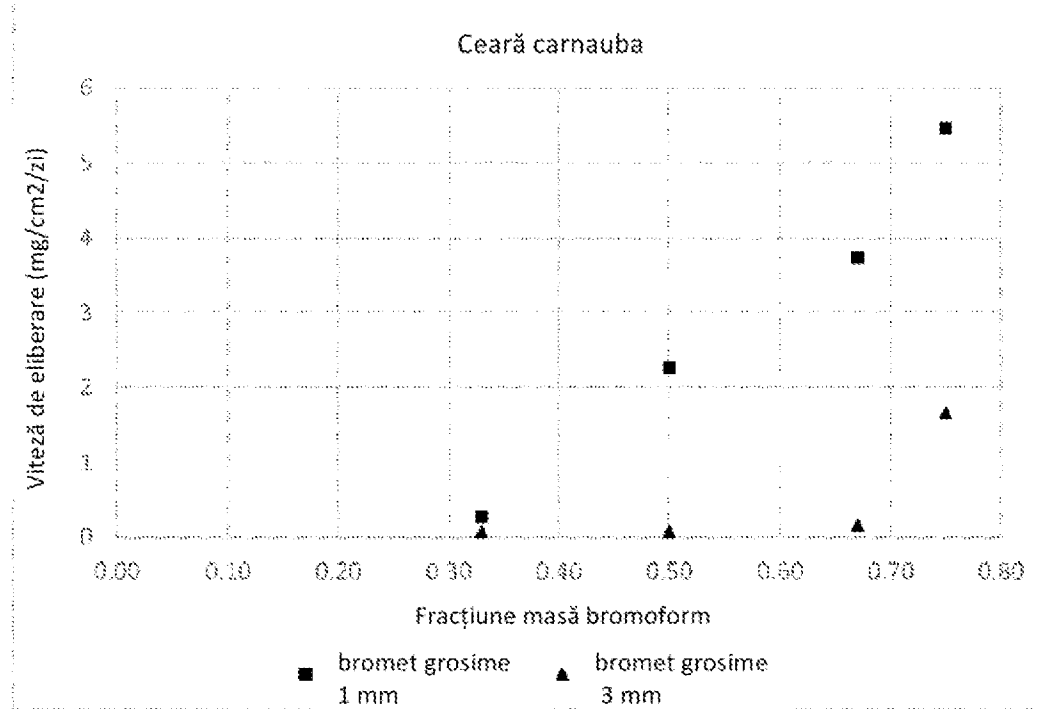


Figure 13C

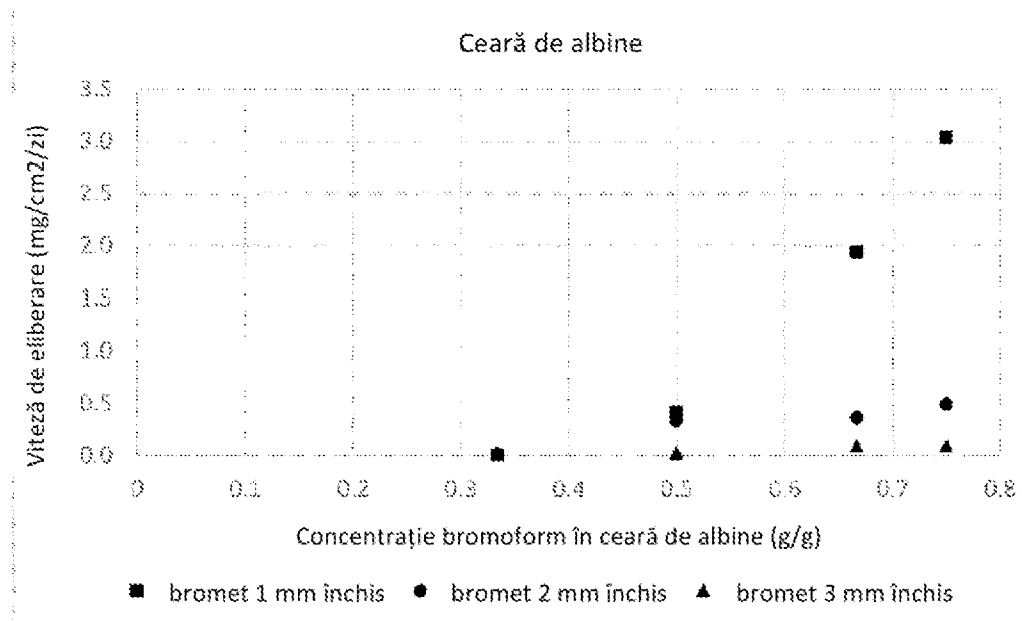


Figure 14

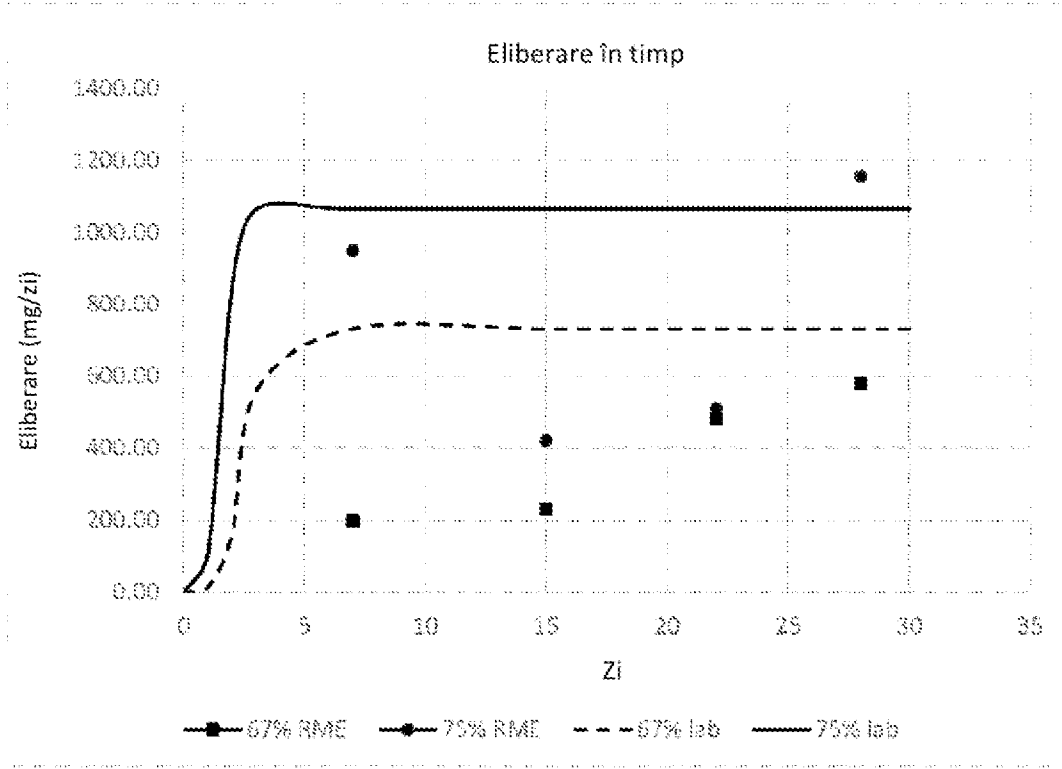


Figure 15

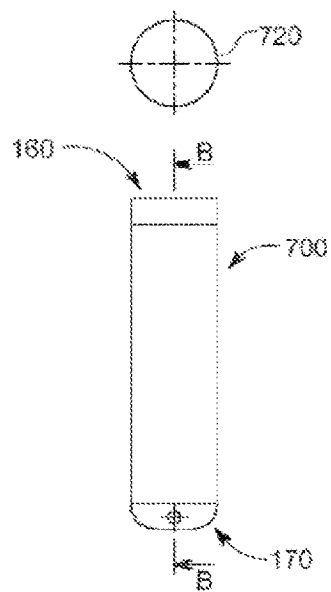


FIG. 15A

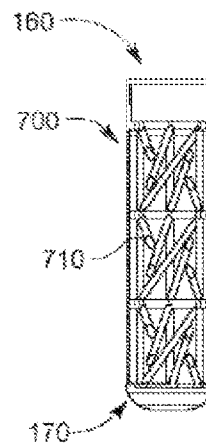


FIG. 15B

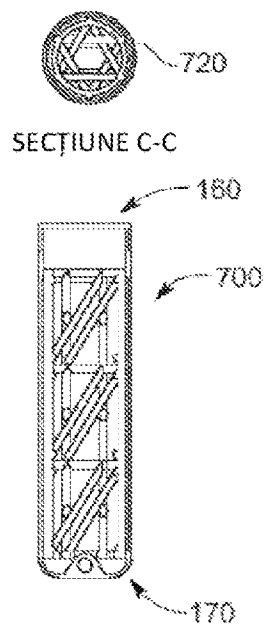


FIG. 15C

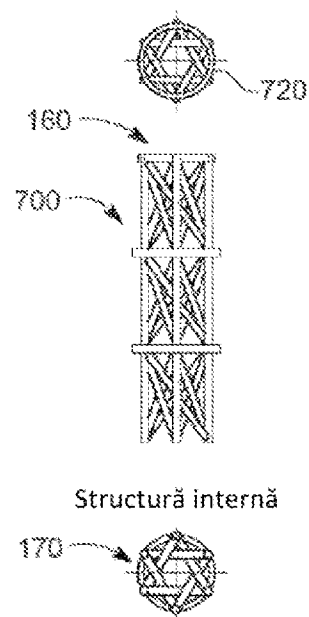


FIG. 15D

Figure 16A

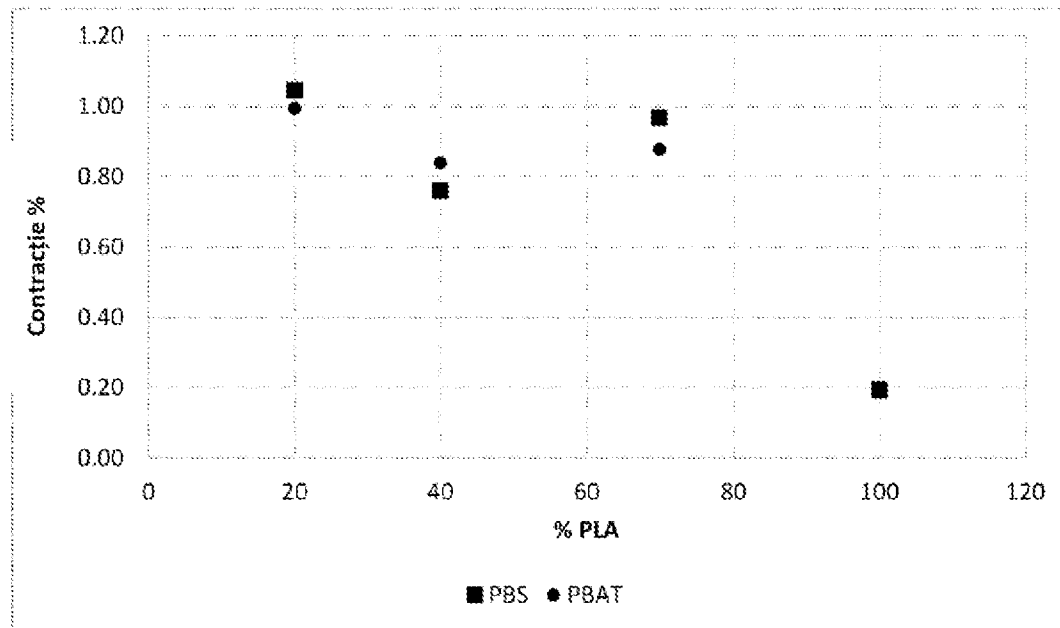


Figure 16B

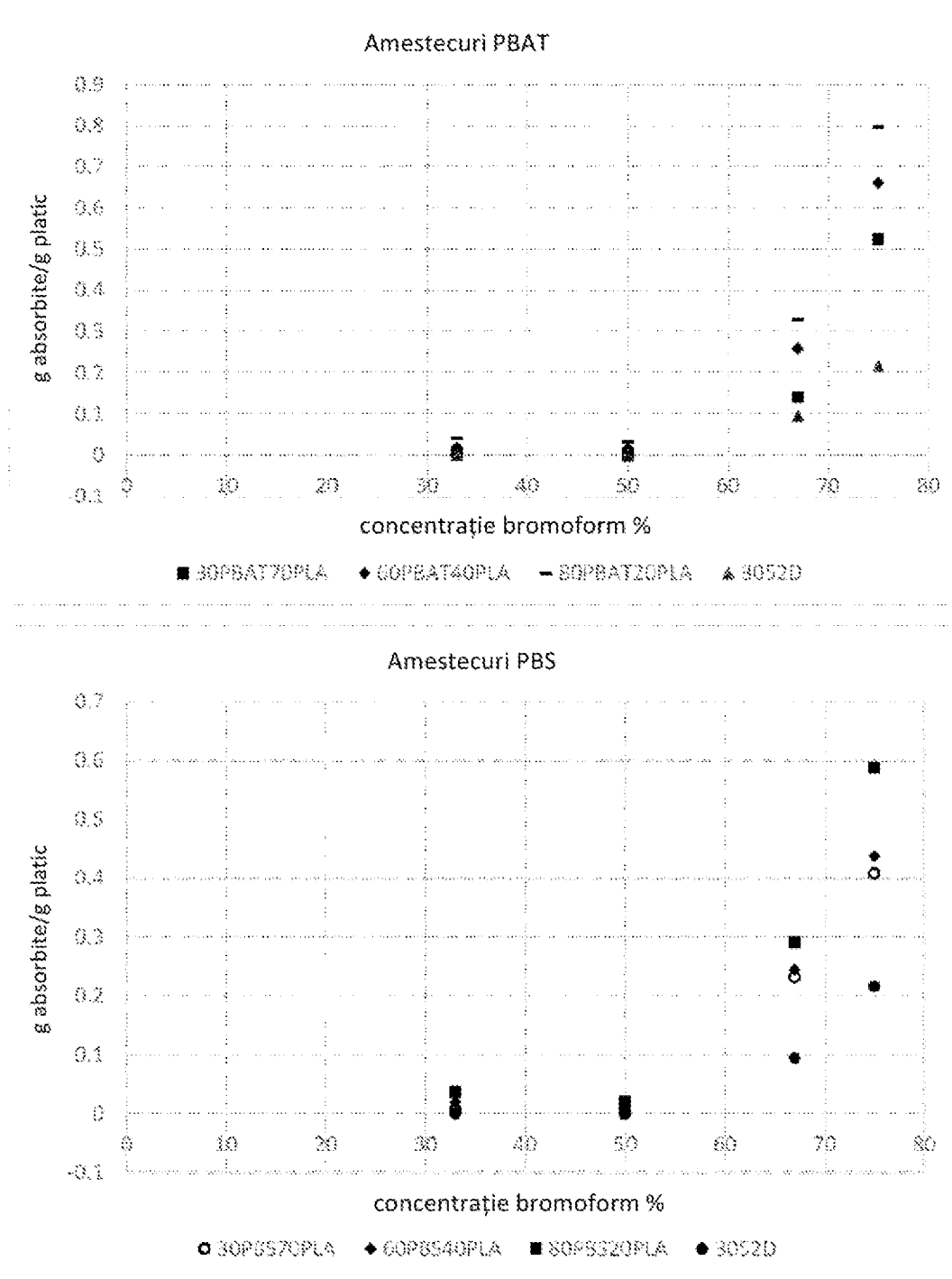


Figure 16C

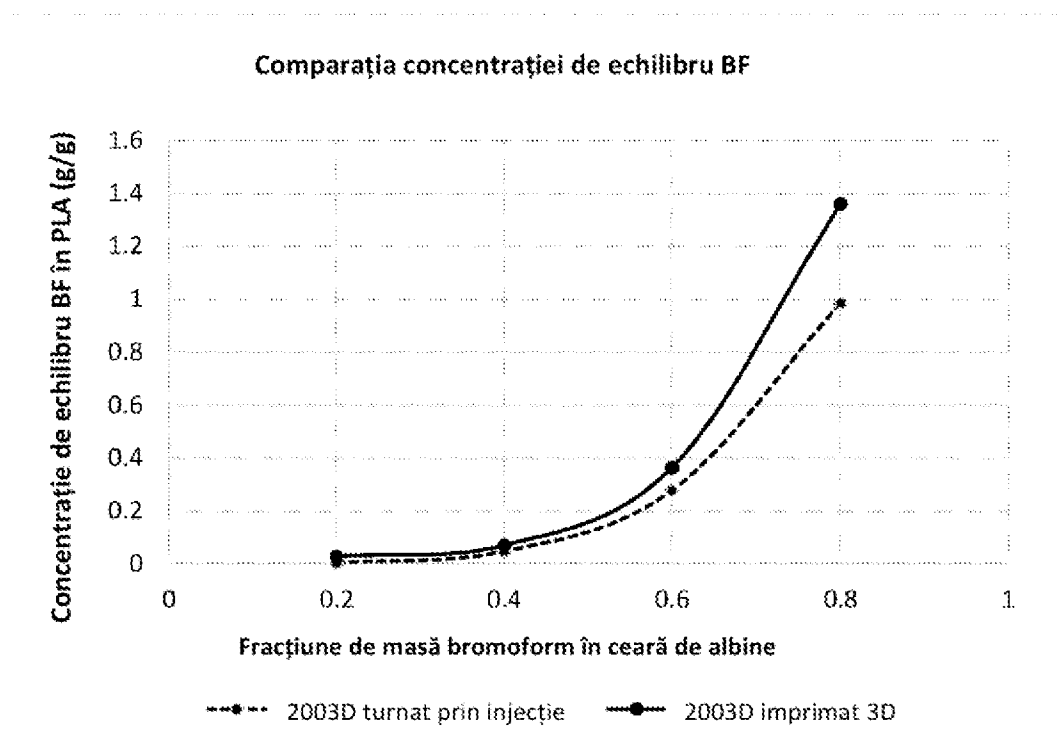


Figure 16D

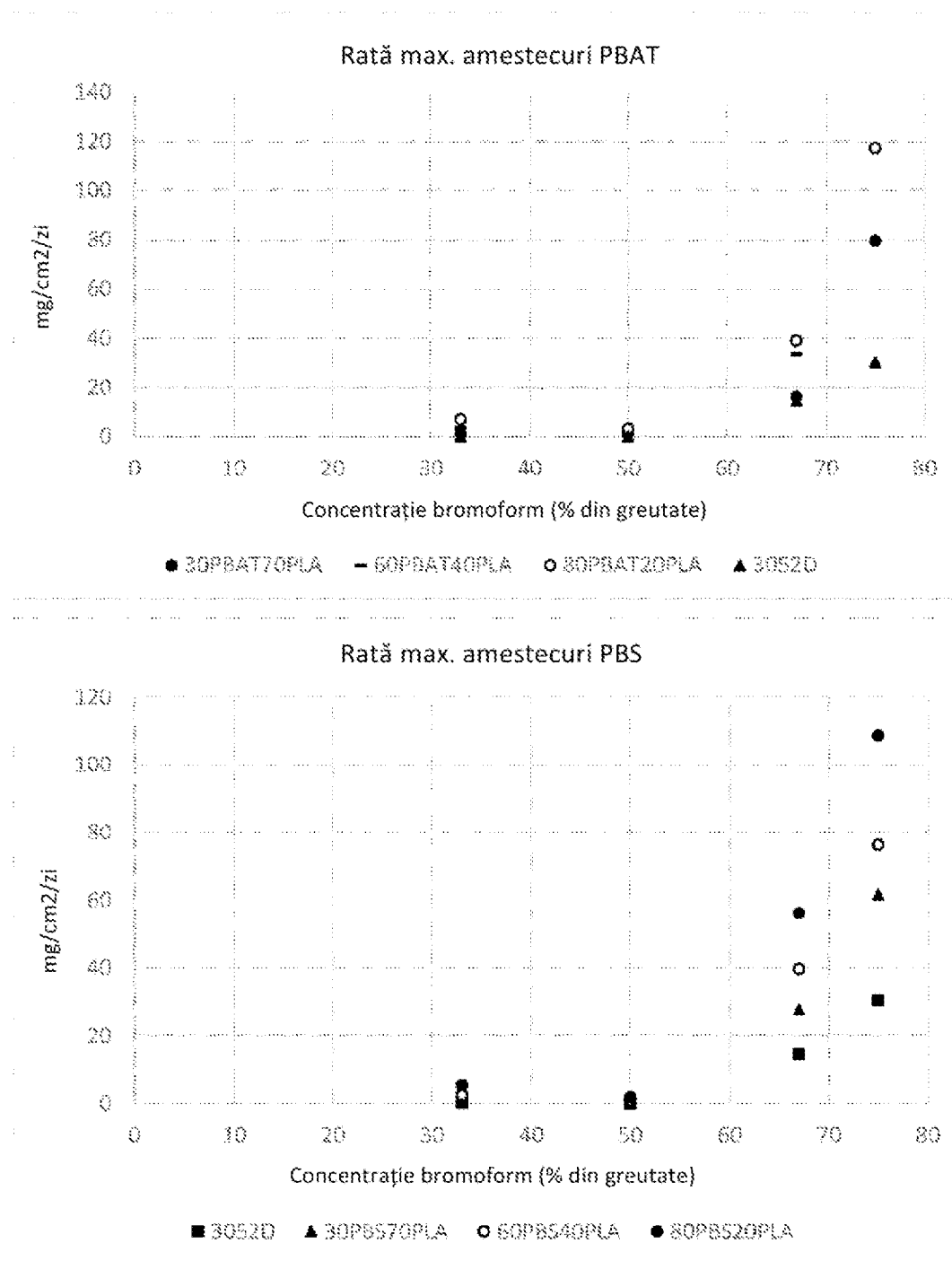


Figure 16E

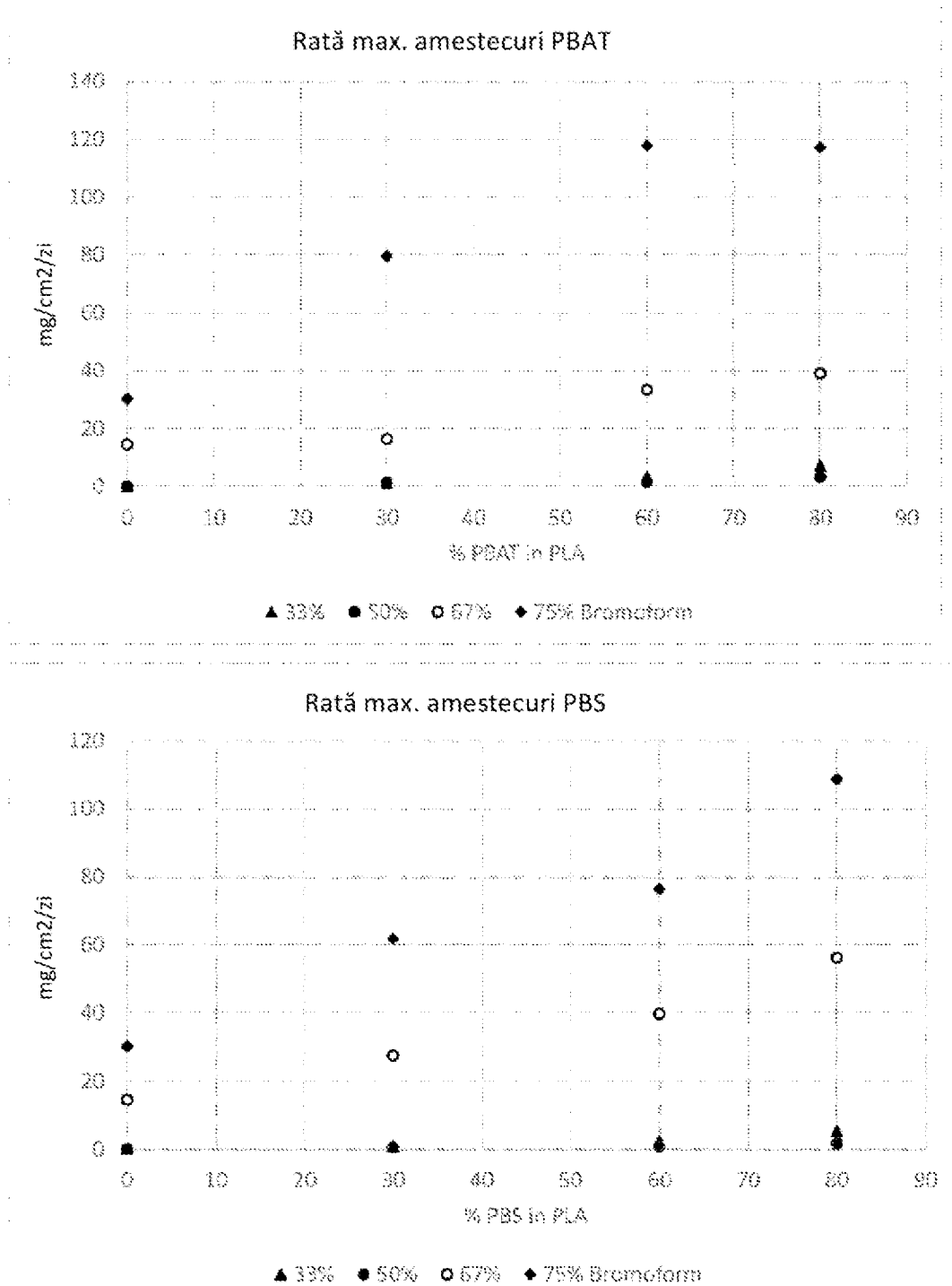


Figure 17

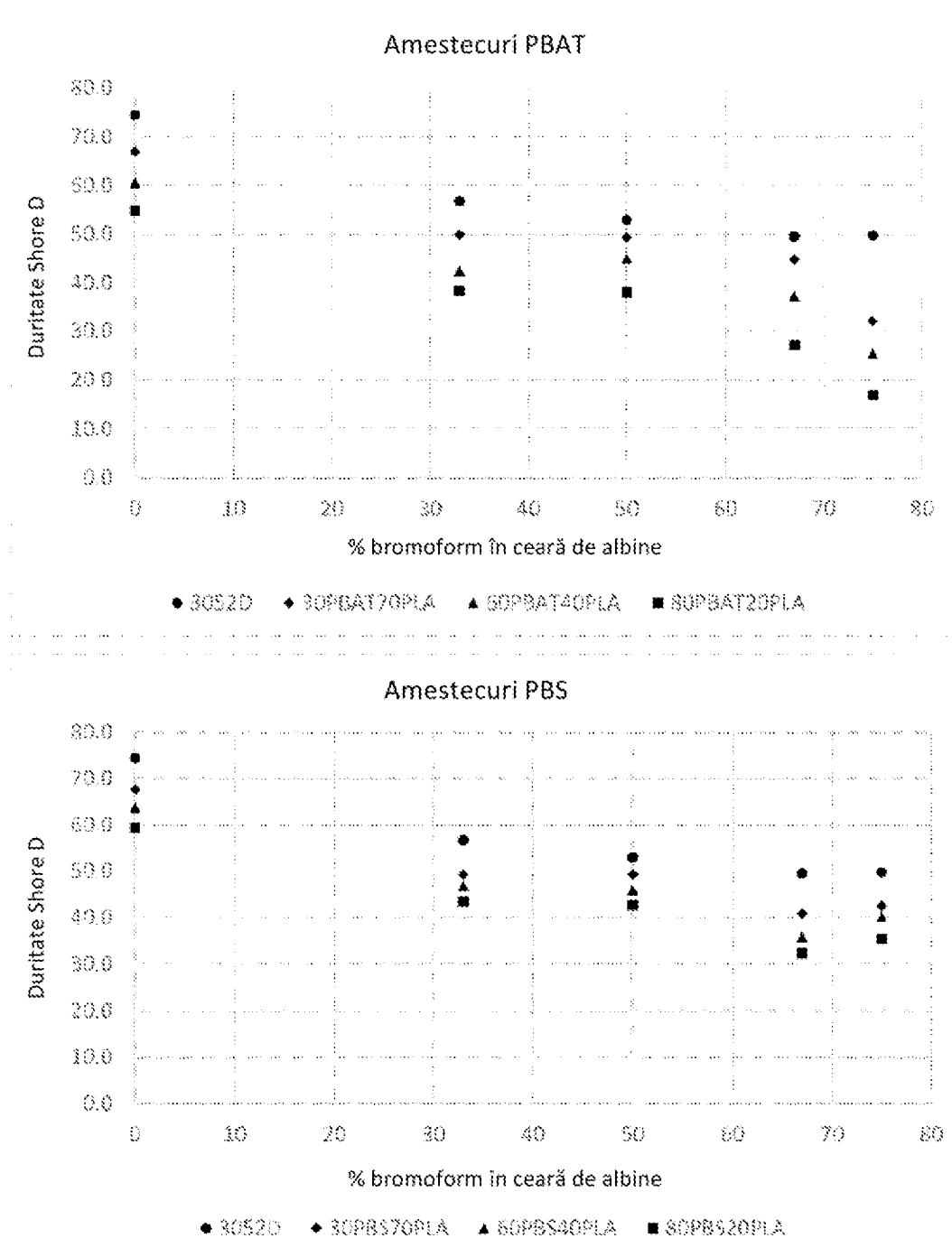


Figure 18A

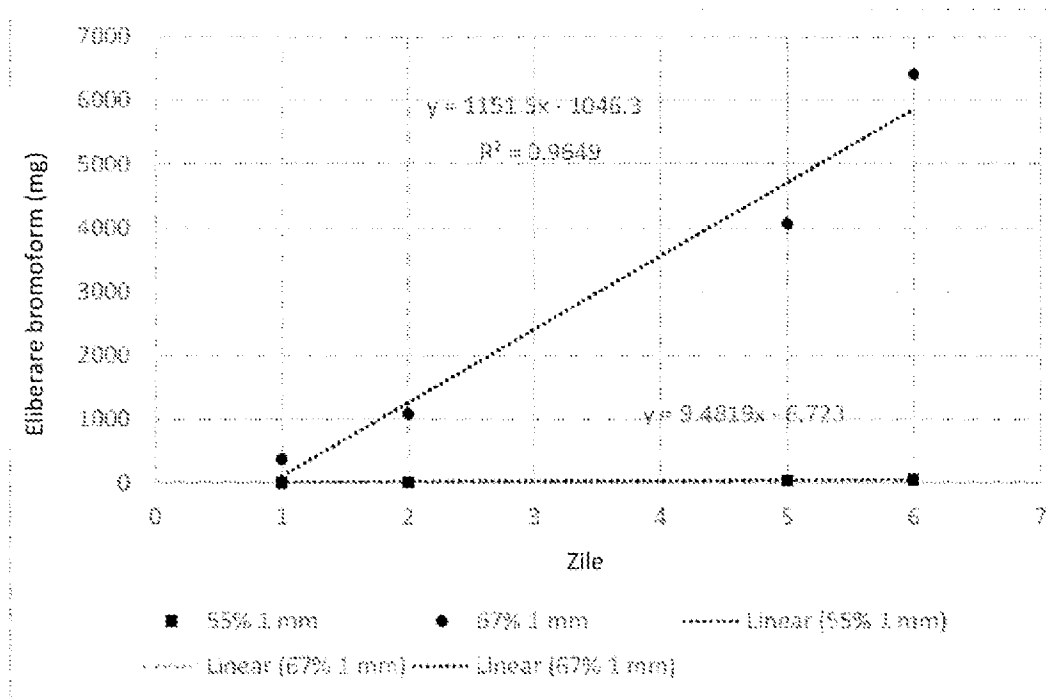


Figure 18B

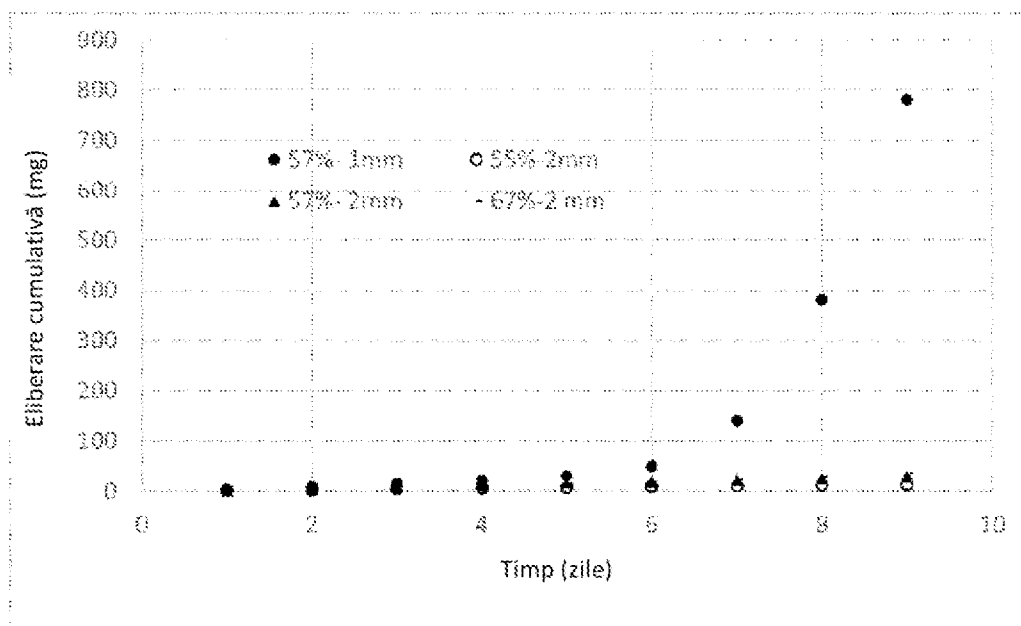


Figure 18C

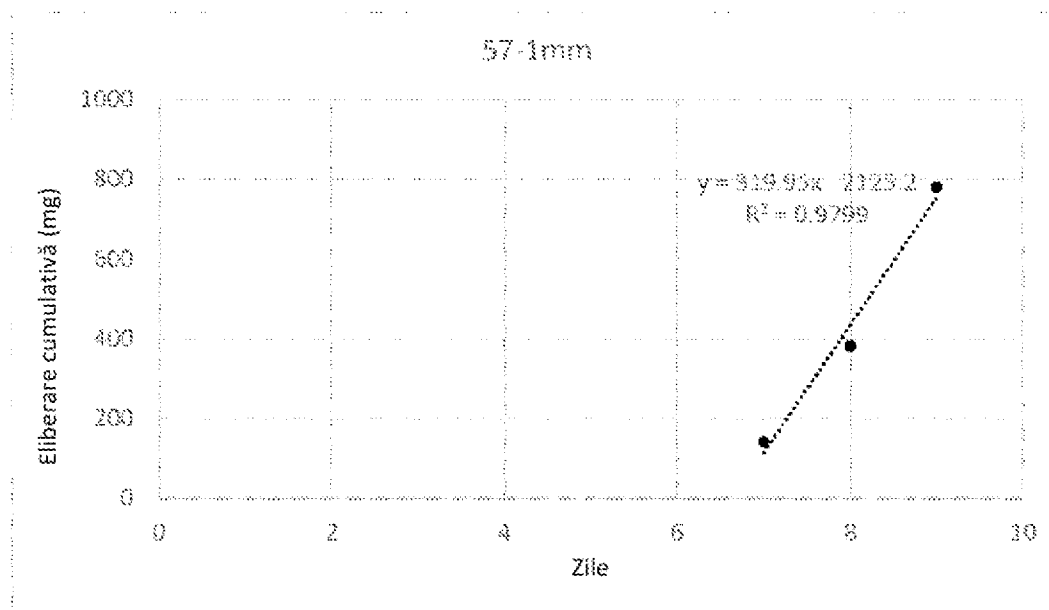


Figure 18D

