

COMPOSICIONES ESTABILIZADAS

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

- 5 El campo técnico de la invención se refiere a composiciones estabilizadas para reducir y/o inhibir la metanogénesis en el tracto digestivo de rumiantes, incluidos procesos para su producción, y métodos para su administración a rumiantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 Se propone que el siguiente análisis de la técnica de antecedentes facilite un entendimiento de la presente invención solamente. El análisis no es un reconocimiento o admisión de que cualquiera de los materiales a los que se hace referencia es o era parte del conocimiento general común en la fecha de prioridad de la solicitud.

- 15 De acuerdo con una valoración reciente de UN, la cría de ganado y ganadería de rumiantes en general producen más gases de efecto invernadero de calentamiento global, como se mide en equivalentes de dióxido de carbono (CO₂), que el transporte. Se estima que los rumiantes representan 10 % de las emisiones totales de gases de efecto invernadero en Australia. Los rumiantes producen metano (CH₄) como subproducto de la digestión mediante la fermentación de alimento microbiana anaeróbica en el rumen y en menor medida, en el intestino grueso. Este proceso se refiere como metanogénesis.

- 20 El metano absorbe la radiación infrarroja solar de manera eficiente y tiene un potencial de calentamiento global 25 veces mayor que el de CO₂. La población microbiana ruminal se conforma de bacterias, protozoos, hongos y bacteriófagos, todos los cuales trabajan conjuntamente para digerir la materia orgánica ingerida y producir CO₂, H₂, ácidos grasos volátiles y formiatos. Estos productos finales se usan por arqueas metanogénicas en el rumen, que produce CH₄. Aunque la generación de CH₄ reduce la presión parcial de H₂, esto tiene el potencial de provocar problemas, ya que también limita la cantidad de energía y carbono disponible para la síntesis de ácidos grasos volátiles, que son críticos para la nutrición de rumiantes y pueden restringir la fermentación de rumen. La mayoría del CH₄ generado por los rumiantes se exhala o se descarga mediante la boca, dando por resultado un desperdicio de hasta 12 % de la ingesta calórica bruta en la dieta de rumiantes.

Las técnicas de mitigación de metanogénesis entérica son cruciales para la viabilidad económica y ambiental en curso de las industrias de ganadería de rumiantes, y los métodos para reducir la producción total de gas y/o la generación de metano en animales rumiantes plantean un grave desafío.

- 5 Entre varios inhibidores químicos y derivados de plantas y posibles dietas reductoras de metanogénesis probadas, la macroalga de alga roja antimetanogénica natural *Asparagopsis taxiformis* se ha mostrado ser prometedora recientemente, con efectos inhibidores de metano dependientes de dosis que tienen un impacto mínimo en otros parámetros de fermentación de rumen. Sin embargo, al igual que con cualquier suplemento
- 10 alimenticio basado en plantas derivado de manera natural, los desafíos se plantean por la falta de producción sostenible a escala comercial, así como inconsistencias en la actividad biológica de muestra a muestra que surgen de variaciones en el fenotipo y/o quimiotipo de muestras obtenidas de diferentes ubicaciones, y debido a condiciones ambientales variables. Esta variabilidad introduce incertidumbres significativas en torno a los regímenes de dosis
- 15 seguros y efectivos en estas soluciones basadas en plantas para limitar la metanogénesis en rumiantes.

- La inhibición de la metanogénesis en rumiantes mediante la suplementación de su alimento con *Asparagopsis taxiformis* se atribuye en gran medida al compuesto bromoformo, que está presente en el aceite esencial de las algas marinas en concentraciones de hasta
- 20 80 % (p/p), junto con numerosos diferentes compuestos orgánicos que contienen bromo, cloro y yodo, incluido bromometano, bromoclorometano y otros compuestos halogenados volátiles. *A. taxiformis* contiene entre 0,19 y 4,39 mg/g (peso seco) de bromoformo.

- Por lo tanto, la administración directa de bromoformo sintético como suplemento alimenticio para inhibir la metanogénesis en rumiantes representa una perspectiva atractiva
- 25 para abordar los desafíos analizados anteriormente en relación con el uso de productos de algas marinas como suplemento alimenticio. Sin embargo, el bromoformo puro o sintético plantea varios problemas alternativos, en particular debido a su volatilidad y toxicidad ambiental asociada. Además, se cree que el bromo suministrado a la atmósfera por compuestos volátiles tal como bromoformo juega un papel significativo en la participación en
- 30 la química que agota el ozono, exacerbando adicionalmente los problemas de calentamiento global que enfrentamos ahora.

Ante este panorama se ha desarrollado la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una modalidad, la divulgación en la presente proporciona una composición para reducir o inhibir la metanogénesis en rumiantes que comprende un compuesto de halocarburo y uno o más agentes estabilizadores.

- 5** En una modalidad preferida, la composición no comprende macroalgas marinas rojas ni una levadura recombinante productora de halocarburo, o el compuesto de halocarburo no es un extracto de macroalgas marinas rojas, o un extracto de una levadura recombinante productora de halocarburo, o cloroformo, o tetracloruro de carbono, o cloruro de metileno, o hexacloroetano, o bromoclorometano, o bromocloroetano, o bromocloropropano, o halotano, **10** o 2-bromoetano sulfonato, o 2-bromo-2-cloroetano sulfonato.

En una modalidad, la divulgación en la presente proporciona una composición para reducir o inhibir la metanogénesis en rumiantes que comprende un compuesto de halocarburo, en donde el compuesto de halocarburo se estabiliza.

- 15** En una modalidad, la divulgación en la presente proporciona una composición estabilizada para reducir o inhibir la metanogénesis en rumiantes que comprende un compuesto de halocarburo seleccionado del grupo que consiste en haloalcanos, haloalquenos, haloaromáticos, ácidos carboxílicos halogenados y sus ésteres correspondientes, alcoholes de haloalquilo, haloalquil éteres, aminas de haloalquilo y sales de los mismos, haloalquil tioéteres y amidas de haloalquilo, incluidas mezclas de cualquiera **20** de los compuestos de halocarburo mencionados anteriormente y/o metabolitos de cualquiera de los compuestos de halocarburo mencionados anteriormente.

En una modalidad preferida, la divulgación en la presente proporciona una composición estabilizada para reducir o inhibir la metanogénesis en rumiantes que comprende bromoformo.

- 25** En una modalidad preferida, la divulgación en la presente proporciona una composición estabilizada para reducir o inhibir la metanogénesis en rumiantes que comprende bromoformo estabilizado.

- 30** En una modalidad, la divulgación en la presente proporciona una composición estabilizada para reducir o inhibir la metanogénesis en rumiantes que comprende un compuesto de halocarburo, en donde el compuesto de halocarburo se estabiliza en términos de tener una volatilidad reducida en la composición, en comparación con la volatilidad

observada en el halocarburo aislado.

En una modalidad preferida, la divulgación en la presente proporciona una composición estabilizada para reducir o inhibir la metanogénesis en rumiantes que comprende bromoformo estabilizado en donde el bromoformo se estabiliza en términos de tener una volatilidad reducida en la composición, en comparación con la volatilidad observada en el bromoformo aislado.

En algunas modalidades, la estabilización del compuesto de halocarburo en las composiciones de la invención, es estabilización en términos de tener volatilidad reducida en la composición, en comparación con la volatilidad observada en el halocarburo aislado, preferentemente en donde la volatilidad reducida se mide mediante la comparación de una medición de la presión de vapor de la composición con una medición de la presión de vapor del halocarburo aislado, en donde ambas mediciones se toman a la misma temperatura.

En modalidades preferidas, la estabilización del bromoformo en las composiciones de la invención, es estabilización en términos de tener volatilidad reducida en la composición, en comparación con la volatilidad observada en el bromoformo aislado, preferentemente en donde la volatilidad reducida se mide mediante la comparación de una medición de la presión de vapor de la composición con una medición de la presión de vapor del bromoformo aislado, en donde ambas mediciones se toman a la misma temperatura.

En algunas modalidades, la estabilización del compuesto de halocarburo en las composiciones de la invención, es estabilización en términos de tener volatilidad reducida en la composición, en comparación con la volatilidad observada en el halocarburo aislado, en donde la volatilidad reducida se mide mediante la comparación del % de pérdida del compuesto de halocarburo de la composición durante un período de tiempo, con el % de pérdida de halocarburo aislado de una muestra del halocarburo aislado durante el mismo período de tiempo, y en donde tanto la composición como el halocarburo aislado se almacenan bajo condiciones idénticas; preferentemente en donde el % de pérdida del compuesto de halocarburo de la composición durante un período de tiempo se mide mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en GC-MS, o LC-MS, GC-FID o ICP-AES; preferentemente en donde el % de pérdida de la muestra del halocarburo aislado durante el mismo período de tiempo se mide mediante análisis gravimétrico.

En modalidades preferidas, la estabilización del bromoformo en las composiciones de la invención, es estabilización en términos de tener volatilidad reducida en la composición, en

comparación con la volatilidad observada en el bromoformo aislado, en donde la volatilidad reducida se mide mediante la comparación del % de pérdida del bromoformo de la composición durante un período de tiempo, con el % de pérdida de bromoformo de una muestra del bromoformo aislado durante el mismo período de tiempo, y en donde tanto la

5 composición como el bromoformo aislado se almacenan bajo condiciones idénticas; preferentemente en donde el % de pérdida del bromoformo de la composición durante un período de tiempo se mide mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en GC-MS, o LC-MS, GC-FID o ICP-AES; preferentemente en donde el % de pérdida de la muestra del bromoformo aislado durante el mismo período de tiempo se mide mediante

10 análisis gravimétrico.

En algunas modalidades, la estabilización del compuesto de halocarburo en las composiciones de la invención, es estabilización en términos de tener pérdida reducida del compuesto de halocarburo en la composición, en comparación con la pérdida observada en el halocarburo aislado, en donde la pérdida reducida se mide mediante la comparación del %

15 de pérdida del compuesto de halocarburo de la composición durante un período de tiempo, con el % de pérdida de halocarburo aislado de una muestra del halocarburo aislado durante el mismo período de tiempo, y en donde tanto la composición como el halocarburo aislado se almacenan bajo condiciones idénticas; preferentemente en donde el % de pérdida del compuesto de halocarburo de la composición durante un período de tiempo se mide mediante

20 uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en GC-MS o LC-MS, GC-FID o ICP-AES; opcionalmente en donde se mide el % de pérdida de la muestra del halocarburo aislado durante el mismo período de tiempo se mide mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en GC-MS, o LC-MS, GC-FID o ICP-AES; preferentemente en donde el % de pérdida de la muestra del halocarburo aislado durante el mismo período de tiempo se

25 mide mediante análisis gravimétrico.

En modalidades preferidas, la estabilización del bromoformo en las composiciones de la invención, es estabilización en términos de tener pérdida reducida del bromoformo en la composición, en comparación con la pérdida observada en el bromoformo aislado, en donde la pérdida reducida se mide mediante la comparación del % de pérdida del bromoformo de la

30 composición durante un período de tiempo, con el % de pérdida de bromoformo aislado de una muestra del bromoformo aislado durante el mismo período de tiempo, y en donde tanto la composición como el bromoformo aislado se almacenan bajo condiciones idénticas; preferentemente en donde el % de pérdida del bromoformo de la composición durante un período de tiempo se mide mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que

consiste en GC-MS o LC-MS, GC-FID o ICP-AES; opcionalmente en donde se mide el % de pérdida de la muestra del bromoformo aislado durante el mismo período de tiempo se mide mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en GC-MS, o LC-MS, GC-FID o ICP-AES; preferentemente en donde el % de pérdida de la muestra del bromoformo aislado durante el mismo período de tiempo se mide mediante análisis gravimétrico.

En algunas modalidades, el compuesto de halocarburo en las composiciones de la invención es X % más estable durante un período de tiempo t, que el correspondiente compuesto de halocarburo aislado, en donde X % se encuentra dentro del intervalo de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5000 %, y t es un número entero que representa un número de días.

En modalidades preferidas, el bromoformo en las composiciones de la invención es X % más estable durante un período de tiempo t, que el bromoformo aislado, en donde X % se encuentra dentro del intervalo de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5000 %, y t es un número entero que representa un número de días.

En algunas modalidades, X % (más estable) se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371,

372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390,
391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409,
410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428,
429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447,
5 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466,
467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485,
486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504,
505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523,
524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542,
10 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561,
562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580,
581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599,
600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618,
619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637,
15 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656,
657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675,
676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694,
695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713,
714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732,
20 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751,
752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770,
771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789,
790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808,
809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827,
25 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846,
847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865,
866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884,
885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903,
904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922,
30 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941,
942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960,
961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979,
980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998,
999, 1000, 1001, 1002, 1003, 1004, 1005, 1006, 1007, 1008, 1009, 1010, 1011, 1012, 1013,
35 1014, 1015, 1016, 1017, 1018, 1019, 1020, 1021, 1022, 1023, 1024, 1025, 1026, 1027, 1028,

1029, 1030, 1031, 1032, 1033, 1034, 1035, 1036, 1037, 1038, 1039, 1040, 1041, 1042, 1043,
1044, 1045, 1046, 1047, 1048, 1049, 1050, 1051, 1052, 1053, 1054, 1055, 1056, 1057, 1058,
1059, 1060, 1061, 1062, 1063, 1064, 1065, 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073,
1074, 1075, 1076, 1077, 1078, 1079, 1080, 1081, 1082, 1083, 1084, 1085, 1086, 1087, 1088,
5 1089, 1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096, 1097, 1098, 1099, 1100, 1101, 1102, 1103,
1104, 1105, 1106, 1107, 1108, 1109, 1110, 1111, 1112, 1113, 1114, 1115, 1116, 1117, 1118,
1119, 1120, 1121, 1122, 1123, 1124, 1125, 1126, 1127, 1128, 1129, 1130, 1131, 1132, 1133,
1134, 1135, 1136, 1137, 1138, 1139, 1140, 1141, 1142, 1143, 1144, 1145, 1146, 1147, 1148,
1149, 1150, 1151, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1157, 1158, 1159, 1160, 1161, 1162, 1163,
10 1164, 1165, 1166, 1167, 1168, 1169, 1170, 1171, 1172, 1173, 1174, 1175, 1176, 1177, 1178,
1179, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184, 1185, 1186, 1187, 1188, 1189, 1190, 1191, 1192, 1193,
1194, 1195, 1196, 1197, 1198, 1199, 1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208,
1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214, 1215, 1216, 1217, 1218, 1219, 1220, 1221, 1222, 1223,
1224, 1225, 1226, 1227, 1228, 1229, 1230, 1231, 1232, 1233, 1234, 1235, 1236, 1237, 1238,
15 1239, 1240, 1241, 1242, 1243, 1244, 1245, 1246, 1247, 1248, 1249, 1250, 1251, 1252, 1253,
1254, 1255, 1256, 1257, 1258, 1259, 1260, 1261, 1262, 1263, 1264, 1265, 1266, 1267, 1268,
1269, 1270, 1271, 1272, 1273, 1274, 1275, 1276, 1277, 1278, 1279, 1280, 1281, 1282, 1283,
1284, 1285, 1286, 1287, 1288, 1289, 1290, 1291, 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298,
1299, 1300, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1306, 1307, 1308, 1309, 1310, 1311, 1312, 1313,
20 1314, 1315, 1316, 1317, 1318, 1319, 1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328,
1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335, 1336, 1337, 1338, 1339, 1340, 1341, 1342, 1343,
1344, 1345, 1346, 1347, 1348, 1349, 1350, 1351, 1352, 1353, 1354, 1355, 1356, 1357, 1358,
1359, 1360, 1361, 1362, 1363, 1364, 1365, 1366, 1367, 1368, 1369, 1370, 1371, 1372, 1373,
1374, 1375, 1376, 1377, 1378, 1379, 1380, 1381, 1382, 1383, 1384, 1385, 1386, 1387, 1388,
25 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396, 1397, 1398, 1399, 1400, 1401, 1402, 1403,
1404, 1405, 1406, 1407, 1408, 1409, 1410, 1411, 1412, 1413, 1414, 1415, 1416, 1417, 1418,
1419, 1420, 1421, 1422, 1423, 1424, 1425, 1426, 1427, 1428, 1429, 1430, 1431, 1432, 1433,
1434, 1435, 1436, 1437, 1438, 1439, 1440, 1441, 1442, 1443, 1444, 1445, 1446, 1447, 1448,
1449, 1450, 1451, 1452, 1453, 1454, 1455, 1456, 1457, 1458, 1459, 1460, 1461, 1462, 1463,
30 1464, 1465, 1466, 1467, 1468, 1469, 1470, 1471, 1472, 1473, 1474, 1475, 1476, 1477, 1478,
1479, 1480, 1481, 1482, 1483, 1484, 1485, 1486, 1487, 1488, 1489, 1490, 1491, 1492, 1493,
1494, 1495, 1496, 1497, 1498, 1499, 1500, 1501, 1502, 1503, 1504, 1505, 1506, 1507, 1508,
1509, 1510, 1511, 1512, 1513, 1514, 1515, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1523,
1524, 1525, 1526, 1527, 1528, 1529, 1530, 1531, 1532, 1533, 1534, 1535, 1536, 1537, 1538,
35 1539, 1540, 1541, 1542, 1543, 1544, 1545, 1546, 1547, 1548, 1549, 1550, 1551, 1552, 1553,

1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559, 1560, 1561, 1562, 1563, 1564, 1565, 1566, 1567, 1568,
 1569, 1570, 1571, 1572, 1573, 1574, 1575, 1576, 1577, 1578, 1579, 1580, 1581, 1582, 1583,
 1584, 1585, 1586, 1587, 1588, 1589, 1590, 1591, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598,
 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605, 1606, 1607, 1608, 1609, 1610, 1611, 1612, 1613,
5 1614, 1615, 1616, 1617, 1618, 1619, 1620, 1621, 1622, 1623, 1624, 1625, 1626, 1627, 1628,
 1629, 1630, 1631, 1632, 1633, 1634, 1635, 1636, 1637, 1638, 1639, 1640, 1641, 1642, 1643,
 1644, 1645, 1646, 1647, 1648, 1649, 1650, 1651, 1652, 1653, 1654, 1655, 1656, 1657, 1658,
 1659, 1660, 1661, 1662, 1663, 1664, 1665, 1666, 1667, 1668, 1669, 1670, 1671, 1672, 1673,
 1674, 1675, 1676, 1677, 1678, 1679, 1680, 1681, 1682, 1683, 1684, 1685, 1686, 1687, 1688,
10 1689, 1690, 1691, 1692, 1693, 1694, 1695, 1696, 1697, 1698, 1699, 1700, 1701, 1702, 1703,
 1704, 1705, 1706, 1707, 1708, 1709, 1710, 1711, 1712, 1713, 1714, 1715, 1716, 1717, 1718,
 1719, 1720, 1721, 1722, 1723, 1724, 1725, 1726, 1727, 1728, 1729, 1730, 1731, 1732, 1733,
 1734, 1735, 1736, 1737, 1738, 1739, 1740, 1741, 1742, 1743, 1744, 1745, 1746, 1747, 1748,
 1749, 1750, 1751, 1752, 1753, 1754, 1755, 1756, 1757, 1758, 1759, 1760, 1761, 1762, 1763,
15 1764, 1765, 1766, 1767, 1768, 1769, 1770, 1771, 1772, 1773, 1774, 1775, 1776, 1777, 1778,
 1779, 1780, 1781, 1782, 1783, 1784, 1785, 1786, 1787, 1788, 1789, 1790, 1791, 1792, 1793,
 1794, 1795, 1796, 1797, 1798, 1799, 1800, 1801, 1802, 1803, 1804, 1805, 1806, 1807, 1808,
 1809, 1810, 1811, 1812, 1813, 1814, 1815, 1816, 1817, 1818, 1819, 1820, 1821, 1822, 1823,
 1824, 1825, 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832, 1833, 1834, 1835, 1836, 1837, 1838,
20 1839, 1840, 1841, 1842, 1843, 1844, 1845, 1846, 1847, 1848, 1849, 1850, 1851, 1852, 1853,
 1854, 1855, 1856, 1857, 1858, 1859, 1860, 1861, 1862, 1863, 1864, 1865, 1866, 1867, 1868,
 1869, 1870, 1871, 1872, 1873, 1874, 1875, 1876, 1877, 1878, 1879, 1880, 1881, 1882, 1883,
 1884, 1885, 1886, 1887, 1888, 1889, 1890, 1891, 1892, 1893, 1894, 1895, 1896, 1897, 1898,
 1899, 1900, 1901, 1902, 1903, 1904, 1905, 1906, 1907, 1908, 1909, 1910, 1911, 1912, 1913,
25 1914, 1915, 1916, 1917, 1918, 1919, 1920, 1921, 1922, 1923, 1924, 1925, 1926, 1927, 1928,
 1929, 1930, 1931, 1932, 1933, 1934, 1935, 1936, 1937, 1938, 1939, 1940, 1941, 1942, 1943,
 1944, 1945, 1946, 1947, 1948, 1949, 1950, 1951, 1952, 1953, 1954, 1955, 1956, 1957, 1958,
 1959, 1960, 1961, 1962, 1963, 1964, 1965, 1966, 1967, 1968, 1969, 1970, 1971, 1972, 1973,
 1974, 1975, 1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988,
30 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003,
 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018,
 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033,
 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048,
 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063,
35 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078,

2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093,
2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108,
2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123,
2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138,
5 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153,
2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168,
2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183,
2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198,
2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213,
10 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228,
2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243,
2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258,
2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273,
2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288,
15 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303,
2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318,
2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333,
2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348,
2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363,
20 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378,
2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393,
2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408,
2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423,
2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438,
25 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453,
2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468,
2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483,
2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498,
2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513,
30 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528,
2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543,
2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558,
2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573,
2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588,
35 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603,

2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618,
2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633,
2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639, 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648,
2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654, 2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663,
5 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, 2669, 2670, 2671, 2672, 2673, 2674, 2675, 2676, 2677, 2678,
2679, 2680, 2681, 2682, 2683, 2684, 2685, 2686, 2687, 2688, 2689, 2690, 2691, 2692, 2693,
2694, 2695, 2696, 2697, 2698, 2699, 2700, 2701, 2702, 2703, 2704, 2705, 2706, 2707, 2708,
2709, 2710, 2711, 2712, 2713, 2714, 2715, 2716, 2717, 2718, 2719, 2720, 2721, 2722, 2723,
2724, 2725, 2726, 2727, 2728, 2729, 2730, 2731, 2732, 2733, 2734, 2735, 2736, 2737, 2738,
10 2739, 2740, 2741, 2742, 2743, 2744, 2745, 2746, 2747, 2748, 2749, 2750, 2751, 2752, 2753,
2754, 2755, 2756, 2757, 2758, 2759, 2760, 2761, 2762, 2763, 2764, 2765, 2766, 2767, 2768,
2769, 2770, 2771, 2772, 2773, 2774, 2775, 2776, 2777, 2778, 2779, 2780, 2781, 2782, 2783,
2784, 2785, 2786, 2787, 2788, 2789, 2790, 2791, 2792, 2793, 2794, 2795, 2796, 2797, 2798,
2799, 2800, 2801, 2802, 2803, 2804, 2805, 2806, 2807, 2808, 2809, 2810, 2811, 2812, 2813,
15 2814, 2815, 2816, 2817, 2818, 2819, 2820, 2821, 2822, 2823, 2824, 2825, 2826, 2827, 2828,
2829, 2830, 2831, 2832, 2833, 2834, 2835, 2836, 2837, 2838, 2839, 2840, 2841, 2842, 2843,
2844, 2845, 2846, 2847, 2848, 2849, 2850, 2851, 2852, 2853, 2854, 2855, 2856, 2857, 2858,
2859, 2860, 2861, 2862, 2863, 2864, 2865, 2866, 2867, 2868, 2869, 2870, 2871, 2872, 2873,
2874, 2875, 2876, 2877, 2878, 2879, 2880, 2881, 2882, 2883, 2884, 2885, 2886, 2887, 2888,
20 2889, 2890, 2891, 2892, 2893, 2894, 2895, 2896, 2897, 2898, 2899, 2900, 2901, 2902, 2903,
2904, 2905, 2906, 2907, 2908, 2909, 2910, 2911, 2912, 2913, 2914, 2915, 2916, 2917, 2918,
2919, 2920, 2921, 2922, 2923, 2924, 2925, 2926, 2927, 2928, 2929, 2930, 2931, 2932, 2933,
2934, 2935, 2936, 2937, 2938, 2939, 2940, 2941, 2942, 2943, 2944, 2945, 2946, 2947, 2948,
2949, 2950, 2951, 2952, 2953, 2954, 2955, 2956, 2957, 2958, 2959, 2960, 2961, 2962, 2963,
25 2964, 2965, 2966, 2967, 2968, 2969, 2970, 2971, 2972, 2973, 2974, 2975, 2976, 2977, 2978,
2979, 2980, 2981, 2982, 2983, 2984, 2985, 2986, 2987, 2988, 2989, 2990, 2991, 2992, 2993,
2994, 2995, 2996, 2997, 2998, 2999, 3000, 3001, 3002, 3003, 3004, 3005, 3006, 3007, 3008,
3009, 3010, 3011, 3012, 3013, 3014, 3015, 3016, 3017, 3018, 3019, 3020, 3021, 3022, 3023,
3024, 3025, 3026, 3027, 3028, 3029, 3030, 3031, 3032, 3033, 3034, 3035, 3036, 3037, 3038,
30 3039, 3040, 3041, 3042, 3043, 3044, 3045, 3046, 3047, 3048, 3049, 3050, 3051, 3052, 3053,
3054, 3055, 3056, 3057, 3058, 3059, 3060, 3061, 3062, 3063, 3064, 3065, 3066, 3067, 3068,
3069, 3070, 3071, 3072, 3073, 3074, 3075, 3076, 3077, 3078, 3079, 3080, 3081, 3082, 3083,
3084, 3085, 3086, 3087, 3088, 3089, 3090, 3091, 3092, 3093, 3094, 3095, 3096, 3097, 3098,
3099, 3100, 3101, 3102, 3103, 3104, 3105, 3106, 3107, 3108, 3109, 3110, 3111, 3112, 3113,
35 3114, 3115, 3116, 3117, 3118, 3119, 3120, 3121, 3122, 3123, 3124, 3125, 3126, 3127, 3128,

3129, 3130, 3131, 3132, 3133, 3134, 3135, 3136, 3137, 3138, 3139, 3140, 3141, 3142, 3143,
3144, 3145, 3146, 3147, 3148, 3149, 3150, 3151, 3152, 3153, 3154, 3155, 3156, 3157, 3158,
3159, 3160, 3161, 3162, 3163, 3164, 3165, 3166, 3167, 3168, 3169, 3170, 3171, 3172, 3173,
3174, 3175, 3176, 3177, 3178, 3179, 3180, 3181, 3182, 3183, 3184, 3185, 3186, 3187, 3188,
5 3189, 3190, 3191, 3192, 3193, 3194, 3195, 3196, 3197, 3198, 3199, 3200, 3201, 3202, 3203,
3204, 3205, 3206, 3207, 3208, 3209, 3210, 3211, 3212, 3213, 3214, 3215, 3216, 3217, 3218,
3219, 3220, 3221, 3222, 3223, 3224, 3225, 3226, 3227, 3228, 3229, 3230, 3231, 3232, 3233,
3234, 3235, 3236, 3237, 3238, 3239, 3240, 3241, 3242, 3243, 3244, 3245, 3246, 3247, 3248,
3249, 3250, 3251, 3252, 3253, 3254, 3255, 3256, 3257, 3258, 3259, 3260, 3261, 3262, 3263,
10 3264, 3265, 3266, 3267, 3268, 3269, 3270, 3271, 3272, 3273, 3274, 3275, 3276, 3277, 3278,
3279, 3280, 3281, 3282, 3283, 3284, 3285, 3286, 3287, 3288, 3289, 3290, 3291, 3292, 3293,
3294, 3295, 3296, 3297, 3298, 3299, 3300, 3301, 3302, 3303, 3304, 3305, 3306, 3307, 3308,
3309, 3310, 3311, 3312, 3313, 3314, 3315, 3316, 3317, 3318, 3319, 3320, 3321, 3322, 3323,
3324, 3325, 3326, 3327, 3328, 3329, 3330, 3331, 3332, 3333, 3334, 3335, 3336, 3337, 3338,
15 3339, 3340, 3341, 3342, 3343, 3344, 3345, 3346, 3347, 3348, 3349, 3350, 3351, 3352, 3353,
3354, 3355, 3356, 3357, 3358, 3359, 3360, 3361, 3362, 3363, 3364, 3365, 3366, 3367, 3368,
3369, 3370, 3371, 3372, 3373, 3374, 3375, 3376, 3377, 3378, 3379, 3380, 3381, 3382, 3383,
3384, 3385, 3386, 3387, 3388, 3389, 3390, 3391, 3392, 3393, 3394, 3395, 3396, 3397, 3398,
3399, 3400, 3401, 3402, 3403, 3404, 3405, 3406, 3407, 3408, 3409, 3410, 3411, 3412, 3413,
20 3414, 3415, 3416, 3417, 3418, 3419, 3420, 3421, 3422, 3423, 3424, 3425, 3426, 3427, 3428,
3429, 3430, 3431, 3432, 3433, 3434, 3435, 3436, 3437, 3438, 3439, 3440, 3441, 3442, 3443,
3444, 3445, 3446, 3447, 3448, 3449, 3450, 3451, 3452, 3453, 3454, 3455, 3456, 3457, 3458,
3459, 3460, 3461, 3462, 3463, 3464, 3465, 3466, 3467, 3468, 3469, 3470, 3471, 3472, 3473,
3474, 3475, 3476, 3477, 3478, 3479, 3480, 3481, 3482, 3483, 3484, 3485, 3486, 3487, 3488,
25 3489, 3490, 3491, 3492, 3493, 3494, 3495, 3496, 3497, 3498, 3499, 3500, 3501, 3502, 3503,
3504, 3505, 3506, 3507, 3508, 3509, 3510, 3511, 3512, 3513, 3514, 3515, 3516, 3517, 3518,
3519, 3520, 3521, 3522, 3523, 3524, 3525, 3526, 3527, 3528, 3529, 3530, 3531, 3532, 3533,
3534, 3535, 3536, 3537, 3538, 3539, 3540, 3541, 3542, 3543, 3544, 3545, 3546, 3547, 3548,
3549, 3550, 3551, 3552, 3553, 3554, 3555, 3556, 3557, 3558, 3559, 3560, 3561, 3562, 3563,
30 3564, 3565, 3566, 3567, 3568, 3569, 3570, 3571, 3572, 3573, 3574, 3575, 3576, 3577, 3578,
3579, 3580, 3581, 3582, 3583, 3584, 3585, 3586, 3587, 3588, 3589, 3590, 3591, 3592, 3593,
3594, 3595, 3596, 3597, 3598, 3599, 3600, 3601, 3602, 3603, 3604, 3605, 3606, 3607, 3608,
3609, 3610, 3611, 3612, 3613, 3614, 3615, 3616, 3617, 3618, 3619, 3620, 3621, 3622, 3623,
3624, 3625, 3626, 3627, 3628, 3629, 3630, 3631, 3632, 3633, 3634, 3635, 3636, 3637, 3638,
35 3639, 3640, 3641, 3642, 3643, 3644, 3645, 3646, 3647, 3648, 3649, 3650, 3651, 3652, 3653,

3654, 3655, 3656, 3657, 3658, 3659, 3660, 3661, 3662, 3663, 3664, 3665, 3666, 3667, 3668,
3669, 3670, 3671, 3672, 3673, 3674, 3675, 3676, 3677, 3678, 3679, 3680, 3681, 3682, 3683,
3684, 3685, 3686, 3687, 3688, 3689, 3690, 3691, 3692, 3693, 3694, 3695, 3696, 3697, 3698,
3699, 3700, 3701, 3702, 3703, 3704, 3705, 3706, 3707, 3708, 3709, 3710, 3711, 3712, 3713,
5 3714, 3715, 3716, 3717, 3718, 3719, 3720, 3721, 3722, 3723, 3724, 3725, 3726, 3727, 3728,
3729, 3730, 3731, 3732, 3733, 3734, 3735, 3736, 3737, 3738, 3739, 3740, 3741, 3742, 3743,
3744, 3745, 3746, 3747, 3748, 3749, 3750, 3751, 3752, 3753, 3754, 3755, 3756, 3757, 3758,
3759, 3760, 3761, 3762, 3763, 3764, 3765, 3766, 3767, 3768, 3769, 3770, 3771, 3772, 3773,
3774, 3775, 3776, 3777, 3778, 3779, 3780, 3781, 3782, 3783, 3784, 3785, 3786, 3787, 3788,
10 3789, 3790, 3791, 3792, 3793, 3794, 3795, 3796, 3797, 3798, 3799, 3800, 3801, 3802, 3803,
3804, 3805, 3806, 3807, 3808, 3809, 3810, 3811, 3812, 3813, 3814, 3815, 3816, 3817, 3818,
3819, 3820, 3821, 3822, 3823, 3824, 3825, 3826, 3827, 3828, 3829, 3830, 3831, 3832, 3833,
3834, 3835, 3836, 3837, 3838, 3839, 3840, 3841, 3842, 3843, 3844, 3845, 3846, 3847, 3848,
3849, 3850, 3851, 3852, 3853, 3854, 3855, 3856, 3857, 3858, 3859, 3860, 3861, 3862, 3863,
15 3864, 3865, 3866, 3867, 3868, 3869, 3870, 3871, 3872, 3873, 3874, 3875, 3876, 3877, 3878,
3879, 3880, 3881, 3882, 3883, 3884, 3885, 3886, 3887, 3888, 3889, 3890, 3891, 3892, 3893,
3894, 3895, 3896, 3897, 3898, 3899, 3900, 3901, 3902, 3903, 3904, 3905, 3906, 3907, 3908,
3909, 3910, 3911, 3912, 3913, 3914, 3915, 3916, 3917, 3918, 3919, 3920, 3921, 3922, 3923,
3924, 3925, 3926, 3927, 3928, 3929, 3930, 3931, 3932, 3933, 3934, 3935, 3936, 3937, 3938,
20 3939, 3940, 3941, 3942, 3943, 3944, 3945, 3946, 3947, 3948, 3949, 3950, 3951, 3952, 3953,
3954, 3955, 3956, 3957, 3958, 3959, 3960, 3961, 3962, 3963, 3964, 3965, 3966, 3967, 3968,
3969, 3970, 3971, 3972, 3973, 3974, 3975, 3976, 3977, 3978, 3979, 3980, 3981, 3982, 3983,
3984, 3985, 3986, 3987, 3988, 3989, 3990, 3991, 3992, 3993, 3994, 3995, 3996, 3997, 3998,
3999, 4000, 4001, 4002, 4003, 4004, 4005, 4006, 4007, 4008, 4009, 4010, 4011, 4012, 4013,
25 4014, 4015, 4016, 4017, 4018, 4019, 4020, 4021, 4022, 4023, 4024, 4025, 4026, 4027, 4028,
4029, 4030, 4031, 4032, 4033, 4034, 4035, 4036, 4037, 4038, 4039, 4040, 4041, 4042, 4043,
4044, 4045, 4046, 4047, 4048, 4049, 4050, 4051, 4052, 4053, 4054, 4055, 4056, 4057, 4058,
4059, 4060, 4061, 4062, 4063, 4064, 4065, 4066, 4067, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073,
4074, 4075, 4076, 4077, 4078, 4079, 4080, 4081, 4082, 4083, 4084, 4085, 4086, 4087, 4088,
30 4089, 4090, 4091, 4092, 4093, 4094, 4095, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103,
4104, 4105, 4106, 4107, 4108, 4109, 4110, 4111, 4112, 4113, 4114, 4115, 4116, 4117, 4118,
4119, 4120, 4121, 4122, 4123, 4124, 4125, 4126, 4127, 4128, 4129, 4130, 4131, 4132, 4133,
4134, 4135, 4136, 4137, 4138, 4139, 4140, 4141, 4142, 4143, 4144, 4145, 4146, 4147, 4148,
4149, 4150, 4151, 4152, 4153, 4154, 4155, 4156, 4157, 4158, 4159, 4160, 4161, 4162, 4163,
35 4164, 4165, 4166, 4167, 4168, 4169, 4170, 4171, 4172, 4173, 4174, 4175, 4176, 4177, 4178,

4179, 4180, 4181, 4182, 4183, 4184, 4185, 4186, 4187, 4188, 4189, 4190, 4191, 4192, 4193,
4194, 4195, 4196, 4197, 4198, 4199, 4200, 4201, 4202, 4203, 4204, 4205, 4206, 4207, 4208,
4209, 4210, 4211, 4212, 4213, 4214, 4215, 4216, 4217, 4218, 4219, 4220, 4221, 4222, 4223,
4224, 4225, 4226, 4227, 4228, 4229, 4230, 4231, 4232, 4233, 4234, 4235, 4236, 4237, 4238,
5 4239, 4240, 4241, 4242, 4243, 4244, 4245, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251, 4252, 4253,
4254, 4255, 4256, 4257, 4258, 4259, 4260, 4261, 4262, 4263, 4264, 4265, 4266, 4267, 4268,
4269, 4270, 4271, 4272, 4273, 4274, 4275, 4276, 4277, 4278, 4279, 4280, 4281, 4282, 4283,
4284, 4285, 4286, 4287, 4288, 4289, 4290, 4291, 4292, 4293, 4294, 4295, 4296, 4297, 4298,
4299, 4300, 4301, 4302, 4303, 4304, 4305, 4306, 4307, 4308, 4309, 4310, 4311, 4312, 4313,
10 4314, 4315, 4316, 4317, 4318, 4319, 4320, 4321, 4322, 4323, 4324, 4325, 4326, 4327, 4328,
4329, 4330, 4331, 4332, 4333, 4334, 4335, 4336, 4337, 4338, 4339, 4340, 4341, 4342, 4343,
4344, 4345, 4346, 4347, 4348, 4349, 4350, 4351, 4352, 4353, 4354, 4355, 4356, 4357, 4358,
4359, 4360, 4361, 4362, 4363, 4364, 4365, 4366, 4367, 4368, 4369, 4370, 4371, 4372, 4373,
4374, 4375, 4376, 4377, 4378, 4379, 4380, 4381, 4382, 4383, 4384, 4385, 4386, 4387, 4388,
15 4389, 4390, 4391, 4392, 4393, 4394, 4395, 4396, 4397, 4398, 4399, 4400, 4401, 4402, 4403,
4404, 4405, 4406, 4407, 4408, 4409, 4410, 4411, 4412, 4413, 4414, 4415, 4416, 4417, 4418,
4419, 4420, 4421, 4422, 4423, 4424, 4425, 4426, 4427, 4428, 4429, 4430, 4431, 4432, 4433,
4434, 4435, 4436, 4437, 4438, 4439, 4440, 4441, 4442, 4443, 4444, 4445, 4446, 4447, 4448,
4449, 4450, 4451, 4452, 4453, 4454, 4455, 4456, 4457, 4458, 4459, 4460, 4461, 4462, 4463,
20 4464, 4465, 4466, 4467, 4468, 4469, 4470, 4471, 4472, 4473, 4474, 4475, 4476, 4477, 4478,
4479, 4480, 4481, 4482, 4483, 4484, 4485, 4486, 4487, 4488, 4489, 4490, 4491, 4492, 4493,
4494, 4495, 4496, 4497, 4498, 4499, 4500, 4501, 4502, 4503, 4504, 4505, 4506, 4507, 4508,
4509, 4510, 4511, 4512, 4513, 4514, 4515, 4516, 4517, 4518, 4519, 4520, 4521, 4522, 4523,
4524, 4525, 4526, 4527, 4528, 4529, 4530, 4531, 4532, 4533, 4534, 4535, 4536, 4537, 4538,
25 4539, 4540, 4541, 4542, 4543, 4544, 4545, 4546, 4547, 4548, 4549, 4550, 4551, 4552, 4553,
4554, 4555, 4556, 4557, 4558, 4559, 4560, 4561, 4562, 4563, 4564, 4565, 4566, 4567, 4568,
4569, 4570, 4571, 4572, 4573, 4574, 4575, 4576, 4577, 4578, 4579, 4580, 4581, 4582, 4583,
4584, 4585, 4586, 4587, 4588, 4589, 4590, 4591, 4592, 4593, 4594, 4595, 4596, 4597, 4598,
4599, 4600, 4601, 4602, 4603, 4604, 4605, 4606, 4607, 4608, 4609, 4610, 4611, 4612, 4613,
30 4614, 4615, 4616, 4617, 4618, 4619, 4620, 4621, 4622, 4623, 4624, 4625, 4626, 4627, 4628,
4629, 4630, 4631, 4632, 4633, 4634, 4635, 4636, 4637, 4638, 4639, 4640, 4641, 4642, 4643,
4644, 4645, 4646, 4647, 4648, 4649, 4650, 4651, 4652, 4653, 4654, 4655, 4656, 4657, 4658,
4659, 4660, 4661, 4662, 4663, 4664, 4665, 4666, 4667, 4668, 4669, 4670, 4671, 4672, 4673,
4674, 4675, 4676, 4677, 4678, 4679, 4680, 4681, 4682, 4683, 4684, 4685, 4686, 4687, 4688,
35 4689, 4690, 4691, 4692, 4693, 4694, 4695, 4696, 4697, 4698, 4699, 4700, 4701, 4702, 4703,

4704, 4705, 4706, 4707, 4708, 4709, 4710, 4711, 4712, 4713, 4714, 4715, 4716, 4717, 4718, 4719, 4720, 4721, 4722, 4723, 4724, 4725, 4726, 4727, 4728, 4729, 4730, 4731, 4732, 4733, 4734, 4735, 4736, 4737, 4738, 4739, 4740, 4741, 4742, 4743, 4744, 4745, 4746, 4747, 4748, 4749, 4750, 4751, 4752, 4753, 4754, 4755, 4756, 4757, 4758, 4759, 4760, 4761, 4762, 4763, 5 4764, 4765, 4766, 4767, 4768, 4769, 4770, 4771, 4772, 4773, 4774, 4775, 4776, 4777, 4778, 4779, 4780, 4781, 4782, 4783, 4784, 4785, 4786, 4787, 4788, 4789, 4790, 4791, 4792, 4793, 4794, 4795, 4796, 4797, 4798, 4799, 4800, 4801, 4802, 4803, 4804, 4805, 4806, 4807, 4808, 4809, 4810, 4811, 4812, 4813, 4814, 4815, 4816, 4817, 4818, 4819, 4820, 4821, 4822, 4823, 4824, 4825, 4826, 4827, 4828, 4829, 4830, 4831, 4832, 4833, 4834, 4835, 4836, 4837, 4838, 10 4839, 4840, 4841, 4842, 4843, 4844, 4845, 4846, 4847, 4848, 4849, 4850, 4851, 4852, 4853, 4854, 4855, 4856, 4857, 4858, 4859, 4860, 4861, 4862, 4863, 4864, 4865, 4866, 4867, 4868, 4869, 4870, 4871, 4872, 4873, 4874, 4875, 4876, 4877, 4878, 4879, 4880, 4881, 4882, 4883, 4884, 4885, 4886, 4887, 4888, 4889, 4890, 4891, 4892, 4893, 4894, 4895, 4896, 4897, 4898, 4899, 4900, 4901, 4902, 4903, 4904, 4905, 4906, 4907, 4908, 4909, 4910, 4911, 4912, 4913, 15 4914, 4915, 4916, 4917, 4918, 4919, 4920, 4921, 4922, 4923, 4924, 4925, 4926, 4927, 4928, 4929, 4930, 4931, 4932, 4933, 4934, 4935, 4936, 4937, 4938, 4939, 4940, 4941, 4942, 4943, 4944, 4945, 4946, 4947, 4948, 4949, 4950, 4951, 4952, 4953, 4954, 4955, 4956, 4957, 4958, 4959, 4960, 4961, 4962, 4963, 4964, 4965, 4966, 4967, 4968, 4969, 4970, 4971, 4972, 4973, 4974, 4975, 4976, 4977, 4978, 4979, 4980, 4981, 4982, 4983, 4984, 4985, 4986, 4987, 4988, 20 4989, 4990, 4991, 4992, 4993, 4994, 4995, 4996, 4997, 4998, 4999 y 5000 %.

En algunas modalidades, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención se estabilizan mediante la formación de una emulsión, o una micela, o un liposoma, o un hidrogel o una solución de aceite.

En una modalidad preferida, el liposoma no deriva de una célula de macroalgas 25 marinas rojas o una célula de levadura.

En algunas modalidades, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención se estabilizan mediante secado por aspersión de una emulsión estabilizada o una micela estabilizada, o un liposoma estabilizado, o un hidrogel estabilizado.

En una modalidad preferida, las composiciones que contienen compuesto de 30 halocarburo estabilizado de la invención no comprenden metilcelulosa o ciclodextrina.

En algunas modalidades, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención se estabilizan mediante encapsulación.

En una modalidad preferida, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención que se estabilizan mediante encapsulación, comprenden un agente de encapsulación que no comprende copolímero de anhídrido polietilenmaleico.

5 En algunas modalidades, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención se estabilizan mediante la formación de una solución del compuesto de halocarburo en un aceite, opcionalmente en la presencia de un alcohol. Más preferentemente, el aceite es un triglicérido de cadena media (MCT). Más preferentemente, el alcohol es etanol.

10 En algunas modalidades, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención son emulsiones, o micelas, o liposomas, o hidrogeles, o soluciones oleosas, que comprenden un compuesto de halocarburo dentro de la emulsión, o micela, o liposoma, o solución de hidrogel o solución oleosa.

15 En algunas modalidades, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención son polvos secos, que comprenden un compuesto de halocarburo.

En una modalidad preferida, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención que son polvos secos que comprenden un compuesto de halocarburo, no comprenden metilcelulosa, o copolímero de anhídrido polietilenmaleico o ciclodextrina o un oligosacárido cíclico.

20 En algunas modalidades, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención son polvos secos, que comprenden un compuesto de halocarburo encapsulado.

25 En una modalidad preferida, las composiciones que contienen compuesto de halocarburo estabilizado de la invención que son polvos secos, que comprenden un compuesto de halocarburo encapsulado, no comprenden metilcelulosa, o ciclodextrina, o copolímero de anhídrido polietilenmaleico.

30 En algunas modalidades, las composiciones de la invención están en la forma de un comprimido, píldora o tableta sólida; opcionalmente en donde el comprimido, píldora o tableta sólida es adecuado para la incorporación en un bolo; preferentemente en donde el comprimido, píldora o tableta sólida se adapta para proporcionar liberación lenta *in vivo* del compuesto de halocarburo en el rumen de un rumiante; preferentemente en donde la

composición comprende gelatina; preferentemente en donde el compuesto de halocarburo es bromoformo.

- 5 En una modalidad preferida, la composición que contiene compuesto de halocarburo estabilizado de la invención es una solución oleosa que comprende un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo) y un aceite (preferentemente MCT); que comprende opcionalmente además un alcohol (preferentemente etanol).

En una modalidad preferida, la composición que contiene compuesto de halocarburo estabilizado de la invención es una emulsión que comprende bromoformo dentro de la emulsión.

- 10 En otra modalidad preferida, la composición que contiene compuesto de halocarburo estabilizado de la invención es un polvo seco, que comprende bromoformo.

En otra modalidad preferida, la composición que contiene compuesto de halocarburo estabilizado de la invención es un polvo seco, que comprende bromoformo encapsulado.

- 15 En algunas modalidades, los polvos secos que comprenden un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo) se preparan a partir de una emulsión, o micela, o liposoma, o hidrogel, que comprende un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo).

- 20 En una modalidad preferida, los polvos secos que comprenden un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo), preparado a partir de una emulsión o micela, o liposoma, o hidrogel, que comprende un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo), no comprenden metilcelulosa, o ciclodextrina, o copolímero de anhídrido polietilenmaleico.

- 25 En algunas modalidades, los polvos secos que comprenden un compuesto de halocarburo encapsulado (preferentemente bromoformo) se preparan a partir de una emulsión o micela, o liposoma, o hidrogel, que comprende un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo).

- 30 En una modalidad preferida, los polvos secos que comprenden un compuesto de halocarburo encapsulado (preferentemente bromoformo), preparado a partir de una emulsión o micela, o liposoma, o hidrogel, que comprende un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo), no comprenden metilcelulosa, o ciclodextrina, o copolímero

de anhídrido polietilenmaleico.

En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden además una o más proteínas (incluidas proteínas globulares tal como aquellas presentes en la leche),
5 péptidos, oligopéptidos o aminoácidos. Los péptidos preferidos incluyen, sin limitación, colágeno hidrolizado, producto hidrolizado de colágeno, producto hidrolizado de gelatina, gelatina hidrolizada o gelatina.

En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden además
10 uno o más carbohidratos, sacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, almidones o celulosas. Los polisacáridos preferidos incluyen, sin limitación, goma xantana (usada indistintamente en la presente con el término goma de xantano) o goma guar.

En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden además
15 uno o más lípidos, ácidos grasos, ceras, aceites, esteroides, vitaminas liposolubles (tal como vitaminas A, D, E y K), monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, glicerolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, policétidos, lípidos de esteroide o lípidos de prenol. Los triglicéridos preferidos incluyen, sin limitación, triglicéridos de cadena media (MCT) o triglicérido caprílico/cáprico.

20 En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden además uno o más agentes emulsionantes, glicerol, sorbitol, lecitinas, glicerofosfolípidos, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilinositoles, fosfatidilserinas o ácidos fosfatídicos.

25 En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden además uno o más agentes tensioactivos, ácidos alimenticios, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono y diglicéridos, o detergentes. Los agentes tensioactivos preferidos incluyen, sin limitación, polisorbatos tal como Tween 20, Tween 40, Tween 60 o Tween 80, o análogos o
30 equivalentes de los mismos.

En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los

hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden además uno o más agentes de encapsulación, alquilcelulosas, etilcelulosas, alcoholes polivinílicos, gelatinas, carragenanos, hidrogeles, alginatos o sales de alginato.

- 5** En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden además uno o más polímeros comestibles o biocompatibles.

En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden leche fresca, y/o leche entera en polvo, y/o etanol y/o agua.

- 10** En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden uno o más agentes activos.

- 15** En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo) a una concentración seleccionada de una concentración que cae dentro del intervalo de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 5000 ppm.

- 20** En algunas modalidades, las emulsiones o las micelas o los liposomas o los hidrogeles o los polvos secos o las soluciones oleosas de la invención comprenden un compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo) en una concentración seleccionada del grupo que consiste en una concentración de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245,

246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264,
265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283,
284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302,
303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321,
5 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341,
342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360,
361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379,
380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398,
399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417,
10 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436,
437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455,
456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474,
475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493,
494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512,
15 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531,
532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550,
551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569,
570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588,
589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607,
20 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626,
627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645,
646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664,
665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683,
684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702,
25 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721,
722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740,
741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759,
760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778,
779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797,
30 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816,
817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835,
836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854,
855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873,
874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892,
35 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911,

912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930,
931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949,
950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968,
969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987,
5 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000, 1001, 1002, 1003, 1004,
1005, 1006, 1007, 1008, 1009, 1010, 1011, 1012, 1013, 1014, 1015, 1016, 1017, 1018, 1019,
1020, 1021, 1022, 1023, 1024, 1025, 1026, 1027, 1028, 1029, 1030, 1031, 1032, 1033, 1034,
1035, 1036, 1037, 1038, 1039, 1040, 1041, 1042, 1043, 1044, 1045, 1046, 1047, 1048, 1049,
1050, 1051, 1052, 1053, 1054, 1055, 1056, 1057, 1058, 1059, 1060, 1061, 1062, 1063, 1064,
10 1065, 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073, 1074, 1075, 1076, 1077, 1078, 1079,
1080, 1081, 1082, 1083, 1084, 1085, 1086, 1087, 1088, 1089, 1090, 1091, 1092, 1093, 1094,
1095, 1096, 1097, 1098, 1099, 1100, 1101, 1102, 1103, 1104, 1105, 1106, 1107, 1108, 1109,
1110, 1111, 1112, 1113, 1114, 1115, 1116, 1117, 1118, 1119, 1120, 1121, 1122, 1123, 1124,
1125, 1126, 1127, 1128, 1129, 1130, 1131, 1132, 1133, 1134, 1135, 1136, 1137, 1138, 1139,
15 1140, 1141, 1142, 1143, 1144, 1145, 1146, 1147, 1148, 1149, 1150, 1151, 1152, 1153, 1154,
1155, 1156, 1157, 1158, 1159, 1160, 1161, 1162, 1163, 1164, 1165, 1166, 1167, 1168, 1169,
1170, 1171, 1172, 1173, 1174, 1175, 1176, 1177, 1178, 1179, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184,
1185, 1186, 1187, 1188, 1189, 1190, 1191, 1192, 1193, 1194, 1195, 1196, 1197, 1198, 1199,
1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208, 1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214,
20 1215, 1216, 1217, 1218, 1219, 1220, 1221, 1222, 1223, 1224, 1225, 1226, 1227, 1228, 1229,
1230, 1231, 1232, 1233, 1234, 1235, 1236, 1237, 1238, 1239, 1240, 1241, 1242, 1243, 1244,
1245, 1246, 1247, 1248, 1249, 1250, 1251, 1252, 1253, 1254, 1255, 1256, 1257, 1258, 1259,
1260, 1261, 1262, 1263, 1264, 1265, 1266, 1267, 1268, 1269, 1270, 1271, 1272, 1273, 1274,
1275, 1276, 1277, 1278, 1279, 1280, 1281, 1282, 1283, 1284, 1285, 1286, 1287, 1288, 1289,
25 1290, 1291, 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298, 1299, 1300, 1301, 1302, 1303, 1304,
1305, 1306, 1307, 1308, 1309, 1310, 1311, 1312, 1313, 1314, 1315, 1316, 1317, 1318, 1319,
1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334,
1335, 1336, 1337, 1338, 1339, 1340, 1341, 1342, 1343, 1344, 1345, 1346, 1347, 1348, 1349,
1350, 1351, 1352, 1353, 1354, 1355, 1356, 1357, 1358, 1359, 1360, 1361, 1362, 1363, 1364,
30 1365, 1366, 1367, 1368, 1369, 1370, 1371, 1372, 1373, 1374, 1375, 1376, 1377, 1378, 1379,
1380, 1381, 1382, 1383, 1384, 1385, 1386, 1387, 1388, 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394,
1395, 1396, 1397, 1398, 1399, 1400, 1401, 1402, 1403, 1404, 1405, 1406, 1407, 1408, 1409,
1410, 1411, 1412, 1413, 1414, 1415, 1416, 1417, 1418, 1419, 1420, 1421, 1422, 1423, 1424,
1425, 1426, 1427, 1428, 1429, 1430, 1431, 1432, 1433, 1434, 1435, 1436, 1437, 1438, 1439,
35 1440, 1441, 1442, 1443, 1444, 1445, 1446, 1447, 1448, 1449, 1450, 1451, 1452, 1453, 1454,

1455, 1456, 1457, 1458, 1459, 1460, 1461, 1462, 1463, 1464, 1465, 1466, 1467, 1468, 1469,
1470, 1471, 1472, 1473, 1474, 1475, 1476, 1477, 1478, 1479, 1480, 1481, 1482, 1483, 1484,
1485, 1486, 1487, 1488, 1489, 1490, 1491, 1492, 1493, 1494, 1495, 1496, 1497, 1498, 1499,
1500, 1501, 1502, 1503, 1504, 1505, 1506, 1507, 1508, 1509, 1510, 1511, 1512, 1513, 1514,
5 1515, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1523, 1524, 1525, 1526, 1527, 1528, 1529,
1530, 1531, 1532, 1533, 1534, 1535, 1536, 1537, 1538, 1539, 1540, 1541, 1542, 1543, 1544,
1545, 1546, 1547, 1548, 1549, 1550, 1551, 1552, 1553, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559,
1560, 1561, 1562, 1563, 1564, 1565, 1566, 1567, 1568, 1569, 1570, 1571, 1572, 1573, 1574,
1575, 1576, 1577, 1578, 1579, 1580, 1581, 1582, 1583, 1584, 1585, 1586, 1587, 1588, 1589,
10 1590, 1591, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604,
1605, 1606, 1607, 1608, 1609, 1610, 1611, 1612, 1613, 1614, 1615, 1616, 1617, 1618, 1619,
1620, 1621, 1622, 1623, 1624, 1625, 1626, 1627, 1628, 1629, 1630, 1631, 1632, 1633, 1634,
1635, 1636, 1637, 1638, 1639, 1640, 1641, 1642, 1643, 1644, 1645, 1646, 1647, 1648, 1649,
1650, 1651, 1652, 1653, 1654, 1655, 1656, 1657, 1658, 1659, 1660, 1661, 1662, 1663, 1664,
15 1665, 1666, 1667, 1668, 1669, 1670, 1671, 1672, 1673, 1674, 1675, 1676, 1677, 1678, 1679,
1680, 1681, 1682, 1683, 1684, 1685, 1686, 1687, 1688, 1689, 1690, 1691, 1692, 1693, 1694,
1695, 1696, 1697, 1698, 1699, 1700, 1701, 1702, 1703, 1704, 1705, 1706, 1707, 1708, 1709,
1710, 1711, 1712, 1713, 1714, 1715, 1716, 1717, 1718, 1719, 1720, 1721, 1722, 1723, 1724,
1725, 1726, 1727, 1728, 1729, 1730, 1731, 1732, 1733, 1734, 1735, 1736, 1737, 1738, 1739,
20 1740, 1741, 1742, 1743, 1744, 1745, 1746, 1747, 1748, 1749, 1750, 1751, 1752, 1753, 1754,
1755, 1756, 1757, 1758, 1759, 1760, 1761, 1762, 1763, 1764, 1765, 1766, 1767, 1768, 1769,
1770, 1771, 1772, 1773, 1774, 1775, 1776, 1777, 1778, 1779, 1780, 1781, 1782, 1783, 1784,
1785, 1786, 1787, 1788, 1789, 1790, 1791, 1792, 1793, 1794, 1795, 1796, 1797, 1798, 1799,
1800, 1801, 1802, 1803, 1804, 1805, 1806, 1807, 1808, 1809, 1810, 1811, 1812, 1813, 1814,
25 1815, 1816, 1817, 1818, 1819, 1820, 1821, 1822, 1823, 1824, 1825, 1826, 1827, 1828, 1829,
1830, 1831, 1832, 1833, 1834, 1835, 1836, 1837, 1838, 1839, 1840, 1841, 1842, 1843, 1844,
1845, 1846, 1847, 1848, 1849, 1850, 1851, 1852, 1853, 1854, 1855, 1856, 1857, 1858, 1859,
1860, 1861, 1862, 1863, 1864, 1865, 1866, 1867, 1868, 1869, 1870, 1871, 1872, 1873, 1874,
1875, 1876, 1877, 1878, 1879, 1880, 1881, 1882, 1883, 1884, 1885, 1886, 1887, 1888, 1889,
30 1890, 1891, 1892, 1893, 1894, 1895, 1896, 1897, 1898, 1899, 1900, 1901, 1902, 1903, 1904,
1905, 1906, 1907, 1908, 1909, 1910, 1911, 1912, 1913, 1914, 1915, 1916, 1917, 1918, 1919,
1920, 1921, 1922, 1923, 1924, 1925, 1926, 1927, 1928, 1929, 1930, 1931, 1932, 1933, 1934,
1935, 1936, 1937, 1938, 1939, 1940, 1941, 1942, 1943, 1944, 1945, 1946, 1947, 1948, 1949,
1950, 1951, 1952, 1953, 1954, 1955, 1956, 1957, 1958, 1959, 1960, 1961, 1962, 1963, 1964,
35 1965, 1966, 1967, 1968, 1969, 1970, 1971, 1972, 1973, 1974, 1975, 1976, 1977, 1978, 1979,

1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994,
1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009,
2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024,
2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039,
5 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054,
2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069,
2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084,
2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099,
2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114,
10 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129,
2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144,
2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159,
2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174,
2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189,
15 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204,
2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219,
2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234,
2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249,
2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264,
20 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279,
2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294,
2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309,
2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324,
2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339,
25 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354,
2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369,
2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384,
2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399,
2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414,
30 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429,
2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444,
2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459,
2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474,
2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489,
35 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504,

2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519,
2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534,
2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549,
2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564,
5 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579,
2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594,
2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609,
2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624,
2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633, 2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639,
10 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648, 2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654,
2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663, 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, 2669,
2670, 2671, 2672, 2673, 2674, 2675, 2676, 2677, 2678, 2679, 2680, 2681, 2682, 2683, 2684,
2685, 2686, 2687, 2688, 2689, 2690, 2691, 2692, 2693, 2694, 2695, 2696, 2697, 2698, 2699,
2700, 2701, 2702, 2703, 2704, 2705, 2706, 2707, 2708, 2709, 2710, 2711, 2712, 2713, 2714,
15 2715, 2716, 2717, 2718, 2719, 2720, 2721, 2722, 2723, 2724, 2725, 2726, 2727, 2728, 2729,
2730, 2731, 2732, 2733, 2734, 2735, 2736, 2737, 2738, 2739, 2740, 2741, 2742, 2743, 2744,
2745, 2746, 2747, 2748, 2749, 2750, 2751, 2752, 2753, 2754, 2755, 2756, 2757, 2758, 2759,
2760, 2761, 2762, 2763, 2764, 2765, 2766, 2767, 2768, 2769, 2770, 2771, 2772, 2773, 2774,
2775, 2776, 2777, 2778, 2779, 2780, 2781, 2782, 2783, 2784, 2785, 2786, 2787, 2788, 2789,
20 2790, 2791, 2792, 2793, 2794, 2795, 2796, 2797, 2798, 2799, 2800, 2801, 2802, 2803, 2804,
2805, 2806, 2807, 2808, 2809, 2810, 2811, 2812, 2813, 2814, 2815, 2816, 2817, 2818, 2819,
2820, 2821, 2822, 2823, 2824, 2825, 2826, 2827, 2828, 2829, 2830, 2831, 2832, 2833, 2834,
2835, 2836, 2837, 2838, 2839, 2840, 2841, 2842, 2843, 2844, 2845, 2846, 2847, 2848, 2849,
2850, 2851, 2852, 2853, 2854, 2855, 2856, 2857, 2858, 2859, 2860, 2861, 2862, 2863, 2864,
25 2865, 2866, 2867, 2868, 2869, 2870, 2871, 2872, 2873, 2874, 2875, 2876, 2877, 2878, 2879,
2880, 2881, 2882, 2883, 2884, 2885, 2886, 2887, 2888, 2889, 2890, 2891, 2892, 2893, 2894,
2895, 2896, 2897, 2898, 2899, 2900, 2901, 2902, 2903, 2904, 2905, 2906, 2907, 2908, 2909,
2910, 2911, 2912, 2913, 2914, 2915, 2916, 2917, 2918, 2919, 2920, 2921, 2922, 2923, 2924,
2925, 2926, 2927, 2928, 2929, 2930, 2931, 2932, 2933, 2934, 2935, 2936, 2937, 2938, 2939,
30 2940, 2941, 2942, 2943, 2944, 2945, 2946, 2947, 2948, 2949, 2950, 2951, 2952, 2953, 2954,
2955, 2956, 2957, 2958, 2959, 2960, 2961, 2962, 2963, 2964, 2965, 2966, 2967, 2968, 2969,
2970, 2971, 2972, 2973, 2974, 2975, 2976, 2977, 2978, 2979, 2980, 2981, 2982, 2983, 2984,
2985, 2986, 2987, 2988, 2989, 2990, 2991, 2992, 2993, 2994, 2995, 2996, 2997, 2998, 2999,
3000, 3001, 3002, 3003, 3004, 3005, 3006, 3007, 3008, 3009, 3010, 3011, 3012, 3013, 3014,
35 3015, 3016, 3017, 3018, 3019, 3020, 3021, 3022, 3023, 3024, 3025, 3026, 3027, 3028, 3029,

3030, 3031, 3032, 3033, 3034, 3035, 3036, 3037, 3038, 3039, 3040, 3041, 3042, 3043, 3044,
3045, 3046, 3047, 3048, 3049, 3050, 3051, 3052, 3053, 3054, 3055, 3056, 3057, 3058, 3059,
3060, 3061, 3062, 3063, 3064, 3065, 3066, 3067, 3068, 3069, 3070, 3071, 3072, 3073, 3074,
3075, 3076, 3077, 3078, 3079, 3080, 3081, 3082, 3083, 3084, 3085, 3086, 3087, 3088, 3089,
5 3090, 3091, 3092, 3093, 3094, 3095, 3096, 3097, 3098, 3099, 3100, 3101, 3102, 3103, 3104,
3105, 3106, 3107, 3108, 3109, 3110, 3111, 3112, 3113, 3114, 3115, 3116, 3117, 3118, 3119,
3120, 3121, 3122, 3123, 3124, 3125, 3126, 3127, 3128, 3129, 3130, 3131, 3132, 3133, 3134,
3135, 3136, 3137, 3138, 3139, 3140, 3141, 3142, 3143, 3144, 3145, 3146, 3147, 3148, 3149,
3150, 3151, 3152, 3153, 3154, 3155, 3156, 3157, 3158, 3159, 3160, 3161, 3162, 3163, 3164,
10 3165, 3166, 3167, 3168, 3169, 3170, 3171, 3172, 3173, 3174, 3175, 3176, 3177, 3178, 3179,
3180, 3181, 3182, 3183, 3184, 3185, 3186, 3187, 3188, 3189, 3190, 3191, 3192, 3193, 3194,
3195, 3196, 3197, 3198, 3199, 3200, 3201, 3202, 3203, 3204, 3205, 3206, 3207, 3208, 3209,
3210, 3211, 3212, 3213, 3214, 3215, 3216, 3217, 3218, 3219, 3220, 3221, 3222, 3223, 3224,
3225, 3226, 3227, 3228, 3229, 3230, 3231, 3232, 3233, 3234, 3235, 3236, 3237, 3238, 3239,
15 3240, 3241, 3242, 3243, 3244, 3245, 3246, 3247, 3248, 3249, 3250, 3251, 3252, 3253, 3254,
3255, 3256, 3257, 3258, 3259, 3260, 3261, 3262, 3263, 3264, 3265, 3266, 3267, 3268, 3269,
3270, 3271, 3272, 3273, 3274, 3275, 3276, 3277, 3278, 3279, 3280, 3281, 3282, 3283, 3284,
3285, 3286, 3287, 3288, 3289, 3290, 3291, 3292, 3293, 3294, 3295, 3296, 3297, 3298, 3299,
3300, 3301, 3302, 3303, 3304, 3305, 3306, 3307, 3308, 3309, 3310, 3311, 3312, 3313, 3314,
20 3315, 3316, 3317, 3318, 3319, 3320, 3321, 3322, 3323, 3324, 3325, 3326, 3327, 3328, 3329,
3330, 3331, 3332, 3333, 3334, 3335, 3336, 3337, 3338, 3339, 3340, 3341, 3342, 3343, 3344,
3345, 3346, 3347, 3348, 3349, 3350, 3351, 3352, 3353, 3354, 3355, 3356, 3357, 3358, 3359,
3360, 3361, 3362, 3363, 3364, 3365, 3366, 3367, 3368, 3369, 3370, 3371, 3372, 3373, 3374,
3375, 3376, 3377, 3378, 3379, 3380, 3381, 3382, 3383, 3384, 3385, 3386, 3387, 3388, 3389,
25 3390, 3391, 3392, 3393, 3394, 3395, 3396, 3397, 3398, 3399, 3400, 3401, 3402, 3403, 3404,
3405, 3406, 3407, 3408, 3409, 3410, 3411, 3412, 3413, 3414, 3415, 3416, 3417, 3418, 3419,
3420, 3421, 3422, 3423, 3424, 3425, 3426, 3427, 3428, 3429, 3430, 3431, 3432, 3433, 3434,
3435, 3436, 3437, 3438, 3439, 3440, 3441, 3442, 3443, 3444, 3445, 3446, 3447, 3448, 3449,
3450, 3451, 3452, 3453, 3454, 3455, 3456, 3457, 3458, 3459, 3460, 3461, 3462, 3463, 3464,
30 3465, 3466, 3467, 3468, 3469, 3470, 3471, 3472, 3473, 3474, 3475, 3476, 3477, 3478, 3479,
3480, 3481, 3482, 3483, 3484, 3485, 3486, 3487, 3488, 3489, 3490, 3491, 3492, 3493, 3494,
3495, 3496, 3497, 3498, 3499, 3500, 3501, 3502, 3503, 3504, 3505, 3506, 3507, 3508, 3509,
3510, 3511, 3512, 3513, 3514, 3515, 3516, 3517, 3518, 3519, 3520, 3521, 3522, 3523, 3524,
3525, 3526, 3527, 3528, 3529, 3530, 3531, 3532, 3533, 3534, 3535, 3536, 3537, 3538, 3539,
35 3540, 3541, 3542, 3543, 3544, 3545, 3546, 3547, 3548, 3549, 3550, 3551, 3552, 3553, 3554,

3555, 3556, 3557, 3558, 3559, 3560, 3561, 3562, 3563, 3564, 3565, 3566, 3567, 3568, 3569,
3570, 3571, 3572, 3573, 3574, 3575, 3576, 3577, 3578, 3579, 3580, 3581, 3582, 3583, 3584,
3585, 3586, 3587, 3588, 3589, 3590, 3591, 3592, 3593, 3594, 3595, 3596, 3597, 3598, 3599,
3600, 3601, 3602, 3603, 3604, 3605, 3606, 3607, 3608, 3609, 3610, 3611, 3612, 3613, 3614,
5 3615, 3616, 3617, 3618, 3619, 3620, 3621, 3622, 3623, 3624, 3625, 3626, 3627, 3628, 3629,
3630, 3631, 3632, 3633, 3634, 3635, 3636, 3637, 3638, 3639, 3640, 3641, 3642, 3643, 3644,
3645, 3646, 3647, 3648, 3649, 3650, 3651, 3652, 3653, 3654, 3655, 3656, 3657, 3658, 3659,
3660, 3661, 3662, 3663, 3664, 3665, 3666, 3667, 3668, 3669, 3670, 3671, 3672, 3673, 3674,
3675, 3676, 3677, 3678, 3679, 3680, 3681, 3682, 3683, 3684, 3685, 3686, 3687, 3688, 3689,
10 3690, 3691, 3692, 3693, 3694, 3695, 3696, 3697, 3698, 3699, 3700, 3701, 3702, 3703, 3704,
3705, 3706, 3707, 3708, 3709, 3710, 3711, 3712, 3713, 3714, 3715, 3716, 3717, 3718, 3719,
3720, 3721, 3722, 3723, 3724, 3725, 3726, 3727, 3728, 3729, 3730, 3731, 3732, 3733, 3734,
3735, 3736, 3737, 3738, 3739, 3740, 3741, 3742, 3743, 3744, 3745, 3746, 3747, 3748, 3749,
3750, 3751, 3752, 3753, 3754, 3755, 3756, 3757, 3758, 3759, 3760, 3761, 3762, 3763, 3764,
15 3765, 3766, 3767, 3768, 3769, 3770, 3771, 3772, 3773, 3774, 3775, 3776, 3777, 3778, 3779,
3780, 3781, 3782, 3783, 3784, 3785, 3786, 3787, 3788, 3789, 3790, 3791, 3792, 3793, 3794,
3795, 3796, 3797, 3798, 3799, 3800, 3801, 3802, 3803, 3804, 3805, 3806, 3807, 3808, 3809,
3810, 3811, 3812, 3813, 3814, 3815, 3816, 3817, 3818, 3819, 3820, 3821, 3822, 3823, 3824,
3825, 3826, 3827, 3828, 3829, 3830, 3831, 3832, 3833, 3834, 3835, 3836, 3837, 3838, 3839,
20 3840, 3841, 3842, 3843, 3844, 3845, 3846, 3847, 3848, 3849, 3850, 3851, 3852, 3853, 3854,
3855, 3856, 3857, 3858, 3859, 3860, 3861, 3862, 3863, 3864, 3865, 3866, 3867, 3868, 3869,
3870, 3871, 3872, 3873, 3874, 3875, 3876, 3877, 3878, 3879, 3880, 3881, 3882, 3883, 3884,
3885, 3886, 3887, 3888, 3889, 3890, 3891, 3892, 3893, 3894, 3895, 3896, 3897, 3898, 3899,
3900, 3901, 3902, 3903, 3904, 3905, 3906, 3907, 3908, 3909, 3910, 3911, 3912, 3913, 3914,
25 3915, 3916, 3917, 3918, 3919, 3920, 3921, 3922, 3923, 3924, 3925, 3926, 3927, 3928, 3929,
3930, 3931, 3932, 3933, 3934, 3935, 3936, 3937, 3938, 3939, 3940, 3941, 3942, 3943, 3944,
3945, 3946, 3947, 3948, 3949, 3950, 3951, 3952, 3953, 3954, 3955, 3956, 3957, 3958, 3959,
3960, 3961, 3962, 3963, 3964, 3965, 3966, 3967, 3968, 3969, 3970, 3971, 3972, 3973, 3974,
3975, 3976, 3977, 3978, 3979, 3980, 3981, 3982, 3983, 3984, 3985, 3986, 3987, 3988, 3989,
30 3990, 3991, 3992, 3993, 3994, 3995, 3996, 3997, 3998, 3999, 4000, 4001, 4002, 4003, 4004,
4005, 4006, 4007, 4008, 4009, 4010, 4011, 4012, 4013, 4014, 4015, 4016, 4017, 4018, 4019,
4020, 4021, 4022, 4023, 4024, 4025, 4026, 4027, 4028, 4029, 4030, 4031, 4032, 4033, 4034,
4035, 4036, 4037, 4038, 4039, 4040, 4041, 4042, 4043, 4044, 4045, 4046, 4047, 4048, 4049,
4050, 4051, 4052, 4053, 4054, 4055, 4056, 4057, 4058, 4059, 4060, 4061, 4062, 4063, 4064,
35 4065, 4066, 4067, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073, 4074, 4075, 4076, 4077, 4078, 4079,

4080, 4081, 4082, 4083, 4084, 4085, 4086, 4087, 4088, 4089, 4090, 4091, 4092, 4093, 4094,
4095, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103, 4104, 4105, 4106, 4107, 4108, 4109,
4110, 4111, 4112, 4113, 4114, 4115, 4116, 4117, 4118, 4119, 4120, 4121, 4122, 4123, 4124,
4125, 4126, 4127, 4128, 4129, 4130, 4131, 4132, 4133, 4134, 4135, 4136, 4137, 4138, 4139,
5 4140, 4141, 4142, 4143, 4144, 4145, 4146, 4147, 4148, 4149, 4150, 4151, 4152, 4153, 4154,
4155, 4156, 4157, 4158, 4159, 4160, 4161, 4162, 4163, 4164, 4165, 4166, 4167, 4168, 4169,
4170, 4171, 4172, 4173, 4174, 4175, 4176, 4177, 4178, 4179, 4180, 4181, 4182, 4183, 4184,
4185, 4186, 4187, 4188, 4189, 4190, 4191, 4192, 4193, 4194, 4195, 4196, 4197, 4198, 4199,
4200, 4201, 4202, 4203, 4204, 4205, 4206, 4207, 4208, 4209, 4210, 4211, 4212, 4213, 4214,
10 4215, 4216, 4217, 4218, 4219, 4220, 4221, 4222, 4223, 4224, 4225, 4226, 4227, 4228, 4229,
4230, 4231, 4232, 4233, 4234, 4235, 4236, 4237, 4238, 4239, 4240, 4241, 4242, 4243, 4244,
4245, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251, 4252, 4253, 4254, 4255, 4256, 4257, 4258, 4259,
4260, 4261, 4262, 4263, 4264, 4265, 4266, 4267, 4268, 4269, 4270, 4271, 4272, 4273, 4274,
4275, 4276, 4277, 4278, 4279, 4280, 4281, 4282, 4283, 4284, 4285, 4286, 4287, 4288, 4289,
15 4290, 4291, 4292, 4293, 4294, 4295, 4296, 4297, 4298, 4299, 4300, 4301, 4302, 4303, 4304,
4305, 4306, 4307, 4308, 4309, 4310, 4311, 4312, 4313, 4314, 4315, 4316, 4317, 4318, 4319,
4320, 4321, 4322, 4323, 4324, 4325, 4326, 4327, 4328, 4329, 4330, 4331, 4332, 4333, 4334,
4335, 4336, 4337, 4338, 4339, 4340, 4341, 4342, 4343, 4344, 4345, 4346, 4347, 4348, 4349,
4350, 4351, 4352, 4353, 4354, 4355, 4356, 4357, 4358, 4359, 4360, 4361, 4362, 4363, 4364,
20 4365, 4366, 4367, 4368, 4369, 4370, 4371, 4372, 4373, 4374, 4375, 4376, 4377, 4378, 4379,
4380, 4381, 4382, 4383, 4384, 4385, 4386, 4387, 4388, 4389, 4390, 4391, 4392, 4393, 4394,
4395, 4396, 4397, 4398, 4399, 4400, 4401, 4402, 4403, 4404, 4405, 4406, 4407, 4408, 4409,
4410, 4411, 4412, 4413, 4414, 4415, 4416, 4417, 4418, 4419, 4420, 4421, 4422, 4423, 4424,
4425, 4426, 4427, 4428, 4429, 4430, 4431, 4432, 4433, 4434, 4435, 4436, 4437, 4438, 4439,
25 4440, 4441, 4442, 4443, 4444, 4445, 4446, 4447, 4448, 4449, 4450, 4451, 4452, 4453, 4454,
4455, 4456, 4457, 4458, 4459, 4460, 4461, 4462, 4463, 4464, 4465, 4466, 4467, 4468, 4469,
4470, 4471, 4472, 4473, 4474, 4475, 4476, 4477, 4478, 4479, 4480, 4481, 4482, 4483, 4484,
4485, 4486, 4487, 4488, 4489, 4490, 4491, 4492, 4493, 4494, 4495, 4496, 4497, 4498, 4499,
4500, 4501, 4502, 4503, 4504, 4505, 4506, 4507, 4508, 4509, 4510, 4511, 4512, 4513, 4514,
30 4515, 4516, 4517, 4518, 4519, 4520, 4521, 4522, 4523, 4524, 4525, 4526, 4527, 4528, 4529,
4530, 4531, 4532, 4533, 4534, 4535, 4536, 4537, 4538, 4539, 4540, 4541, 4542, 4543, 4544,
4545, 4546, 4547, 4548, 4549, 4550, 4551, 4552, 4553, 4554, 4555, 4556, 4557, 4558, 4559,
4560, 4561, 4562, 4563, 4564, 4565, 4566, 4567, 4568, 4569, 4570, 4571, 4572, 4573, 4574,
4575, 4576, 4577, 4578, 4579, 4580, 4581, 4582, 4583, 4584, 4585, 4586, 4587, 4588, 4589,
35 4590, 4591, 4592, 4593, 4594, 4595, 4596, 4597, 4598, 4599, 4600, 4601, 4602, 4603, 4604,

4605, 4606, 4607, 4608, 4609, 4610, 4611, 4612, 4613, 4614, 4615, 4616, 4617, 4618, 4619,
4620, 4621, 4622, 4623, 4624, 4625, 4626, 4627, 4628, 4629, 4630, 4631, 4632, 4633, 4634,
4635, 4636, 4637, 4638, 4639, 4640, 4641, 4642, 4643, 4644, 4645, 4646, 4647, 4648, 4649,
4650, 4651, 4652, 4653, 4654, 4655, 4656, 4657, 4658, 4659, 4660, 4661, 4662, 4663, 4664,
5 4665, 4666, 4667, 4668, 4669, 4670, 4671, 4672, 4673, 4674, 4675, 4676, 4677, 4678, 4679,
4680, 4681, 4682, 4683, 4684, 4685, 4686, 4687, 4688, 4689, 4690, 4691, 4692, 4693, 4694,
4695, 4696, 4697, 4698, 4699, 4700, 4701, 4702, 4703, 4704, 4705, 4706, 4707, 4708, 4709,
4710, 4711, 4712, 4713, 4714, 4715, 4716, 4717, 4718, 4719, 4720, 4721, 4722, 4723, 4724,
4725, 4726, 4727, 4728, 4729, 4730, 4731, 4732, 4733, 4734, 4735, 4736, 4737, 4738, 4739,
10 4740, 4741, 4742, 4743, 4744, 4745, 4746, 4747, 4748, 4749, 4750, 4751, 4752, 4753, 4754,
4755, 4756, 4757, 4758, 4759, 4760, 4761, 4762, 4763, 4764, 4765, 4766, 4767, 4768, 4769,
4770, 4771, 4772, 4773, 4774, 4775, 4776, 4777, 4778, 4779, 4780, 4781, 4782, 4783, 4784,
4785, 4786, 4787, 4788, 4789, 4790, 4791, 4792, 4793, 4794, 4795, 4796, 4797, 4798, 4799,
4800, 4801, 4802, 4803, 4804, 4805, 4806, 4807, 4808, 4809, 4810, 4811, 4812, 4813, 4814,
15 4815, 4816, 4817, 4818, 4819, 4820, 4821, 4822, 4823, 4824, 4825, 4826, 4827, 4828, 4829,
4830, 4831, 4832, 4833, 4834, 4835, 4836, 4837, 4838, 4839, 4840, 4841, 4842, 4843, 4844,
4845, 4846, 4847, 4848, 4849, 4850, 4851, 4852, 4853, 4854, 4855, 4856, 4857, 4858, 4859,
4860, 4861, 4862, 4863, 4864, 4865, 4866, 4867, 4868, 4869, 4870, 4871, 4872, 4873, 4874,
4875, 4876, 4877, 4878, 4879, 4880, 4881, 4882, 4883, 4884, 4885, 4886, 4887, 4888, 4889,
20 4890, 4891, 4892, 4893, 4894, 4895, 4896, 4897, 4898, 4899, 4900, 4901, 4902, 4903, 4904,
4905, 4906, 4907, 4908, 4909, 4910, 4911, 4912, 4913, 4914, 4915, 4916, 4917, 4918, 4919,
4920, 4921, 4922, 4923, 4924, 4925, 4926, 4927, 4928, 4929, 4930, 4931, 4932, 4933, 4934,
4935, 4936, 4937, 4938, 4939, 4940, 4941, 4942, 4943, 4944, 4945, 4946, 4947, 4948, 4949,
4950, 4951, 4952, 4953, 4954, 4955, 4956, 4957, 4958, 4959, 4960, 4961, 4962, 4963, 4964,
25 4965, 4966, 4967, 4968, 4969, 4970, 4971, 4972, 4973, 4974, 4975, 4976, 4977, 4978, 4979,
4980, 4981, 4982, 4983, 4984, 4985, 4986, 4987, 4988, 4989, 4990, 4991, 4992, 4993, 4994,
4995, 4996, 4997, 4998, 4999 y 5000 ppm.

En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los
hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden un
30 compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo) en donde la concentración del
compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo) es estable durante un período de
tiempo que cae dentro del intervalo de aproximadamente 1 día a aproximadamente 600 días.

En algunas modalidades, las emulsiones, o las micelas, o los liposomas, o los
hidrogeles, o los polvos secos, o las soluciones oleosas de la invención comprenden un

compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo) en donde la concentración del compuesto de halocarburo (preferentemente bromoformo) es estable durante un período de tiempo seleccionado del grupo que consiste en; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599 y 600 días.

En una modalidad preferida, la concentración del compuesto de halocarburo dentro de las composiciones de la invención permanece estable durante un período de tiempo de al

menos aproximadamente 2, 5, 7, 9, 11, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480, 510, 540, 570 o 600 días, preferentemente como se determina por ICP-AES.

5 En una modalidad, la presente invención se refiere a las composiciones de la invención, cuando se usan para inhibir la metanogénesis en un rumiante.

En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de las composiciones de la invención, para inhibir la metanogénesis en un rumiante.

10 En una modalidad, la divulgación de la invención en la presente proporciona un método para administrar una composición que comprende un compuesto de halocarburo estabilizado a un rumiante, en donde la composición reduce y/o inhibe la metanogénesis en el rumiante.

En una modalidad particularmente preferida, la divulgación de la invención en la presente proporciona un método para administrar una composición que comprende bromoformo estabilizado a un rumiante, en donde la composición reduce y/o inhibe la metanogénesis en el rumiante.

15 En una modalidad particularmente preferida, la divulgación de la invención en la presente proporciona un método para administrar una composición que comprende bromoformo estabilizado a un rumiante, en donde la composición reduce y/o inhibe la metanogénesis en el rumiante sin afectar significativamente la producción total de ácidos grasos volátiles (VFA) en el rumen; y/o sin afectar significativamente la producción total de
20 gas en el rumen; y/o sin afectar significativamente los niveles de acetato:propionato (A:P) en el rumen; y/o en tanto que se reducen ventajosamente los niveles de NH₃ en el rumen.

DEFINICIONES

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprender” o variaciones tal como “comprende” o “que
25 comprende”, implica la inclusión de un número entero señalado o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

Como se usa en la presente, el término “compuesto de halocarburo” incluye cualquier molécula orgánica en donde uno o más átomos de hidrógeno se han reemplazado por uno o más átomos de halógeno seleccionados independientemente en cada caso de reemplazo del
30 grupo que consiste en flúor, cloro, bromo o yodo. El término “compuesto de halocarburo”

también incluye productos de reacción que contienen halógeno de compuestos de halocarburo. Los ejemplos preferidos de estos compuestos de halocarburo incluyen haloalcanos, haloalquenos, haloaromáticos, ácidos carboxílicos halogenados y sus ésteres correspondientes, alcoholes de haloalquilo, haloalquil éteres, aminas de haloalquilo y sales

5 de los mismos, haloalquil tioéteres y haloalquil amidas, incluidas mezclas de cualquiera de los compuestos de halocarburo mencionados anteriormente y/o metabolitos de cualquiera de los compuestos de halocarburo mencionados anteriormente y/o productos de reacción que contienen halógeno de cualquiera de los compuestos de halocarburo mencionados anteriormente. Se va a entender que los compuestos de halocarburo que se van a usar en las

10 formulaciones de la invención son compuestos de halocarburo sintéticamente derivados y/o sustancialmente puros, que no se derivan como extractos o de otro modo de fuentes de algas marinas tal como macroalgas marinas rojas, u organismos recombinantes tal como levaduras. Además, se va a entender que los compuestos de halocarburo que se van a usar en las formulaciones de la invención no se seleccionan del grupo que consiste en cloroformo, o

15 tetracloruro de carbono, o cloruro de metileno, o hexacloroetano, o bromoclorometano, o bromocloroetano, o bromocloropropano, o halotano, o 2-bromoetano sulfonato, o 2-bromo-2-cloroetano sulfonato.

Dependiendo de la formulación particular de la composición, los compuestos de halocarburo preferidos incluyen bromoformo, ácido bromocloroacético, ácido dibromoacético,

20 hidrato de cloral, yodopropano y dibromoclorometano.

Como se usa en la presente, el término “metabolito” incluye cualquier especie molecular producida por transformación *in vivo* de la presente entidad molecular a la cual se aplica, incluida transformación química tal como hidrólisis, transformación enzimática tal como lisis o cualquier otra transformación enzimática, y transformación microbiana debido a

25 microflora presente en el ambiente *in vivo* del sujeto, y puede incluir especies moleculares en forma líquida, o en solución, o en forma sólida, o en forma gaseosa, tal como, pero no limitado a, metano, dióxido de carbono o sulfuro de hidrógeno.

Como se usa en la presente, el término “estabilizado” se refiere a una propiedad de inhibir la reactividad o inhibir la descomposición, o inhibir la volatilidad o inhibir la toxicidad o

30 inhibir la actividad contaminante ambiental de los compuestos de halocarburo dentro de las composiciones de la presente invención.

Como se usa en la presente, el término “agente estabilizador” incluye cualquier componente dentro de las composiciones de la presente invención que exhibe una propiedad

de inhibir la reactividad o inhibir la descomposición, o inhibir la volatilidad o inhibir la toxicidad o inhibir la actividad contaminante ambiental del o de los compuestos de halocarburo dentro de las composiciones de la presente invención. Los ejemplos preferidos de estos agentes estabilizadores incluyen proteínas (incluidas proteínas globulares tal como aquellas presentes en la leche), péptidos, oligopéptidos, aminoácidos, carbohidratos, sacáridos, disacáridos, oligosacáridos polisacáridos, goma xantana, (goma de xantano), goma guar, celulosas, almidones, lípidos, ácidos grasos, ceras, aceites, esteroides, vitaminas liposolubles (tal como vitaminas A, D, E, y K), monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, MCT, fosfolípidos, glicerolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, policétidos, lípidos de esteroide, lípidos de prenol, agentes emulsionantes, glicerol, sorbitol, lecitinas, glicerofosfolípidos, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilinositoles, fosfatidilserinas, ácidos fosfatídicos, agentes tensioactivos, ácidos alimentarios, ésteres de ácido diacetiltartárico de mono y diglicéridos, detergentes, agentes de encapsulación, alquilcelulosas, etilcelulosas, alcoholes polivinílicos, gelatinas, carragenanos, hidrogeles, alginatos, sales de alginato, polímeros comestibles, polímeros biocompatibles, leche fresca, leche entera en polvo, o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Como se usa en la presente, el término “encapsulado” y variaciones del término tal como “encapsulación” y “que encapsula” incluye microencapsulación o nanoencapsulación, y se refiere a un proceso en el cual pequeñas partículas o gotas se rodean por un revestimiento para proporcionar una cápsula pequeña. El material de revestimiento se refiere como un “agente de encapsulación”. En su forma más simple e idealizada, una microcápsula es una pequeña esfera que comprende una pared casi uniforme que encierra algún material. En realidad, las microcápsulas rara vez son esféricas y pueden asumir cualquier forma tridimensional. El material encerrado en la microcápsula se refiere como el núcleo, fase interna o relleno, en tanto que la pared algunas veces se llama una cubierta, revestimiento o membrana. Algunos materiales como lípidos y polímeros, tal como alginato, se pueden usar como una mezcla para atrapar el material de interés en su interior. La mayoría de las microcápsulas tienen poros con diámetros entre unos pocos nanómetros y unos pocos micrómetros. Los materiales de revestimiento en general usados para el revestimiento incluyen alquilcelulosas, alcoholes polivinílicos, gelatinas, sales de alginato e hidrogeles. Sin embargo, muchas microcápsulas se parecen poco a las esferas simples. El núcleo puede ser un cristal, una partícula adsorbente dentada o un líquido, y la cubierta se puede facilitar mediante la formación de una emulsión, un hidrogel, una micela, un liposoma, una emulsión de Pickering, una suspensión de sólidos o una suspensión de microcápsulas más pequeñas. La microcápsula incluso puede tener múltiples paredes. La encapsulación se puede lograr por

varios procesos que incluyen, pero no se limitan a; revestimiento de bandeja en donde las partículas se voltean en una bandeja u otro dispositivo; extrusión centrífuga en donde los líquidos se encapsulan por un cabezal giratorio que contiene boquillas concéntricas que proporcionan un chorro de líquido de núcleo que está rodeado por una vaina de solución de pared o masa fundida; técnicas de boquilla vibratoria en donde la encapsulación de núcleo-cubierta o microgranulación (encapsulación de matriz) se puede lograr mediante un flujo laminar a través de una boquilla y una vibración adicional de la boquilla o el líquido; secado por aspersión que sirve como una técnica de microencapsulación cuando un material activo se disuelve o suspende en una solución o emulsión de polímero o masa fundida y queda atrapado en la partícula seca; métodos fisicoquímicos, que incluyen; gelificación ionotrópica en donde las unidades de ácido úrico en las cadenas de polímeros de alginato se reticulan con cationes multivalentes formados a partir de calcio, zinc, hierro o aluminio; separación de fases de coacervación en donde se realiza una agitación continua durante la formación de un sistema de tres fases que consiste en una fase de vehículo de fabricación líquida, una fase de material de núcleo y una fase de material de revestimiento y el revestimiento se deposita mediante un proceso en donde el material de núcleo se dispersa en la solución de polímero de revestimiento, el material de polímero de revestimiento se reviste alrededor del núcleo y se presenta la deposición del revestimiento de polímero líquido alrededor del núcleo por el polímero adsorbido en la interfase formada entre el material de núcleo y la fase de vehículo, seguido de la rigidización del revestimiento, en donde el material de revestimiento es inmiscible en la fase de vehículo y se hace rígido mediante técnicas térmicas, de reticulación o de disolución; y métodos químicos, que incluyen; policondensación interfacial, por lo que los dos reactivos en una policondensación se encuentran en una interfase y reaccionan rápidamente, con base en la reacción clásica de Schotten-Baumann entre un cloruro de ácido y un compuesto que contiene un átomo de hidrógeno activo, tal como una amina o alcohol, o polímeros biocompatibles que incluyen poliésteres, poliurea, poliuretano, formando paredes flexibles delgadas rápidamente en la interfase; reticulación interfacial, que implica un proceso similar a la policondensación interfacial pero reemplazando monómeros bifuncionales que contienen átomos de hidrógeno activo con polímeros de origen biológico tal como proteínas, y por lo cual cuando la reacción se realiza en la interfase de una emulsión, el cloruro de ácido reacciona con los diferentes grupos funcionales del polímero de origen biológico, lo que conduce a la formación de una membrana; polimerización *in situ* en donde la polimerización directa de un monómero individual se lleva a cabo en la superficie de la partícula central; y polimerización de matriz, por lo que un material de núcleo se incrusta en una matriz polimérica durante la formación de las partículas, tal como se presenta durante el secado por aspersión,

en el cual la partícula se forma por evaporación del solvente del material de la matriz, o mediante la solidificación de la matriz debido a un cambio químico.

Como se usa en la presente, el término “liposoma” se va a entender que significa una vesícula artificial pequeña, de forma esférica, que tiene al menos una bicapa lipídica. Puesto
5 que los liposomas son artificiales, se entenderá que excluyen cualquier estructura celular de origen biológico, tal como células de macroalgas marinas rojas y células de levadura y/o cualquier vesícula derivada de organismos biológicos.

El término “agente activo” puede significar un agente activo, o puede abarcar dos o más agentes activos. Sin limitaciones, el agente activo se puede seleccionar del grupo que
10 consiste en moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas, sacarinas, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, proteínas, fibroína de seda, análogos y derivados de péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, análogos y derivados de ácidos nucleicos, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, lípidos, extractos elaborados de materiales biológicos, composiciones que se presentan de manera natural o sintéticas, productos
15 biológicos, biosimilares y cualquier combinación de los mismos. Los agentes activos pueden incluir, sin limitación, agentes antimetanolgénicos adicionales tal como, pero no limitado a, 3-nitrooxipropanol (3-NOP), agentes antimicrobianos; agentes antiinflamatorios; células madre; factores de transcripción; agentes antiproliferativos; agentes anticancerígenos; factores de crecimiento; hormonas; esteroides; moduladores de enzimas o receptores; hidroxiapatita;
20 fosfato tricálcico; silsesquioxano oligomérico poliédrico (POSS); derivados de POSS; sales de piritona; ketoconazol; ácido salicílico; curcumina o un derivado de curcumina, curcuminoides; tetrahydrocurcuminoides; dióxido de titanio (TiO₂); óxido de zinc (ZnO); cloroxilenol; flavonoides; CoQ10; vitamina C; extractos de hierbas; alcaloides; ácido 13-cis retinoico; 3,4-metilendioximetanfetamina; 5-fluorouracilo; ácido 6,8-dimercaptooctanoico (ácido
25 dihidrolipoico); abacavir; acebutolol; acetaminofén; acetaminosalol; acetazolamida; ácido acetohidroxámico; ácido acetilsalicílico; acitretina; aclovate; acrivastina; actiq; aciclovir; adapaleno; adefovir dipivoxilo; adenosina; Albuterol; albuterol; alfuzosina; alicina; alopurinol; aloxantina; alilaminas; almotriptán; alfa-hidroxiácidos; alprazolam; alprenolol; acetato de aluminio; cloruro de aluminio; clorohidróxido de aluminio; hidróxido de aluminio;
30 amantadina; amilorida; aminacrina; ácido aminobenzoico (PABA); ácido aminocaproico; aminoglucósidos tal como estreptomicina, neomicina, kanamicina, paromicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, espectinomicina, sisomicina, dibekalina e isepamicina; ácido aminosalicílico; amiodarona; amitriptilina; amlodipino; amocarzina; amodiaquina; amorolfina; amoxapina; anfetamina; anfotericina B; ampicilina; anagrelida; anastrozol;

anidulafungina; antralina; sulfonamidas antibacterianas y sulfanilamidas antibacterianas, incluido ácido para-aminobenzoico, sulfadiazina, sulfisoxazol, sulfametoxazol y sulfatalidina; péptido antifúngico y derivados y análogos del mismo; apomorfinas; aprepitant; arbutina; aripiprazol; ácido ascórbico; palmitato de ascorbilo; atazanavir; atenolol; atomoxetina;

5 atropina; azatioprina; ácido azelaico; ácido azelaico; azelastina; azitromicina; bacitracina; bacitracina; beanomicinas; dipropionato de beclomefhasona; bemegrida; benazepril; bendroflumetiazida; benzocaína; ácido benzoico con un agente queratolítico; benzonatato; benzofenona; benzotropina; bepridil; beta-hidroxiácidos; beta-lactámicos que incluyen penicilina, cefalosporina y carbapenem tal como carbapenem, imipenem y meropenem;

10 dipropionato de betametasona; valerato de betametasona; brimonidina; bromfeniramina; bupivacaína; buprenorfina; bupropión; burimamida; butenafina; butenafina; butoconazol; butoconazol; cabergolina; ácido cafeico; cafeína; calcipotrieno; alcanfor; Cancidas; candesartán cilexetilo; capsaicina; carbamazepina; caspofungina; cefditoren pivoxilo; cefepima; cefpodoxima proxetilo; celecoxib; cetirizina; cevimelina; quitosano; clordiazepóxido;

15 clorhexidina; cloroquina; clorotiazida; cloroxilenol; clorfeniramina; clorpromazina; clorpropamida; ciclopirox; Ciclopirox (ciclopirox olamina); cilostazol; cimetidina; cinacalcet; ciprofloxacina; citalopram; ácido cítrico; aceite de citronela; cladribina; claritromicina; clemastina; clindamicina; clioquinol; propionato de clobetasol; clomifeno; clonidina; clopidogrel; clotrimazol; clotrimazol; clotrimazol; clozapina; cocaína; Aceite de coco; codeína;

20 colistina; colimicina; cromolín; crotamitón; Cristal violeta; ciclizina; ciclobenzaprina; cicloserina; citarabina; dacarbazina; dalfopristina; dapsona; daptomicina; daunorrubicina; deferoxamina; dehidroepiandrosterona; delavirdina; desipramina; desloratadina; desmopresina; desoximetasona; dexametasona; dexmedetomidina; dexmetilfenidato; dexrazoxano; dextroanfetamina; diazepam; diciclomina; didanosina; dihidrocodeína;

25 dihidromorfina; diltiazem; difenhidramina; difenoxilato; dipiridamol; disopiramida; dobutamina; dofetilida; dolasetrón; donepezilo; ésteres de dopa; dopamina; dopamnida; dorzolamida; doxepina; doxorubicina; doxiciclina; doxilamina; doxipina; duloxetina; diclonina; equinocandinas; econazol; Econazol; eflormthine; eletriptán; emtricitabina; enalapril; efedrina; epinefrina; epinina; epirubicina; eptifibatida; ergotamina; eritromicina; escitalopram; esmolol;

30 esomeprazol; estazolam; estradiol; ácido etacrínico; etinilestradiol; etidocaína; etomidato; famciclovir; famotidina; felodipino; fentanilo; Fenticonazol; ácido ferúlico; fexofenadina; flecainida; fluconazol; Fluconazol; flucitosina; Flucitosina o 5-fluorocitosina; acetónido de fluocinolona; fluocinonida; fluoxetina; flufenazina; flurazepam; fluvoxamina; formoterol; furosemida; galactarolactona; ácido galactónico; galactonolactona; galactosa; galantamina;

35 gatifloxacina; gefitinib; gemcitabina; gemifloxacina; ácido glucónico; ácido glicólico; ácido

glicólico; glicopéptidos tal como vancomicina y teicoplanina; griseofulvina; griseofulvina; guaifenesina; guanetidina; haloperidol; haloprogina; haloprogina; extracto de hierbas, un alcaloide, un flavonoide, abafungin; hexilresorcinol; homatropina; homosalato; hidralazina; hidroc lorotiazida; hidrocortisona; 17-butilato de hidrocortisona; 17-valerato de hidrocortisona;

5 21-acetato de hidrocortisona; hidromorfona; hidroquinona; monoéter de hidroquinona; hidroxizina; hiosciamina; hipoxantina; ibuprofeno; ichtammol; idarrubicina; imatinib; imipramina; imiquimod; indinavir; indometacina; Yodo; irbesartán; irinotecán; isavuconazol; isoconazol; isoeutarina; isoproterenol; itraconazol; itraconazol; kanamicina; ketamina; ketanserina; ketoconazol; ketoprofeno; ketotifeno; ácido kójico; labetalol; ácido láctico; ácido

10 lactobiónico; ácido lactobiónico; lamivudina; lamotrigina; lansoprazol; mirto limón; letrozol; leuprolida; levalbuterol; levofloxacina; lidocaína; lincosamidas tal como lincomicina y clindamicina; linezolid; lobelina; loperamida; losartán; loxapina; lucensomicina; dietilamida lisérgica; macrólidos o cetólidos tal como eritromicina, azitromicina, claritromicina y telitromicina; mafenida; ácido málico; ácido maltobiónico; ácido mandélico; ácido mandélico;

15 maprotilina; mebendazol; mecamilamina; meclizina; meclociclina; memantina; mentol; meperidina; mepivacaína; mercaptopurina; mescalina; metanefrina; metaproterenol; metaraminol; metformina; metadona; metanfetamina; metotrexato; metoxamina; nicotinato de metilo; salicilato de metilo; ésteres de metildopa; metildopamida; ácido metil láctico; metilfenidato; metiamida; metolazona; metoprolol; metronidazol; mexiletina; micafungina;

20 miconazol; Miconazol; midazolam; midodrina; miglustat; minociclina; minoxidil; mirtazapina; mitoxantrona; moexiprilato; molindona; monobenzona; monolactamas tal como penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezilicilina, piperacilina, azlocilina, temocilina, cephalotina, cefapirina, cefradina, cefaloridina, cefazolina, cefamandol, cefuroxima, cefalexina, cefprozil, cefaclor,

25 loracarbef, cefoxitina, cefmetazol, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuten, cefdinir, cefpiroma, cefepima y astreonam; morfina; moxifloxacina; moxonidina; mupirocina; nadolol; naftifina; naftifina; nalbufina; nalmefero; naloxona; naproxeno; natamicina; aceite de semilla de neem; nefazodona; nelfinavir; neomicina; nevirapina; N-guanilhistamina; nicardipina; nicotina; nifedipina;

30 nikomicinas; nimodipina; nisoldipina; nizatidina; noradrenalina; nistatina; nistatina; octopamina; octreotida; metoxicinamato de octilo; salicilato de octilo; ofloxacina; olanzapina; Extracto de hoja de olivo; olmesartán medoxomilo; olopatadina; omeprazol; Omoconazol; ondansetrón; Aceite de naranja; oxazolidinonas tal como linezolid; oxiconazol; Oxiconazol; oxotremorina; oxibenzona; oxibutinina; oxicodona; oximetazolina; padimato O; aceite de

35 palmarosa; palonosetrón; ácido pantoténico; pantoil lactona; paroxetina; pachulí; pemolina;

penciclovir; penicilamina; penicilinas; pentazocina; pentobarbital; pentostatina; pentoxifilina; pergolida; perindopril; permetrina; fenciclidina; fenelzina; feniramina; fenmetrazina; fenobarbital; fenol; fenoxibenzamina; fenpropimorf; fentolamina; fenilefrina; fenilpropanolamina; fenitoína; fosfonomicina; fisostigmina; pilocarpina; pimizida; pindolol;

5 pioglitazona; pipamazina; butóxido de piperonilo; pirenzepina; piroctona; piroctona olamina; podofdoxo; podofilina; poligodio; polihidroxiácidos; polimixina; posaconazol; pradimicinas; pramoxina; pratipexol; prazosina; prednisona; prenalterol; prilocaína; procainamida; procaína; procarbazona; promazina; prometazina; propionato de prometazina; propafenona; propoxifeno; propranolol; propiltiouracilo; protriptilina; pseudoefedrina; piretrina; pirilamina;

10 pirimetamina; quetiapina; quinapril; quinetazona; quinidina; quinolonas tal como ácido nalidíxico, ácido oxolínico, norfloxacin, pefloxacin, enoxacin, ofloxacin, levofloxacin, ciprofloxacina, temafloxacina, lomefloxacina, fleroxacin, grepafloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina, clinafloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, sitafloxacina, besifloxacina, besifloxacina, clintafloxacina, ganefloxacina, gemifloxacina y pazufloxacina; quinupristina;

15 rabeprazol; Ravuconazol; reserpina; resorcinol; retinal; ácido retinoico; retinol; acetato de retinilo; palmitato de retinilo; ribavirina; ácido ribónico; ribonolactona; rifampicina; rifamicinas tal como rifampicina (también llamada rifampicina), rifapentina, rifabutina, bezoxazinorifamicina y rifaximina; rifapentina; rifaximina; riluzol; rimantadina; ácido risedrónico; risperidona; ritodrina; rivasfigmina; rizatriptán; ropinirol; ropivacaína; salicilamida;

20 ácido salicílico; ácido salicílico; salmeterol; escopolamina; selegilina; Selenio; sulfuro de selenio; serotonina; sertaconazol; sertindol; sertralina; sibutramina; sildenafil; fibroína de seda; sordarinas; sotalol; estreptograminas tal como quinupristina y daflopristina; estreptomicina; estricnina; sulconazol; Sulconazol; sulfabenzol; sulfabenzamida; sulfbromometazina; sulfacetamida; sulfaclorpiridazina; sulfacitina; sulfadiazina; sulfadimetoxina; sulfadoxina;

25 sulfaguanol; sulfaleno; sulfametizol; sulfametoxazol; sulfanilamida; sulfapirazina; sulfapiridina; sulfasalazina; sulfasomizol; sulfatiazol; sulfisoxazol; tadalafilo; tamsulosina; ácido tartárico; tazaroteno; Aceite de árbol de té - ISO 4730 ("Aceite de Melaleuca, tipo Terpinen-4-ol"); tegaserol; telitromicina; telmisartán; temozolomida; tenofovir disoproxil; terazosina; terbinafina; Terbinafina; terbutalina; terconazol; Terconazol; terfenadina; tetracaína;

30 tetraciclina; tetraciclinas tal como tetraciclina, clortetraciclina, demeclociclina, minociclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina; tetrahidrozolina; teobromina; teofilina; tiabendazol; tioridazina; tiotixeno; timol; tiagabina; timolol; tinidazol; tioconazol; Tioconazol; tirofibán; tizanidina; tobramicina; tocainida; tolazolina; tolbutamida; tolnaftato; Tolnaftato; tolterodina; tramadol; tranilcipromina; trazodona; acetónido de triamcinolona; diacetato de triamcinolona;

35 hexacetónido de triamcinolona; triamtereno; triazolam; triclosán; triclosán; Triclosán;

triflupromazina; trimetoprima; trimetoprima; trimipramina; tripelenamina; triprolidina; trometamina; ácido trópico; tiramina; ácido undecilénico; Ácido undecilénico; urea; ácido urocánico; ursodiol; vardenafilo; venlafaxina; verapamilo; vitamina C; acetato de vitamina E; voriconazol; Voriconazol; warfarina; xantina; zafirlukast; zaleplón; piritona de zinc; Sulfuro de zinc y selenio; ziprasidona; zolmitriptán; zolpidem; WS-3; WS-23; mentol; P-mentanos 3-sustituídos; P-mentano-3-carboxamidas N-sustituídas; isopulegol; 3-(1-mentoxi)propano-1,2-diol; 3-(1-mentoxi)-2-metilpropano-1,2-diol; p-mentano-2,3-diol; p-mentano-3,8-diol; 6-isopropil-9-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decano-2-metanol; succinato de mentilo y sus sales de metales alcalinotérreos; trimetilciclohexanol; N-etil-2-isopropil-5-metilciclohexanocarboxamida; aceite de menta japonés; aceite de menta; mentona; mentona glicerol cetil; lactato de mentilo; 3-(1-mentoxi)etan-1-ol; 3-(1-mentoxi)propan-1-ol; 3-(1-mentoxi)butan-1-ol; N-etilamida de ácido 1-mentilacético; 1-mentil-4-hidroxipentanoato; 1-mentil-3-hidroxibutirato; N,2,3-trimetil-2-(-1-metiletil)-butanamida; n-etil-t-2-c-6-nonadienamida; N,N-dimetil-mentil succinamida; carboxilato de pirrolidona de mentilo; áloe; aceite de aguacate; extracto de té verde; extracto de lúpulo; extracto de manzanilla; avena coloidal; calamina; extracto de pepino; palmato de sodio; kernelato de palma sódico; butyrospermum parkii (es decir, manteca de karité); aceite de hoja de menthe piperita (es decir, menta); sericina; piridoxina (una forma de vitamina B6); palmitato de retinilo y/u otras formas de vitamina A; acetato de tocoferilo y/u otras formas de vitamina E; laurato de laurilo; ácido hialurónico; polvo de jugo de hoja de aloe barbadensis; extracto de fruta de euterpe oleracea (es decir, baya de acai); riboflavina (es decir, vitamina B2); tiamina HC1 y/u otras formas de vitamina B1; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); citrato; ácido etilenglicol tetraacético (EGTA); ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA); ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS); ácido dimercaptosuccínico (DMSA); ácido α -lipoico; salicilaldehído isonicotinoil hidrazona (SIH); clorhidrato de hexiltioetilamina (HTA); deferrioxamina; ácido ascórbico (vitamina C); cisteína; glutatión; ácido dihidrolipoico; ácido 2-mercaptoetanosulfónico; ácido 2-mercaptobencimidazolsulfónico; ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; metabisulfito de sodio; isómeros de vitamina E tal como α -, β -, γ - y δ -tocoferoles y α -, β -, γ - y δ -tocotrienoles; polifenoles tal como 2-terc-butil-4-metilfenol, 2-terc-butil-5-metilfenol y 2-terc-butil-6-metilfenol; hidroxianisol butilado (BHA) tal como 2-terc-butil-4-hidroxianisol y 3-terc-butil-4-hidroxianisol; butilhidroxitolueno (BHT); terc-butilhidroquinona (TBHQ); palmitato de ascorbilo; galato de n-propilo; extracto de soja; isoflavonas de soja; retinoides tal como retinol; ácido kójico; dipalmitato kójico; hidroquinona; arbutina; ácido ransexámico; vitaminas tal como niacina y vitamina C; ácido azelaico; ácido linolénico y ácido linoleico; placertia; regaliz; y

extractos tal como manzanilla y té verde; peróxido de hidrógeno; peróxido de zinc; peróxido de sodio; hidroquinona; 4-isopropilcatecol; éter monobencílico de hidroquinona; ácido kójico; ácido láctico; ácido ascorbilo y derivados tal como fosfato de ascorbilo y magnesio; arbutina; raíz de regaliz; dihidroxiacetona (DHA); aldehído de glicerilo; tirosina y derivados de tirosina

5 tal como maliltirosina, glucosinato de tirosina y etiltirosina; fosfo-DOPA; indoles y derivados; glucosamina; N-acetilglucosamina; sulfato de glucosamina; manosamina; N-acetil manosamina; galactosamina; N-acetil galactosamina; compuestos de N-acilaminoácidos (por ejemplo, N-undecilenoil-L-fenilalanina); flavonoides tal como quercetina, hesperidina, quercitrina, rutina, tangeritina y epicatequina; CoQ10; vitamina C; hidroxiaácidos que incluyen

10 alfa-hidroxiaácidos C2-C30 tal como ácido glicólico, ácido láctico, ácido 2-hidroxibutanoico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido alfa-hidroxietanoico, ácido hidroxicaprílico y similares; beta hidroxiaácidos que incluyen ácido salicílico y polihidroxiaácidos que incluyen gluconolactona (G4); ácido retinoico; ácido gamma-linolénico; absorbente ultravioleta del sistema de ácido benzoico tal como ácido para-aminobenzoico (en adelante, abreviado como

15 PABA), éster de monoglicerina de PABA, éster etílico de N,N-dipropoxi PABA, éster etílico de N,N-dietoxi PABA, éster etílico de N,N-dimetil PABA, éster butílico de N,N-dimetil PABA y éster metílico de N,N-dimetil PABA y similares; absorbente ultravioleta de un sistema de ácido antranílico tal como antranilato de homomentilo-N-acetilo y similares; absorbente ultravioleta de un sistema de ácido salicílico tal como salicilato de amilo, salicilato de mentilo, salicilato de

20 homomentilo, salicilato de octilo, salicilato de fenilo, salicilato de bencilo, salicilato de p-isopropanol fenilo y similares; absorbente ultravioleta del sistema de ácido cinámico tal como octil cinamato, etil-4-isopropil cinamato, metil-2,5-diisopropil cinamato, etil-2,4-diisopropil cinamato, metil-2,4-diisopropil cinamato, propil-p-metoxi cinamato, isopropil-p-metoxi cinamato, isoamil-p-metoxi cinamato, octil-p-metoxicinamato(2-etilhexil-p-metoxicinamato), 2-

25 etoxietil-p-metoxicinamato, ciclohexil-p-metoxicinamato, etil-a-ciano-p-fenil cinamato, 2-etilhexil-a-ciano- P-fenil cinamato, gliceril-mono-2-etilhexanoil-dipara-metoxi-cinamato, metil-bis(trimetilsiloxano)sililisopentil-trimetoxi cinamato y similares; 3-(4'-metilbenciliden)-d, 1-alcanfor; 3-benciliden-d,l-alcanfor; ácido urocánico, éster etílico de ácido urocánico; 2-fenil-5-metilbenzoxazol; 2,2'-hidroxi-5-metilfenilbenzotriazol; 2-(2'-hidroxi-5'-t-octilfenil)benzotriazol;

30 2-(2'-hidroxi-5'-metilfenilbenzotriazol; dibenzaladina; dianisoilmetano; 4-metoxi-4'-t-butildibenzoilmetano; 5-(3,3-dimetil-2-norborniliden)-3-pentano-2-ona; dimorfolinopiridazinona; óxido de titanio; óxido de titanio en partículas; óxido de zinc; óxido de zinc en partículas; óxido férrico; óxido férrico en partículas; óxido cérico; protectores solares inorgánicos tal como dióxido de tianio y óxido de zinc; protectores solares orgánicos tal como

35 cinamatos de octilmetilo y derivados de los mismos; retinoides; vitaminas tal como vitamina

E, vitamina A, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina B y derivados de las mismas tal como acetato de vitamina E, palmitato de vitamina C y similares; antioxidantes que incluyen alfa hidroxiaácido tal como ácido glicólico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido mandélico, ácido ascórbico, ácido alfa-hidroxibutírico, ácido alfa-hidroxiisobutírico, ácido alfa-hidroxiisocaproico, ácido atroláctico, ácido alfa-hidroxiisovalérico, piruvato de etilo, ácido galacturónico, ácido glucopethónico, glucofeptono-1,4-lactona, ácido glucónico, gluconolactona, ácido glucurónico, glucurronolactona, ácido glicólico, piruvato de isopropilo, piruvato de metilo, ácido mícico, ácido piruvia, ácido sacárico, ácido sacárico 1,4-lactona, ácido tartárico y ácido tartrónico; beta-hidroxiaácidos tal como ácido beta-hidroxibutírico, ácido beta-fenil-láctico, ácido beta-fenilpirúvico; extractos botánicos tal como té verde, soja, cardo mariano, algas, aloe, angélica, naranja amarga, café, fibra de oro, pomelo, hoellen, madreSelva, lágrimas de Job, litospermo, morera, peonía, pueraria, arroz y cártamo; 21-acetoxipregnenolona; alclometasona; algestona; amcinonida; beclometasona; betametasona; budesonida; cloroprednisona; clobetasol; clobetasona; clocortolona; clocprednol; corticosterona; cortisona; cortivazol; deflazacort; desonida; desoximetasona; dexametasona; diflorasona; diflucortolona; difluprednato; enoxolona; fluazacort; fluccloronuro; flunisolida de flumetasona; acetónido de fluocinolona; fluocinonida; butilo fluocortina; fluocortolona; fluorometolona; acetato de fluperolona; acetato de fluprednidenol; fluprednisolona; flurandrenolida; propionato de fluticasona; formocortal; halcinonida; propionato de halobetasol; halometasona; acetato de halopredona; hidrocortamato; hidrocortisona; etabonato de loteprednol; mazipredona; medrysone; meprednisona; metilprednisolona; furcato de mometasona; parametasona; prednicarbato; prednisolona; 25-dietilamino-acetato de prednisolona; fosfato sódico de prednisolona; prednisona; prednival; prednilidenol; rimexolona; tixocortol; triamcinolona; acetónido de triamcinolona; benetonida de triamcinolona; hexacetónido de triamcinolona; inhibidores de COX tal como derivados de ácido salicílico (por ejemplo, aspirina, salicilato de sodio, trisalicilato de colina y magnesio, salicilato, diflunisal, sulfasalazina y olsalazina); derivados de paraaminofenol tal como acetaminofén; ácidos indol e indenoacéticos tal como indometacina y sulindaco; ácidos heteroaril acéticos tal como tolmetina, dicofenaco y ketorolaco; ácidos arilpropiónicos tal como ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno y oxaprozina; ácidos antranílicos (fenamatos) tal como ácido mefenámico y meloxicam; ácidos enólicos tal como los oxicams (piroxicam, meloxicam); alcanonas tal como nabumetona; furanonas diarilsustituídas tal como refecoxib; pirazoles diaril-sustituídos tal como celecoxib; ácidos indolacéticos tal como etodolaco; sulfonanilidas tal como nimesulida; sulfuro de selenio; azufre; aceite de esquisto sulfonado; ácido salicílico; alquitrán de hulla; povidona yodada,

imidazoles tal como ketoconazol, diclorofenil imidazolodioxalano, clotrimazol, itraconazol, miconazol, climbazol, tioconazol, sulconazol, butoconazol, fluconazol, miconazolnitrito; antralina; piroctona olamina (Octopirox); ciclopirox olamina; agentes antipsoriasis; análogos de vitamina A; corticosteroides; y cualquier combinación de los mismos, incluidas formas de nanopartículas o composiciones de nanopartículas que comprenden cualquiera de los agentes activos mencionados anteriormente.

Otras definiciones para términos seleccionados usados en la presente se pueden encontrar dentro de la descripción detallada de la invención y se aplican en todo momento. A menos que se defina de otro modo, todos los demás términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en la técnica al cual pertenece esta invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que muchos de los problemas asociados con la volatilidad y/o toxicidad y/o potencial contaminante ambiental de compuestos de halocarburo que poseen actividad como inhibidores de la metanogénesis en rumiantes se pueden mejorar y/o superar mediante la estabilización como emulsiones o polvos secos derivados de emulsiones que comprenden estos compuestos de halocarburo. Este enfoque proporciona las ventajas adicionales de abordar los problemas asociados con la variabilidad de dosis implicada en el uso de algas marinas como aditivo para alimento, en tanto que supera los problemas asociados con los impactos ambientales de la producción comercial de algas marinas y la cosecha de algas marinas en ambientes marinos.

Los metanógenos son microorganismos que producen metano como producto de desecho de su metabolismo. Desempeñan un papel crucial en el sistema digestivo de los rumiantes. El abomaso, rumen, omaso y retículo son los cuatro componentes clave del tracto digestivo de un rumiante. El alimento con saliva se entrega primero al rumen, donde se descompone en partículas más pequeñas, entonces al retículo, donde se descompone aún más en partículas más pequeñas, y las partículas no digeribles se envían de vuelta al rumen para volver a masticar. El rumen es el hogar de la mayoría de los microorganismos anaeróbicos que ayudan en la descomposición de celulosa. Son responsables de iniciar el proceso de fermentación. El animal absorbe ácidos grasos, vitaminas y contenido de nutrientes cuando pasa alimentos parcialmente digeridos del rumen al omaso, que reduce el pH y, por lo tanto, desencadena la liberación de enzimas para descomponer aún más los alimentos, que entonces se pasan al abomaso, que absorbe los nutrientes restantes antes de

la excreción. Este procedimiento dura aproximadamente 9–12 horas.

Los microbios en el sistema digestivo de los rumiantes responsables de la metanogénesis incluyen *Methanobrevibacter ruminantium*, una arquea metanoica, que utiliza hidrógeno, implicada en la creación de metano y *Methanosarcina barkeri*, una arquea metanoica, que utiliza hidrógeno, implicada en la creación de metano y dióxido de carbono.

En estas y otras especies de arqueas, la metil-coenzima M reductasa (MCR) cataliza el paso limitante de velocidad de la metanogénesis (el paso final en el proceso de metanogénesis biosintética). Las bacterias que emiten mayor cantidad de H₂ también se correlacionan con una mayor metanogénesis. Mientras tanto, la producción de propionato por otros grupos bacterianos consume H₂ ruminal, reduciendo de esta manera el suministro de sustratos de metanogénesis, dando por resultado menor producción de CH₄. El succinato y lactato también son precursores de la producción de propionato. Como resultado, las bacterias productoras de succinato en el bioma gastrointestinal de rumiantes se correlacionan con metanogénesis reducida.

Los compuestos de halocarburo que incluyen bromoformo bloquean la función de las enzimas corrinoides y por lo tanto, inhiben la transferencia de grupo metilo dependiente de cobamida, requerida para sintetizar metil-coenzima M reductasa, la enzima clave implicada en el paso final de la metanogénesis, al unirse y secuestrar el grupo protésico requerido por MCR para formar CH₄. También se ha sugerido en la literatura un mecanismo paralelo de inhibición de la metanogénesis por compuestos de halocarburo, por el cual los sustituyentes halógenos actúan como aceptores de electrones terminales.

Las composiciones de la presente invención se pueden examinar para actividad como inhibidores de metanogénesis, utilizando métodos *in vitro* conocidos de la técnica anterior, tal como aquellos descritos en la presente, o aquellos reportados en Ramin, M.; Huhtanen, P. “Development of an in vitro method for determination of methane production kinetics using a fully automated in vitro gas system—A modelling approach.” *Anim. FeedSci. Technol.* 2012, 174, 190–200; and Chagas, J. C. et al “In Vitro Evaluation of Different Dietary Methane Mitigation Strategies”, *Animals* 2019, 9, 1120, el contenido de los cuales documentos publicados previamente se incorporan por la presente en su totalidad.

Dentro del significado de la presente invención, el efecto antimetanogénico de las composiciones de la presente invención se puede medir en el rumen con un sistema de rumen artificial, tal como aquellos mencionados anteriormente, o tal como los descritos en la

presente, o tal como los descritos en T. Hano, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1993, 39, 35-45, o por administración oral *in vivo* a rumiantes, el contenido del cual documento publicado previamente se incorpora por la presente en su totalidad.

Las composiciones de la presente invención se pueden evaluar para estabilidad en términos de volatilidad reducida del o de los compuestos de halocarburo en las composiciones en comparación con la volatilidad del o de los compuestos de halocarburo aislados correspondientes, como se determina por mediciones de presión de vapor realizadas de acuerdo con cualquiera de las técnicas experimentales descritas en Ambrose, D., "Vapor pressure" *Experimental Thermodynamics of Non-reacting Systems*, Le Neindre, B.; Vodar, B., Eds. Butterworths: London, 1975; pp 607-656. [ISBN 0408705663]; Carson, A. S., "The measurement of vapor pressure." *Thermochemistry and Its Applications to Chemical and Biochemical Systems*, Ribeiro da Silva, M. A. V., Ed., D.Riedel Publishing Company: 1984; pp 127-41. [ISBN 978-9027716989]; Verevkin, S. P., "Phase Changes in Pure Component Systems: Liquids and Gases." *Measurement of the Thermodynamic Properties of Multiple Phases*, Weir, R. D.; de Loos, T. W., Eds. Elsevier: Amsterdam, 2005; pp 5-30. [ISBN 0444519777]; o Delle Site, A., "The vapor pressure of environmentally significant organic chemicals: a review of methods and data at ambient temperature." *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 1997, 26, (1), 157-193,, el contenido de los cuales documentos publicados previamente se incorporan por la presente en su totalidad.

La invención se describirá ahora con mayor detalle, a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes ejemplos en los cuales se ha desarrollado una gama de enfoques para la estabilización de compuestos de halocarburo con actividad antimetanogénica, utilizando ingredientes de formulación que son alimentos, o aditivos alimentarios, o derivados de alimentos, o En general Reconocidos Como Seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) de acuerdo con la legislación y regulaciones relevantes aplicadas por la USFDA.

En algunos de estos enfoques, se utilizan proteínas de leche derivadas de leche entera o sólidos de leche. Sin desear que se limite por teoría, los presentes inventores creen que las proteínas globulares tal como aquellas encontradas en la leche actúan como emulsionantes y contribuyen a la estabilidad de las formulaciones de algunas modalidades de la invención al unirse a los compuestos de halocarburo antimetanogénicos en estas formulaciones.

EJEMPLOS

Materiales

La leche pasteurizada fresca (PURA™), leche entera en polvo (Devondale™), fórmula para lactantes (Aptamil Gold+™), gelatina, goma xantana/de xantano (Macro™) y lecitina de soja (Macro™) se compraron de un supermercado local; bromoformo (CHBr₃), Tween y ácido nítrico (HNO₃) (grado analítico) se compraron de Sigma Aldrich; EtOH (95 %) se compró de CSR; MCT (triglicérido caprílico/cáprico) se compró de Australian Wholesale Oils; se usó agua de alta pureza.

Preparación de emulsiones

Emulsión 1: El bromoformo (195 mg), EtOH (75 ml) y lecitina (1500 mg) se combinaron con leche fresca entera hasta un volumen total de 1000 ml con agitación mecánica a temperatura ambiente.

Emulsión 2: Se combinaron bromoformo (195 mg), EtOH (75 ml) y leche entera en polvo (200 g) con agua de alta pureza hasta un volumen total de 1000 ml con agitación mecánica a temperatura ambiente.

Se observó una reducción notable de bromoformo como se detecta por el olor tras la formación de ambas emulsiones. Las emulsiones se almacenaron a 2-5 °C durante 7 días y se tomó una alícuota de cada solución para el ensayo cada día.

Preparación de polvos secos

50 ml de cada una de las emulsiones 1 y 2 se sometieron a secado por aspersión para formar muestras de polvo seco para el análisis.

Caracterización

Las alícuotas de las emulsiones se diluyeron 5x (2 partes de emulsión con 8 partes de diluyente) con una solución 1:1 de ácido nítrico al 3 % (en agua de alta pureza) y etanol (por lo tanto, la concentración de ácido nítrico en la solución 1:1 fue 1,5 %) como diluyente, y se analizaron por plasma acoplado inductivamente – espectroscopía de emisión atómica (ICP-AES) para determinar el contenido de bromo de las emulsiones cada día. La concentración de bromo se determinó contra estándares de calibración de alta pureza. Se adicionó etanol (20 % en agua de alta pureza) a los estándares de calibración para garantizar que la calibración externa fuera comparable. También se analizaron muestras de control que contienen todos los componentes que corresponden a cada una de las emulsiones 1 y 2 pero sin bromoformo adicionado, y estas muestras de control arrojaron resultados por debajo del

límite de detección del aparato ICP-AES.

Las muestras del polvo seco (200 mg) se tomaron cada día y se volvieron a emulsionar en 10 ml de etanol al 20 % en agua de alta pureza antes de someterse al mismo análisis ICP-AES usado para analizar las emulsiones.

5 Resultados

Tabla 1 – Estabilidad de bromoformo en composiciones de emulsión

T=Días	Conc. de CHBr ₃ calculado (mg/kg)	T=0 CHBr ₃ (mg/kg)	T=1 CHBr ₃ (mg/kg)	T=2 CHBr ₃ (mg/kg)	T=5 CHBr ₃ (mg/kg)	T=7 CHBr ₃ (mg/kg)	T=14 CHBr ₃ (mg/kg)
Emulsión 1	195	180±14	161±17	158±13	150±19	165±9,1	163±14
Emulsión 2	195	185±18	179±14	189±16	184±8	190±15	185±16

Los resultados en la tabla 1 demuestran que ambas emulsiones han mantenido niveles estables de bromoformo bajo las condiciones probadas.

10 Tabla 2 – Estabilidad de bromoformo en composiciones de polvo seco

T=Días	Masa de polvo recuperado (g)	Recuperación de polvo (%)	Conc. de CHBr ₃ calculado Sólido (mg/kg) con base en datos de emulsión T=7	T=0 CHBr ₃ (mg/kg)	T=2 CHBr ₃ (mg/kg)	T=7 CHBr ₃ (mg/kg)
Emulsión 1	4,43 g	68,15	1270	785±80	792±80	769±75

Emulsión 2	8,25 g	82,5	950	849±85	860±85	845±80
T=Días	T=30 CHBr₃ (mg/kg)	T=60 CHBr₃ (mg/kg)	T = 90 CHBr₃ (mg/kg)	T = 180 CHBr₃ (mg/kg)	T = 240 CHBr₃ (mg/kg)	T = 360 CHBr₃ (mg/kg)
Emulsión 1	765±60	770±65	750±69	745±82	739±43	725±48
Emulsión 2	882±91	880±75	840±71	842±79	835±62	826±65

- Los resultados en la tabla 2 demuestran que aunque se perdió algo de bromoformo durante el secado por aspersión (concentración de bromoformo calculada con base en datos de emulsión T = 7 versus datos T = 0 para los polvos secos), los polvos secos derivados de ambas emulsiones han mantenido niveles estables de bromoformo durante hasta 360 días bajo las condiciones probadas. La estabilidad de las muestras de polvos secos preparados a partir de la emulsión 1 y emulsión 2 también se validaron a T = 360 días mediante GCMS.

Preparación de composiciones adicionales

- Una serie de modalidades adicionales de las composiciones de la invención se prepararon como se proporciona en la tabla 3.

Tabla 3 – Formulaciones de composición de halocarburo estabilizadas

ID de la formulación	Tipo	Preparación
R8-1	Portador de leche entera (incluidos emulsionantes)	Solución madre (142 mg/ml de bromoformo) preparada: 38 ml de MCT, 0,25-1 ml de etanol, 2 ml de bromoformo. Diluido con MCT para la concentración objetivo para ensayo. Diferentes concentraciones preparadas: solo leche, 1,5 mg/m bromoformo, 0,75 mg/m y 0,15 mg/ml

ID de la formulación	Tipo	Preparación
R8-2	Leche en polvo re-emulsionada	29 g de leche en polvo/200 ml de solución acuosa preparada. Solución madre (142 mg/ml de bromoformo) preparada: 38 ml de MCT, 0,25-1 ml de etanol, 2 ml de bromoformo. Pequeño volumen de espícula adicionado a la solución de leche en polvo para la concentración objetivo para ensayo. Diferentes concentraciones preparadas: solo solución de leche en polvo, 1,5 mg/m bromoformo, 0,75 mg/m y 0,15 mg/ml
R8-3	Doble relación sólido:leche	58 g de leche en polvo/200 ml de solución acuosa preparada. Solución madre (142 mg/ml de bromoformo) preparada: 38 ml de MCT, 0,25-1 ml de etanol, 2 ml de bromoformo. Pequeño volumen de espícula adicionado a la solución de leche en polvo para la concentración objetivo para ensayo. Diferentes concentraciones preparadas: solo solución de leche en polvo, 1,5 mg/m bromoformo, 0,75 mg/m y 0,15 mg/ml
R8-4	Fórmula para lactantes	4 cucharadas de fórmula para lactantes en polvo en 200 ml de agua caliente preparada. Solución madre (142 mg/ml de bromoformo) preparada: 38 ml de MCT, 0,25-1 ml de etanol, 2 ml de bromoformo. Pequeño volumen de espícula adicionado a la solución de fórmula para lactantes en polvo para la concentración objetivo para ensayo. Diferentes concentraciones preparadas: solo solución de fórmula para lactantes en polvo, 1,5 mg/m bromoformo, 0,75 mg/m y 0,15 mg/ml
R8-5	MCT	Solución madre (144,5 mg/ml de bromoformo) preparada: 25 ml de MCT, 0,25-0,75 ml de etanol, 2m de bromoformo. Diluido con MCT para la concentración objetivo para ensayo
R8-7	gelatina sólida - clara	25 g de leche en polvo, 20 g de gelatina en polvo, 175 ml de agua, bromoformo a dosis. Preparar primero leche en polvo de estrategia y agua. Entonces bromoformo. Entonces Gelatina. Mezclar y verter en moldes

ID de la formulación	Tipo	Preparación
R8-9	relación doble de leche líquida	Solución madre (142 mg/ml de bromoformo) preparada: 38 ml de MCT, 0,25-1 ml de etanol, 2 ml de bromoformo. 58 g de leche en polvo/200 ml de solución acuosa de leche en polvo preparada. Solución de leche en polvo enriquecida con solución madre para dosificar. Diferentes concentraciones preparadas - intervalo de 0 a 3 mg/ml
R8-10	relación doble de leche sólida	Solución madre (142 mg/ml de bromoformo) preparada: 38 ml de MCT, 0,25-1 ml de etanol, 2 ml de bromoformo. 58 g de leche en polvo/200 ml de agua, 20 g de solución de gelatina de leche en polvo preparada. Solución de gelatina de leche en polvo enriquecida con solución madre para dosificar. Diferentes concentraciones preparadas - intervalo de 0 a 3 mg/ml
R8-11	Aceite de MCT	Solución madre (142 mg/ml de bromoformo) preparada: 38 ml de MCT, 0,25-1 ml de etanol, 2 ml de bromoformo.
R8-12	soluble en agua	Agua (350 ml) y lecitina (3,5 ml) preparada. Bromoformo (0,5 ml) adicionado para preparar una solución madre de esta solución. Esto se diluyó entonces usando una solución de lecitina/agua coincidente para alcanzar la dosis.
R8-13	soluble en agua	Agua (350 ml) y lecitina (3,5 ml) y goma xantana (1,5 g) preparada. Bromoformo (0,5 ml) adicionado para preparar una solución madre de esta solución. Esto se diluyó entonces usando una solución de lecitina/agua coincidente para alcanzar la dosis.
R8-14	soluble en agua	Agua (350 ml) y lecitina (3,5 ml) preparada. Se adicionó bromoformo (0,2 ml) a MCT (30 ml). Esta solución de MCT/bromoformo entonces se enriqueció para alcanzar la dosis en solución de agua/lecitina.
R8-15	soluble en agua	Agua (330 ml) y lecitina (5 ml) y goma xantana (1 g) preparada. Se adicionó bromoformo (2 ml) a MCT (38 ml). Esta solución de MCT/bromoformo entonces se enriqueció para alcanzar la dosis en solución de agua/lecitina/goma.

ID de la formulación	Tipo	Preparación
R8-17	soluble en agua	Agua (350 ml) y lecitina (3,5 ml) y goma xantana (1,5 g) preparada. Se adicionó bromoformo (2 ml) a MCT (38 ml). Esta solución de MCT/bromoformo entonces se enriqueció para alcanzar la dosis en solución de agua/lecitina/goma.
R8-18	Tween soluble en agua	Agua (350 ml) y Tween (0,5 %/v) preparada. Se adicionó bromoformo para lograr concentración objetivo.
R8-19	Tween soluble en agua	Agua (350 ml) y Tween (0,01 %) y goma xantana (1-5 %) preparada. Se adicionó bromoformo (2 ml) a MCT (30 ml). Esta solución de MCT/bromoformo entonces se enriqueció para alcanzar la dosis en solución de agua/lecitina/goma.
R8-9i	relación doble de leche líquida	53 g de leche en polvo, elaborada hasta 185 g con agua caliente = solución madre de leche de bromoformo elaborada con esta solución de leche mediante la adición de bromoformo y entonces diluida con solución de leche para dosificar
R8-10i	relación doble de leche sólida	50 g de leche en polvo, 20 g de gelatina en polvo hasta 175 g de agua. Bromoformo adicionado a la concentración de espícula.
R8-17i	soluble en agua	Agua (350 ml) y lecitina (3,5 ml) y goma xantana (1,5 g) preparada. Se adicionó bromoformo (0,2 ml) a MCT (30 ml). Esta solución de MCT/bromoformo entonces se enriqueció para alcanzar la dosis en solución de agua/lecitina/goma.

Todas las formulaciones se prepararon mediante la adición de los ingredientes en el orden indicado en la tabla 3, con agitación mecánica a temperatura ambiente (a menos que se indique de otro modo).

5 Formulación de liberación lenta (sólida)

Se desarrolló un procedimiento general para la preparación de una formulación sólida de liberación lenta que es adecuada para incorporación en un bolo, que implica los siguientes pasos de preparación. Los ejemplos de estas formulaciones son R8-10 y R8-10i.

Se prepara una solución madre de MCT/bromoformo (144,5 mg/ml bromoformo): 25 ml de MCT, 0,25-0,75 ml de etanol, 2m de bromoformo. Se prepara una pasta de leche en polvo (100 g) mediante la adición cuidadosa de agua con agitación. Se adiciona una alícuota medida de solución madre de MCT/Bromoformo a la pasta con agitación. Se adicionan agua adicional y entonces gelatina (100 g) a la mezcla con agitación para lograr una mezcla homogénea. La mezcla entonces se vierte en moldes y se deja fraguar. La dosis de bromoformo en cada comprimido, píldora o tableta sólida de liberación lenta se determina al dividir la cantidad total de bromoformo en la alícuota de solución madre usada en su preparación por el número de comprimidos, píldoras o tabletas sólidas producidas.

- 10 Cuando se colocan en agua a temperatura ambiente, las formulaciones sólidas de liberación lenta preparadas de acuerdo con este procedimiento no se disuelven completamente después de 21 días.

Actividad antimetanogénica

- 15 Para investigar la actividad antimetanogénica de las formulaciones de composición de halocarburo estabilizado de la invención, se realizó un examen por lotes *in vitro* de las formulaciones de acuerdo con los procedimientos descritos en Durmic et al (Durmic, Z, Hutton, P, Revell, DK, Emms, J, Hughes, S, Vercoe, PE (2010) "In vitro fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants." *Animal Feed Science and Technology* 160, 98–109, & Durmic, Z, Moate, PJ, Eckard, R, Revell, DK, Williams, R, Vercoe, PE (2014) "In vitro screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 1191-1196. 10.1002/jsfa.6396), el contenido de los documentos se incorporan por la presente en su totalidad.

- 25 La metodología imita los procesos en el rumen. El fluido ruminal y la digesta se recolectan de ovejas donantes fistuladas y se mezclan con el sustrato que contiene el tratamiento en un recipiente de fermentación. Entonces, el sustrato se fermenta por los microbios de rumen durante un período de tiempo (como lo sería en el animal), y al final de la incubación, la actividad microbiana se valora al medir los parámetros (es decir, pH) y los productos finales tal como gas microbiano, CH₄, ácidos grasos volátiles (VFA) y NH₃. La IVFT es una incubación a corto plazo (es decir, 24 h), encerrada en un tubo de ensayo o vial, que es adecuada para examinar actividad antimetanogénica.

Se realizó una serie de ensayos de fermentación por lotes *in vitro* (IVFT) en muestras

de sustrato en la ausencia de halocarburo (portadores de formulación solamente) y en la presencia de un intervalo de diferentes formulaciones que tienen un intervalo de dosis de halocarburo.

5 Los experimentos se llevaron a cabo usando fluido ruminal de donantes de ovejas fistuladas estandarizadas. Los animales y su uso fueron aprobados bajo el protocolo UWA AEC RA/3/100/1622. Las ovejas se eligieron con preferencia al ganado vacuno debido a que son menos costosas, y en esta etapa de evaluación, las diferencias en el líquido ruminal y la actividad de los microbios entre las dos especies de rumiantes son insignificantes.

10 Una paja de avena de alimentación alta en fibra se usó como un sustrato de fermentación y como control a lo largo de los experimentos. La paja de avena se seleccionó como un alimento complementario común en ovejas, pero también como un sustrato alto en fibra y, por lo tanto, altamente metanogénico, y debido a que no contiene ningún compuesto secundario de planta que pueda interferir con el ensayo.

15 Los experimentos de IVFT se configuraron y ejecutaron como se describió anteriormente, según Durmic et al. El sustrato de fermentación se adicionó a los viales de fermentación un día antes del experimento y se dejó en la cámara anaeróbica para deshacerse del oxígeno. En el día experimental, se recolectaron los contenidos de rumen y se filtraron, se mezclaron con amortiguador y se usaron para inocular viales. Los tratamientos se compararon directamente con sus respectivos controles de lote (solo sustrato de alimentación) para comprender el efecto del producto total (portador + bioactivo), pero también se consideró el efecto del portador en sí y para tener en cuenta cualquier influencia del portador en los parámetros medidos, y el efecto también se comparó con el efecto de la formulación sin bromoformo (solo portador).

25 Las formulaciones se examinaron, en una primera serie de experimentos a tres dosis diferentes, es decir, control de portador, sin bromoformo (A), dosis baja (D), dosis media (C) y dosis alta (B) de bromoformo (tabla 4). Las dosis de bromoformo se basaron en datos bibliográficos disponibles usando *A. taxiformis* para reducir las emisiones de metano de rumiantes.

30 Los tratamientos se incluyeron en la fermentación después de que el sustrato (paja de avena, molida a 1 mm y 0,5 g por vial) y el fluido de fermentación (50 ml por vial) se adicionaron a un vial de suero de 120 ml. Los tratamientos (100 µl para líquidos y 100 mg para gel) se pipetearon directamente en el vial, antes de sellarlo y engarzarlo. Los viales se incubaron en

una incubadora de agitación, en posición vertical, con agitación a 50 rpm, a 39 °C durante 24 h. Todas las mediciones y análisis estadísticos se llevaron a cabo como se describe en Durmic et al.

5 La adición de portadores (tratamientos de control “A”) tendió a promover la producción de gas (tabla 4). La mayoría de los tratamientos de control tuvieron poco o ningún impacto en la producción total de gas en comparación con el sustrato solamente. Solo cuatro tratamientos de control redujeron significativamente ($P < 0,05$) el gas, particularmente a las dosis más altas, con una reducción de hasta 10 % registrada con R8-5-B.

10 La adición de portadores solos (tratamientos de control A) no redujo CH₄, pero hubo muchos tratamientos con bromoformo que redujeron significativamente las concentraciones y producción de CH₄ en comparación con los tratamientos de control. Los efectos más potentes se observaron con dosis medias y altas (C y D), provocando una reducción de hasta 98 %. En algunos, estos fuertes efectos sobre el CH₄ también se acompañaron de algunas reducciones pequeñas pero significativas en la producción total de gas.

15 Tabla 4 - Resultados de IVFT

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH ₄
R8-2-A	Ninguna	0			
R8-2-D	Baja	0,015	0,03	0,003	4
R8-2-C	Med.	0,075	0,15	0,015	97
R8-2-B	Alta	0,15	0,3	0,03	98
R8-3-A	Ninguna	0			
R8-3-D	Baja	0,015	0,03	0,003	3
R8-3-C	Med.	0,075	0,15	0,015	95
R8-3-B	Alta	0,15	0,3	0,03	97
R8-4-A	Ninguna	0			
R8-4-D	Baja	0,015	0,03	0,003	7
R8-4-C	Med.	0,075	0,15	0,015	11
R8-4-B	Alta	0,15	0,3	0,03	14
R8-5-A	Ninguna	0			

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH ₄
R8-5-D	Baja	0,015	0,03	0,003	9
R8-5-C	Med.	0,075	0,15	0,015	95
R8-5-B	Alta	0,15	0,3	0,03	93
R8-7-A	Ninguna	0			
R8-7-D	Baja	0,015	0,03	0,003	8
R8-7-C	Med.	0,075	0,15	0,015	19
R8-7-B	Alta	0,15	0,3	0,03	97

Sin bromoformo (A), dosis baja (D), dosis media (C) y dosis alta (B) de bromoformo; DMI = materia seca incubada. Las formulaciones de tabla 4 se probaron 5 días después de la preparación.

- 5 Las formulaciones R8-3, R8-7, R8-2 y R8-5, a dosis medias a altas son capaces de reducir significativamente CH₄ (hasta 98 %), con solo una reducción pequeña a moderada en el gas en comparación con el control (hasta 10 %). El incremento de la dosis después de “media” no pareció proporcionar ninguna mejora significativa adicional en el efecto sobre la reducción de CH₄, excepto en R8-7 donde la dosis alta fue casi cinco veces más potente que la dosis media. Las tres formulaciones principales incluyeron un aceite (R8-5), un sólido (R8-7) y un líquido (R8-3).
- 10

- Se realizó una serie adicional de experimentos de IVFT, en un intervalo más amplio de dosis que varían desde sin bromoformo (A), hasta bromoformo muy bajo a 0,02 mg (B), y en un espectro; 0,04 mg (C), 0,06 mg (D), 0,08 mg (E), 0,1 mg (F), 0,12 mg (G), 0,14 mg (H), 0,2 mg (I), hasta bromoformo muy alto a 0,3 mg (J), (tabla 5).
- 15

Tabla 5 - Resultados de IVFT

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH₄
R8-9-A	Ninguna	0	0,00	0	
R8-9-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	26
R8-9-C		0,04	0,08	0,008	23
R8-9-D		0,06	0,12	0,012	98
R8-9-E		0,08	0,16	0,016	98
R8-9-F		0,1	0,20	0,02	98
R8-9-G		0,12	0,24	0,024	97
R8-9-H		0,14	0,28	0,028	98
R8-9-I		0,2	0,40	0,04	98
R8-9-J	muy alta	0,3	0,60	0,06	98
R8-10-A	0	0	0,00	0	
R8-10-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	11
R8-10-C		0,04	0,08	0,008	76
R8-10-D		0,06	0,12	0,012	95
R8-10-E		0,08	0,16	0,016	94
R8-10-F		0,1	0,20	0,02	98
R8-10-G		0,12	0,24	0,024	99
R8-10-H		0,14	0,28	0,028	98
R8-10-I		0,2	0,40	0,04	98
R8-10-J	muy alta	0,3	0,60	0,06	98
R8-11-A	0	0	0,00	0	
R8-11-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	14
R8-11-C		0,04	0,08	0,008	95
R8-11-D		0,06	0,12	0,012	96
R8-11-E		0,08	0,16	0,016	97
R8-11-F		0,1	0,20	0,02	96
R8-11-G		0,12	0,24	0,024	96
R8-11-H		0,14	0,28	0,028	96
R8-11-I		0,2	0,40	0,04	97
R8-11-J	muy alta	0,3	0,60	0,06	97

DMI = Materia seca incubada. Las formulaciones de tabla 5 se probaron 14 días después de la preparación.

Las formulaciones R8-9, R8-10 y R8-11 mostraron actividad antimetanogénica impresionante, con reducciones de 95-99 % en la producción de metano incluso a dosis relativamente bajas.

Se realizó una serie adicional de experimentos de IVFT, para probar la eficacia de cuatro formulaciones diferentes de bromoformo soluble en agua, R8-12, R8-13, R8-14 y R8-15, sin bromoformo (A), bromoformo de dosis baja (D), bromoformo de dosis media (C), bromoformo de dosis alta (B) y los efectos del bromoformo de dosis alta sobre el sustrato granulado (B*), (tabla 6).

Tradicionalmente, y en los experimentos anteriores, la paja de avena se usa como el sustrato en los ensayos de IVFT, sin embargo, uno de los objetivos del experimento en la tabla 6 fue valorar el efecto de las formulaciones de la invención en un sedimento de alimento comúnmente usado comercialmente y en ensayos de animales vivos como el sustrato. La dosis alta (B) de las cuatro formulaciones solubles en agua se probó en el cultivo por lotes de 24 horas con un sustrato de pellet (101 pellet, Macco Feeds, Williams WA). Las formulaciones se adicionaron al vial como se describió anteriormente de acuerdo con los experimentos de IVFT anteriores, con 0,5 g de comprimidos molidos usados en lugar de paja de avena.

Tabla 6 - Resultados de IVFT

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH ₄
R8-12-A	Ninguna	0	0	0	0
R8-12-B	Alta	0,15	0,3	0,03	98
R8-12-C	med.	0,075	0,15	0,015	98
R8-12-D	Baja	0,015	0,03	0,003	6
R8-12-B*	Alta	0,15	0,3	0,03	98
R8-13-A	Ninguna	0	0	0	0
R8-13-B	Alta	0,15	0,3	0,03	98

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH₄
R8-13-C	med.	0,075	0,15	0,015	15
R8-13-D	Baja	0,015	0,03	0,003	0
R8-13-B*	Alta	0,15	0,3	0,03	98
R8-14-A	Ninguna	0	0	0	0
R8-14-B	Alta	0,15	0,3	0,03	97
R8-14-C	med.	0,075	0,15	0,015	97
R8-14-D	Baja	0,015	0,03	0,003	5
R8-14-B*	Alta	0,15	0,3	0,03	98
R8-15-A	ninguna	0	0	0	0
R8-15-B	Alta	0,15	0,3	0,03	98
R8-15-C	med.	0,075	0,15	0,015	98
R8-15-D	Baja	0,015	0,03	0,003	1
R8-15-B*	Alta	0,15	0,3	0,03	98

* Sustrato de comprimido de alimentación. DMI = Materia seca incubada. Las formulaciones de tabla 6 se probaron 5 días después de la preparación.

5 Las dosis altas (B) y medias (C) de todas las formulaciones disminuyeron significativamente tanto la concentración como la producción de CH₄ por 97-98 % en comparación con el control de paja de avena ($P < 0,05$). La baja dosis de la formulación R8-12 (R8-12-D) redujo el metano en una cantidad pequeña pero significativa en comparación con el control de paja de avena.

10 Ninguna de las formulaciones probadas tuvo un impacto en la producción total de gas en comparación con los comprimidos solamente. Las altas dosis de las formulaciones R8-12-B*, R8-13-B*, R8-14-B* y R8-15-B* redujeron significativamente la concentración y producción de CH₄ por 98 % en comparación con los comprimidos solamente ($P < 0,05$), una reducción similar a cuando estas formulaciones se probaron con un sustrato de paja de avena.

15 Se realizó una serie adicional de experimentos de IVFT, en un intervalo más amplio de dosis que varían desde sin control de bromoformo (A), hasta bromoformo muy bajo a 0,02 mg

(B), y en un espectro; 0,04 mg (C), 0,06 mg (D), 0,08 mg (E), 0,1 mg (F), 0,12 mg (G), 0,14 mg (H), 0,2 mg (I), hasta bromoformo muy alto a 0,3 mg (J). Las pruebas se realizaron en la formulación R8-17, una formulación soluble en agua, la formulación R8-18, una formulación basada en agente tensioactivo sin un portador oleoso, y la formulación R8-19, una formulación que incluye tanto un agente tensioactivo como un portador oleoso (tabla 7).

Los ensayos fueron cultivos por lotes de 24 horas ejecutados y analizados como se detalla en Durmic et al. (2014). Los tratamientos (100 µl) se incluyeron en la fermentación después de que se adicionaron el sustrato (0,5 g de paja de avena por vial) y el fluido de fermentación (50 ml por vial). Los viales se sellaron y se incubaron en una incubadora de agitación, en posición vertical, con agitación a 50 rpm, a 39 °C durante 24 h. Después de la incubación, se midió la presión de gas total y la concentración de metano en el gas del espacio de cabeza, y las muestras del fluido de fermentación se analizaron para determinar los VFA y NH₃.

Tabla 7 - Resultados de IVFT

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH ₄
R-17-A	Ninguna	0	0,00	0	
R-17-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	97
R-17-C		0,04	0,08	0,008	98
R-17-D		0,06	0,12	0,012	98
R-17-E		0,08	0,16	0,016	98
R-17-F		0,1	0,20	0,02	98
R-17-G		0,12	0,24	0,024	98
R-17-H		0,14	0,28	0,028	98
R-17-I		0,2	0,40	0,04	98
R-17-J	muy alta	0,3	0,60	0,06	98
R-18-A	0	0	0,00	0	
R-18-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	4
R-18-C		0,04	0,08	0,008	-9
R-18-D		0,06	0,12	0,012	8
R-18-E		0,08	0,16	0,016	2

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH ₄
R-18-F		0,1	0,20	0,02	-3
R-18-G		0,12	0,24	0,024	0
R-18-H		0,14	0,28	0,028	-3
R-18-I		0,2	0,40	0,04	6
R-18-J	muy alta	0,3	0,60	0,06	20
R-19-A	0	0	0,00	0	
R-19-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	19
R-19-C		0,04	0,08	0,008	13
R-19-D		0,06	0,12	0,012	97
R-19-E		0,08	0,16	0,016	99
R-19-F		0,1	0,20	0,02	97
R-19-G		0,12	0,24	0,024	98
R-19-H		0,14	0,28	0,028	98
R-19-I		0,2	0,40	0,04	98
R-19-J	muy alta	0,3	0,60	0,06	98

DMI = Materia seca incubada. Las formulaciones de tabla 7 se probaron 5 días después de la preparación.

- 5 La adición de portadores R8-17-A y R8-19-A no tuvo efecto en la producción total de gas en comparación con los controles de paja de avena ($p < 0,05$). Adicionalmente, en todas las dosis probadas, las formulaciones R8-17 y R8-19 no alteraron la producción total de gas en comparación con sus respectivos controles de paja de avena o tratamientos solo con portador ($p < 0,05$). El tratamiento solo con portador R8-18-A no tuvo un efecto significativo en la producción total de gas en comparación con el control de paja de avena, y los
- 10 tratamientos de R8-18 R8-18-F, -G, -H, -I y -J no alteraron significativamente la producción total de gas en comparación con el control de paja de avena o el portador solo.

En comparación con el control de paja de avena, el tratamiento solo con portador R8-17-A incrementó la concentración de metano en 7 % y la producción de metano en 9 % ($p < 0,05$). El tratamiento solo con portador R8-18-A incrementó ($p < 0,05$) la producción de metano

en 8 %.

Las nueve dosis de la formulación R8-17 (B a J) redujeron ($p < 0,05$) la producción de metano y la concentración de metano en 97-98 % en comparación con el control de paja de avena, sin diferencias significativas en la reducción entre los nueve tratamientos.

5 Las nueve dosis de las formulaciones R8-19 (B a J) redujeron la producción de metano y la concentración de metano en comparación con el control de paja de avena ($p < 0,05$). Las dos dosis más bajas, B y C, dieron por resultado reducciones de 12-19 % en la concentración y producción de metano. Las 7 dosis adicionales (D a J) redujeron significativamente tanto la concentración como la producción de metano en al menos 97 % en comparación con el control
10 de paja de avena.

La formulación R8-18 demostró menos actividad antimetanogénica en comparación con las otras formulaciones, con el tratamiento R8-18-D provocando una reducción pequeña pero significativa en la concentración y producción de metano de 8 %. La dosis más alta R8-18-J provocó una reducción de 18 % y 20 % en la concentración y producción de metano,
15 respectivamente, en comparación con el control de paja de avena.

No hubo cambios significativos en las concentraciones totales de VFA con ningún tratamiento ($p < 0,05$). La concentración de NH_3 se redujo en las seis dosis bajas a medias de las formulaciones R8-17 ($p < 0,05$), cayendo tan bajo como 26 mg/ml en comparación con 57 mg/ml para el control de paja de avena, una reducción de 54 %. La formulación R8-19 también
20 redujo significativamente NH_3 , con el tratamiento R8-19-E reduciendo NH_3 en 70 % en comparación con el control de paja de avena. Ninguna de las formulaciones R8-18 afectó significativamente las concentraciones de NH_3 . Estos resultados indican que las formulaciones R8-17 y R8-19 son capaces de inhibir la producción de metano sin afectar adversamente la fermentación total.

25 Un resultado particularmente sorprendente es la disminución significativa en la concentración de NH_3 observada con las formulaciones R8-17 y R8-19. El NH_3 ruminal reducido mejora la utilización de nitrógeno, potencialmente por la inhibición de las bacterias productoras de hiperamoníaco (HAP) que desaminan los aminoácidos en amoníaco que entonces se pierde posteriormente a través de la pared de rumen.

30 Se realizó una serie adicional de experimentos de IVFT, en un intervalo más amplio de dosis que varían desde sin control de bromoformo (A), hasta bromoformo muy bajo a 0,02 mg

(B), y en un espectro; 0,04 mg (C), 0,06 mg (D), 0,08 mg (E), 0,1 mg (F), 0,12 mg (G), 0,14 mg (H), 0,2 mg (I), hasta bromoformo muy alto a 0,3 mg (J).

Las pruebas se realizaron en las formulaciones R8-11, R8-9i, R8-10i y R8-17i.

- 5 Se siguió el mismo procedimiento que para los experimentos de IVFT anteriores, usando paja de avena como sustrato, pero sustituyendo fluido de rumen de vaca por fluido de rumen de oveja con a fin de valorar el rendimiento de las formulaciones en la presencia de una cohorte microbiana diferente (tabla 8).

Tabla 8 – Resultados de IVFT (líquido ruminal de vaca)

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH₄
R-11-A	ninguna	0	0,00	0	
R-11-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	98
R-11-C		0,04	0,08	0,008	99
R-11-D		0,06	0,12	0,012	99
R-11-E		0,08	0,16	0,016	99
R-11-F		0,1	0,20	0,02	99
R-11-G		0,12	0,24	0,024	99
R-11-H		0,14	0,28	0,028	99
R-11-I		0,2	0,40	0,04	99
R-11-J	muy alta	0,3	0,60	0,06	99
R-9i-A	0	0	0,00	0	
R-9i-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	98
R-9i-C		0,04	0,08	0,008	99
R-9i-D		0,06	0,12	0,012	99
R-9i-E		0,08	0,16	0,016	99
R-9i-F		0,1	0,20	0,02	99
R-9i-G		0,12	0,24	0,024	99
R-9i-H		0,14	0,28	0,028	99
R-9i-I		0,2	0,40	0,04	92
R-9i-J	muy alta	0,3	0,60	0,06	99

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH₄
R-10i-A	0	0	0,00	0	
R-10i-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	99
R-10i-C		0,04	0,08	0,008	94
R-10i-D		0,06	0,12	0,012	99
R-10i-E		0,08	0,16	0,016	99
R-10i-F		0,1	0,20	0,02	99
R-10i-G		0,12	0,24	0,024	99
R-10i-H		0,14	0,28	0,028	99
R-10i-I	muy alta	0,2	0,40	0,04	99
R-10i-J		0,3	0,60	0,06	99
R-17i-A	0	0	0,00	0	
R-17i-B	muy baja	0,02	0,04	0,004	-8
R-17i-C		0,04	0,08	0,008	-22
R-17i-D		0,06	0,12	0,012	7
R-17i-E		0,08	0,16	0,016	31
R-17i-F		0,1	0,20	0,02	29
R-17i-G		0,12	0,24	0,024	99
R-17i-H		0,14	0,28	0,028	99
R-17i-I	muy alta	0,2	0,40	0,04	99
R-17i-J		0,3	0,60	0,06	98

DMI = Materia seca incubada. Las formulaciones de tabla 8 se probaron 38 días después de la preparación.

- 5 Los resultados demuestran un alto rendimiento antimetanogénico (98-99 %) para las formulaciones R8-11, R8-9i y R8-10i, incluso a dosis muy bajas, y un alto rendimiento (98-99 %) para la formulación R8-17i a dosis medias a altas (0,12-0,3 mg de bromoformo). Las formulaciones de la presente invención parecen funcionar igual de bien, si no incluso mejor, en la presencia del microbioma del rumen de vaca como lo hacen en la presencia del microbioma de rumen de oveja.

Para investigar el rendimiento de las formulaciones de la invención a largo plazo, se llevaron a cabo experimentos usando un experimento de técnica de estimulación de rumen en circuito abierto (Rusitec) para encontrar la dosis efectiva más baja que muestra un efecto persistente sobre CH₄ en un sistema de fermentación abierto, y para descartar cualquier
5 impacto potencial sobre la actividad microbiana de rumen a largo plazo.

El sistema Rusitec implica llevar a cabo la fermentación a gran escala en fermentadores rellenos con fluido y sustrato ruminal. La técnica de simulación Rusitec es un método *in vitro* bien establecido para simular e investigar los procesos microbianos de rumen, evitando la variabilidad de los animales en un entorno estandarizado. La técnica de simulación
10 Rusitec proporciona una investigación más exhaustiva de las características de fermentación que los experimentos de cultivo por lotes debido a que es una fermentación abierta equilibrada con entradas de nutrientes y soluciones amortiguadoras y salidas de gases, VFA y otros productos finales de fermentación; es una fermentación continua durante 21 días que permite el examen del efecto del tratamiento con el paso del tiempo y el ajuste de las comunidades
15 microbianas. Una ventaja principal de la técnica de simulación Rusitec es proporcionar datos cuantitativos sobre la degradabilidad y fermentación para predecir observaciones *in vivo*. Es un “sistema abierto”, que significa que cada día se adiciona sustrato fresco y se remueven los residuos no digeridos; hay un flujo continuo de “saliva” (amortiguador); y los productos finales se remueven regular/continuamente del fermentador y se miden. Este sistema está más cerca
20 de replicar procesos *in vivo* y permite probar los efectos a lo largo del período de tiempo, incluida la persistencia del efecto deseado y/o cualquier efecto negativo de los tratamientos en la fermentación que pueda acumularse con el paso del tiempo.

Los experimentos de Rusitec se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos publicados anteriormente adaptados para probar aditivos alimenticios bioactivos en Garcia et
25 al. 2019, (Garcia, F, Vercoe, PE, Martínez, MJ, Durmic, Z, Brunetti, MA, Moreno, MV, Colombatto, D, Lucini, E, Ferrer, JM (2019) “Essential oils from *Lippia turbinata* and *Tagetes minuta* persistently reduce *in vitro* ruminal methane production in a continuous-culture system.” *Animal Production Science* 59, 709-720), el contenido de cuyo documento se incorpora por la presente en su totalidad. El experimento se diseñó para funcionar durante 21 días, con los
30 primeros 7 días para adaptación del sistema usando paja de avena molida a 4 mm como sustrato (período de pretratamiento; D0 – D7), entonces introduciendo tratamientos y funcionando durante otros 14 días (período de tratamiento, D8-D22). Se ejecutaron tres tratamientos por triplicado (tres fermentadores cada uno), y cada bolsa de sustrato se fermentó durante 48 h antes de reemplazarse con una bolsa de alimento fresco. Los

tratamientos (1 ml) se adicionaron directamente a la parte superior de la bolsa de alimento fresco, cuando se colocaron en el recipiente de alimento.

A lo largo del experimento, el pH, gas total y concentraciones de CH₄ se midieron diariamente en la fase gaseosa, en tanto que las concentraciones de VFA y NH₃ de la fase líquida se analizaron antes de la introducción de los tratamientos (D7), en el medio (D14) y al final (d20) del período de tratamiento. Los datos se analizaron usando ANOVA unidireccional con tratamientos como factores y concentración verdadera de CH₄, producción total de gas, volumen total de CH₄, ml de CH₄ por gramo de materia seca incubada y concentraciones de pH, VFA y NH₃ como variables. Se adicionó una covariable al modelo como predictor adicional. Las variables covariables fueron las mismas que las variables de tratamiento, pero para el sustrato de paja de avena solo durante la fase de pretratamiento (D5 a D7). Se usó una comparación por pares Tukey-Kramer HSD cuando las medias difirieron (P < 0,05).

La simulación de Rusitec se realizó para las formulaciones R8-11 y R8-10, y los resultados se presentan en la tabla 9.

15 Tabla 9 - Resultados de Rusitec

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH ₄
Después de 7 días de tratamiento (D14)					
Control	Ninguna	0			0
R8-11-B	muy baja	0,6	0,04	0,004	100
R8-11-C	Baja	1,2	0,08	0,008	100
R8-11-D	Media	1,8	0,12	0,012	100
R8-10-C1	baja - diaria	0,9	0,06	0,006	100
R8-10-C1	baja - 48 h	0,9	0,06	0,006	75
Después de 14 días de tratamiento (D21)					
Control	Ninguna	0			0
R8-11-B	muy baja	0,6	0,04	0,004	100
R8-11-C	Baja	1,2	0,08	0,008	100
R8-11-D	media	1,8	0,12	0,012	100
R8-10-C1	baja - diaria	0,9	0,06	0,006	100

Formulación / tratamiento	Dosis	Dosis de bromoformo (mg) por vial	Conc. final (g/kg DMI)	% Bioactivo/DMI	% de reducción de CH₄
R8-10-C1	baja - 48 h	0,9	0,06	0,006	78

DMI = Materia seca incubada. Las formulaciones de tabla 9 se probaron 60 días después de la preparación.

En el período de pretratamiento, no hubo diferencia significativa en la concentración diaria total de gas o CH₄ entre los grupos de fermentadores asignados a los grupos de tratamiento. La producción media de gas en este período fue 648 ml/24 h, concentraciones de CH₄ 4,0 ml/100 ml de gas y producción de CH₄ 0,8 ml/g DMI). Estos niveles se mantuvieron en el control durante todo el experimento.

La adición de todos los tratamientos de formulación R8 no afectó la producción total de gas, pero todos redujeron significativamente ($P < 0,05$) las concentraciones y producción de CH₄ en comparación con el control. La reducción en CH₄ fue inmediata y después del primer día de la adición donde CH₄ disminuyó en un promedio de 33 % en los tres tratamientos R8. El efecto entonces fue acumulativo durante los primeros cinco días de dosificación (D8 a D12), disminuyendo a 0 ml/100 ml de gas (reducción de 100 %) en todos los tratamientos con R8-11 en D12. Estos niveles de inhibición persistieron durante el resto del experimento, dando por resultado en una reducción total de las concentraciones de CH₄ de 73 % -76 % en la primera semana y 100 % en la segunda semana.

La formulación sólida de liberación lenta R8-10 introducida en ambos fermentadores redujo CH₄ inmediatamente y en 3-4 días, ya no se detectó CH₄ en el fermentador con suministro diario del tratamiento. En el otro fermentador donde el tratamiento comenzó cinco días después y solo se adicionó cada dos días, hubo una reducción de 75 % de la producción de CH₄. La inhibición de CH₄ persistió hasta la conclusión en D22. No hubo reducción aparente en la producción total de gas en estos.

Los valores de pH fueron similares entre los tratamientos y se mantuvieron dentro de los valores fisiológicos (6,5-7,0) en todo momento durante todo el experimento. Los perfiles de VFA solo se tomaron en dos puntos de tiempo en lugar de diariamente debido al alto costo

de procesamiento y proporcionan una imagen de las tendencias totales en las concentraciones de VFA. Todos los tratamientos produjeron concentraciones de VFA significativamente más bajas en la semana uno y dos. Curiosamente, el control mostró un incremento de 33 % de las concentraciones de VFA con el paso del tiempo, en tanto que los niveles de VFA de los tratamientos se mantuvieron estables con el paso del tiempo, aunque a niveles reducidos en comparación con el control. Las reducciones de VFA en los tratamientos en comparación con el control variaron de 26 % en la primera semana en R8-11C, a 45 % en el mismo tratamiento en la segunda semana en comparación con el control que también tuvo un incremento de VFA de 33 % en la semana dos. Después de una semana de tratamiento, las reducciones de VFA fueron principalmente en ácido acético y propiónico, en tanto que los VFA de cadena ramificada (BCFA) se redujeron en su mayoría en la segunda semana. Esto provocó un incremento significativo en las relaciones de acetato:propionato (A:P) en todos los tratamientos con R8-11 y en ambas semanas. La formulación R8-10, por otra parte, presentó tendencias diferentes, es decir, el VFA o A:P no se afectaron con su adición. El propionato y VFA totales se promovieron en algunos casos en este tratamiento.

La presente invención proporciona inhibidores potentes de metanogénesis. Además, como los halocarburos son muy volátiles, es necesario estabilizarlos y suministrarlos en una formulación de portador que evitará la vaporización y por lo tanto, la pérdida de actividad. La presente invención ha logrado la estabilización, ya que el efecto sobre CH_4 es evidente y sostenido con el paso del tiempo con las formulaciones descritas en la presente. En todas las formulaciones presentadas, se proporciona un efecto antimetanogénico muy potente (es decir, una reducción de más de 80-90 % en las concentraciones de CH_4), que alcanza incluso la abolición total de CH_4 (100 %) con el paso del tiempo en la simulación Rusitec. Este descubrimiento tiene varias implicaciones. En primer lugar, que es posible usar un compuesto sintético puro en lugar de algas enteras o su extracto crudo para controlar CH_4 entérico. En segundo lugar, aborda los problemas con el costo y sostenibilidad del suministro, así como la variabilidad que puede presentarse debido a los variados niveles de bromoformo en diferentes algas marinas, junto con la perspectiva de evitar el impacto ambiental de la agricultura y cosecha de algas marinas. Finalmente, permite un mejor control sobre la dosis de compuesto de halocarburo que se va a administrar al rumiante.

ASPECTOS GENERALES

Cada documento, referencia, solicitud de patente o patente citada en este texto se incorpora expresamente en la presente en su totalidad por referencia, que significa que se

debe leer y considerar por el lector como parte de este texto. Que el documento, referencia, solicitud de patente o patente citada en este texto no se repita en este texto es meramente por razones de concisión.

5 Se debe apreciar que a lo largo de esta especificación, cualquier referencia a cualquier publicación anterior, incluidas las publicaciones de patentes anteriores y las publicaciones no de patentes, no es un reconocimiento o admisión de que cualquiera de los materiales contenidos dentro de la publicación anterior a la que se hace referencia era parte del conocimiento general común en la fecha de prioridad de la solicitud.

10 Cualquier instrucción del fabricante, descripciones, especificaciones de productos y hojas de productos para cualquier producto mencionado en la presente o en cualquier documento incorporado por referencia en la presente, se incorporan en la presente por referencia y se pueden emplear en la práctica de la invención.

15 La invención descrita en la presente puede incluir uno o más intervalos de valores (por ejemplo, tamaño, desplazamiento e intensidad de campo, etc.). Se entenderá que un intervalo de valores incluye todos los valores dentro del intervalo, incluidos los valores que definen el intervalo y los valores adyacentes al intervalo que conducen al mismo o sustancialmente al mismo resultado que los valores inmediatamente adyacentes a ese valor que define el límite del intervalo.

20 La presente invención no se va a limitar en alcance por ninguna de las modalidades específicas descritas en la presente. Estas modalidades se proponen con el propósito de ejemplificación solamente. Productos, formulaciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la invención, como se describe en la presente.

25 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en la presente es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes de aquellas descritas específicamente. La invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todos los pasos, características, formulaciones y compuestos referidos o indicados en la especificación, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones o dos o más de los pasos o características.