

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 667**

51 Int. Cl.:

A61K 36/53 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2007** **E 07801575 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012** **EP 2049132**

54 Título: **Nuevos agentes para el tratamiento de trastornos conectados con neurotransmisión deteriorada**

30 Prioridad:

09.08.2006 EP 06016659

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2013

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**FOWLER, ANN;
GORALCZYK, REGINA;
KILPERT, CLAUS y
SCHUELER, GOEDE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 399 667 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos agentes para el tratamiento de trastornos conectados con neurotransmisión deteriorada

La presente invención se refiere al uso de extractos de orégano y/o componentes volátiles de extracto de orégano como agentes para uso en un método de tratamiento de trastornos conectados con neurotransmisión deteriorada, es decir reducida, como se detalla en esta memoria.

Se ha encontrado, de acuerdo con esta invención, que tales extractos son inhibidores de la reabsorción de serotonina, inhibidores de la reabsorción de noradrenalina, e inhibidores de la reabsorción de dopamina. Así pues, los mismos pueden mimetizar la acción de productos farmacéuticos que son inhibidores de absorción duales e inhibidores de absorción triples. Por tanto, estos extractos y sus materias volátiles son particularmente eficaces en el tratamiento de trastornos del humor, con inclusión de depresión y ansiedad, y pueden utilizarse para regular los biorritmos en los humanos. Los mismos tienen también numerosos usos veterinarios, y pueden utilizarse para prevenir o tratar las consecuencias conductuales o fisiológicas del estrés.

WO 95/05838 da a conocer el uso de un aceite vegetal volátil derivable de clavo, nuez moscada, pimienta, tomillo, pimentón, orégano, mejorana, albahaca y estragón francés o un constituyente de los mismos (v.g. linalol, tujona, canfeno, carvacrol, y timol del aceite de tomillo) para combatir cambios deletéreos en el sistema nervioso periférico (tales como morfología, estructura y cantidad de tejido). No existe doctrina alguna acerca del uso de que el uso de estas sustancias afecte a los procesos bioquímicos en el cerebro.

WO 01/45780 da a conocer el uso de fototerapia, opcionalmente en combinación con aromaterapia, en donde el orégano es uno de los ingredientes posibles, para tratar trastornos del sueño combinados con nerviosismo. Así pues, la composición se administra por medios olfativos.

Campo de la presente invención

Esta invención se refiere al uso de extractos de orégano y/o sus componentes volátiles para la fabricación de composiciones para el tratamiento y la prevención de trastornos conectados con neurotransmisión liberada o reducida. Así pues, en un aspecto la presente invención se refiere a composiciones dietéticas o farmacéuticas o veterinarias, que comprenden al menos un extracto de orégano o uno de sus componentes volátiles para uso en un proceso para el mantenimiento o la mejora de la atención y la concentración, la memoria y la capacidad para recordar, capacidad de aprendizaje, procesamiento del lenguaje, resolución de problemas y funcionamiento intelectual,

mejora de la memoria a corto plazo,
aumento del estado de alerta mental,
aumento de la capacidad de concentración y la agudeza mental,
intensificación de la vigilancia mental,
reducción de la fatiga mental,
refuerzo de la salud mental,
mantenimiento de una función cognitiva equilibrada,
regulación del hambre y la saciedad y la regulación de la actividad motora,
uso como antidepresivo, mejorador del humor/vitalidad, aliviador del estrés, reductor de la ansiedad, reductor de la tensión, reductor de la tristeza, reductor de la infelicidad/descontento, reductor de la irritabilidad, reductor de la disforia, reductor del comportamiento obsesivo-compulsivo, y/o relajante, o
utilización como preventivo o normalizador de las alteraciones de los ritmos circadianos,
con la salvedad de que la composición no incluye la combinación de orégano y extractos de *Crataegus*.

Sorprendentemente, se ha descubierto que los extractos de orégano y sus componentes volátiles de esta invención, actúan como inhibidores de la reabsorción de serotonina, prolongando así el tiempo en que está disponible la serotonina para la neurotransmisión. Esto conduce a un equilibrio del humor y efecto de alivio del estrés. Adicionalmente, los extractos de orégano y sus componentes volátiles de esta invención son eficaces también como inhibidores de la reabsorción de noradrenalina, inhibidores de la reabsorción de dopamina, y/o inhibidores de la reabsorción dual de serotonina, noradrenalina y/o dopamina, o inhibidores triples de la reabsorción de noradrenalina, serotonina y dopamina. Así pues, los mismos son particularmente útiles para tratamiento de la depresión, la ansiedad, o una combinación de las mismas, mediado por la neurotransmisión de serotonina o noradrenalina o una combinación de las mismas.

Los neurotransmisores principales son serotonina, dopamina, noradrenalina, acetilcolina, glutamato, y ácido gamma-aminobutírico. Los neurotransmisores de relevancia particular para los trastornos relacionados con el humor son serotonina, noradrenalina y dopamina. El aumento en la neurotransmisión se consigue por aumento de la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, haciéndola así disponible para neurotransmisión incrementada o prolongada por inhibición de la reabsorción en el extremo del nervio pre-sináptico, o por prevención del catabolismo de los neurotransmisores por inhibición de enzimas degradantes tales como las monoaminoxidasas A y B.

DEFINICIONES

Los términos "neurotransmisión deteriorada" y "neurotransmisión reducida" se utilizan intercambiabilmente a lo largo de la presente solicitud. Los mismos se utilizan en la presente solicitud de acuerdo con su significado bien conocido por las personas expertas en la técnica, y se refieren a un estado de disregulación de la neurotransmisión, que puede ocurrir al nivel de biosíntesis, procesamiento, almacenamiento, liberación, reabsorción y fijación de los receptores de neurotransmisores. La neurotransmisión deteriorada, en particular una reducción de la neurotransmisión, puede manifestarse en sí misma en animales con inclusión de humanos como perturbación del comportamiento, las emociones, el humor y los procesos del pensamiento, por ejemplo, en uno de diversos tipos de depresión.

- 10 La expresión "extracto de orégano y/o sus componentes volátiles" tiene por objeto comprender no sólo mixturas completas de compuestos extraíbles sino también únicamente compuestos volátiles de la planta considerados aisladamente o en cualquier combinación entre ellos. Los componentes volátiles más importantes de los extractos de orégano de acuerdo con la presente invención son: carvacrol, timol, timoquinona y timoquinol. Ejemplos de componentes volátiles adicionales de extractos de orégano son:
- 15 4-terc-butilfenol; 2,3-diisopropil-5-metilfenol; 2,4-diisopropil-3-metilfenol; 2,4-diisopropil-5-metilfenol; 2,5-diisopropil-3-metilfenol; 2,5-diisopropil-4-metilfenol; 2,6-diisopropil-3-metilfenol y p-ment-3-en-1-ol.

La expresión "extractos de orégano" de la presente invención no abarca téis o extractos acuosos calientes producidos a partir de hojas frescas o secadas o cualesquiera otras partes de especies de *Orégano*, así como téis que contienen únicamente cantidades traza de los componentes volátiles.

- 20 Los extractos obtenidos por destilación con vapor, están, sin embargo, dentro del alcance de la presente invención. Tales extractos contienen generalmente compuestos volátiles que no se degradan fácilmente. Los aceites destilados contienen escasamente timoquinona y otras materias volátiles, dado que las mismas se degradan más rápidamente durante la destilación con vapor. Sin embargo, aquéllos pueden contener cantidades elevadas de carvacrol. Los extractos con SFCO₂ son especialmente preferidos por su estabilidad (hasta 5 años en recipientes cerrados).
- 25 El término "animales" incluye humanos, y abarca mamíferos, peces y aves. Se prefieren: humanos, mascotas o animales de compañía, animales de granja, y animales utilizados en la industria de la piel.

La expresión "animales de granja" incluye: peces, tales como salmón y trucha, animales de piscifactoría tales como camarones, cerdos, caballos, rumiantes (ganado vacuno, ovejas, cabras) y aves de corral (tales como gansos, pollos, pollitos de asar, gallinas ponedoras, codornices, patos, y pavos). Se prefieren aves de corral, ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos.

- 30 "Mascotas" o "animales de compañía" incluyen perros, gatos, pájaros, peces de acuario, cobayos, conejos (jack), liebres y hurones. Se prefieren perros y gatos.

Los "animales utilizados en la industria de la piel" incluyen visones, zorros, y liebres.

- 35 La expresión "composiciones dietéticas" incluye cualquier tipo de producto nutricional, tal como alimentos/piensos y bebidas (reforzados), e incluye también productos clínicos de nutrición, así como suplementos dietéticos.

"Refuerzo" significa que al menos un extracto de orégano o uno o más componentes volátiles del mismo se añadió/añadieron durante la fabricación del alimento/pienso o bebida.

- 40 En los humanos, los trastornos conectados con la neurotransmisión deteriorada o reducida, incluyen: depresión, ansiedad, irritabilidad, infelicidad/descontento, tristeza, disforia, comportamiento obsesivo-compulsivo, insomnio, y anormalidades de los biorritmos (ritmos circadianos alterados).

Las composiciones que se utilizan en esta invención pueden caracterizarse por tanto como agentes de equilibración del humor, mejoradores del humor/vitalidad, aliviadores del estrés, reductores de la ansiedad, reductores de la tensión, relajantes, mejoradores del sueño, y normalizadores de los biorritmos.

- 45 Numerosas composiciones farmacéuticas que son reguladores de los neurotransmisores han demostrado ser útiles en diversos trastornos relacionados con el humor. Dado que se ha encontrado que los extractos de esta invención actúan utilizando mecanismos bioquímicos iguales o similares, puede llegarse a la conclusión de que aquéllos son útiles para afecciones similares como inhibidores de la absorción.

- 50 Los compuestos que aumentan los niveles de neurotransmisores en el cerebro y mejoran así su transmisión, pueden exhibir por tanto propiedades antidepresivas así como efectos beneficiosos en una diversidad de otros trastornos mentales (*Neurotransmitters. Drugs and Brain function*, R.A. Webster (ed), John Wiley & Sons, Nueva York, 2001, p. 187-211, 289-452, 477-498).

Los medicamentos para el tratamiento de los trastornos conectados con neurotransmisión deteriorada abarcan antidepresivos, mejoradores del humor, aliviadores de la tensión, mejoradores del estado, reductores de la

ansiedad, y reductores del comportamiento obsesivo-compulsivo. Todos ellos mejoran, aumentan y refuerzan la neurotransmisión fisiológica, especialmente en el sistema nervioso central, y por consiguiente alivian la disfunción mental.

- 5 Compuestos antidepresivos tricíclicos (TCAs) tales como imipramina, amitriptilina, y clomipramina, inhiben la reabsorción de serotonina, noradrenalina y/o dopamina. Los mismos están considerados generalmente entre los antidepresivos más eficaces disponibles, pero presentan cierto número de desventajas debido a que interactúan adicionalmente con varios receptores cerebrales, v.g., con los receptores colinérgicos. Y lo que es más importante, los TCAs son peligrosos dado que, si se consumen en dosis excesivas, presentan frecuentemente cardiotoxicidad aguda.
- 10 Otra clase de fármacos antidepresivos son los denominados SSRIs (inhibidores selectivos de la reabsorción de serotonina), que incluyen fluoxetina, paroxetina, sertralina, citalopram, y fluvoxamina, que bloquean el transportador de serotonina (SERT), un transportador de neurotransmisores de alta afinidad dependiente de cloruro de sodio que termina la neurotransmisión serotoninérgica por reabsorción de la serotonina. Dichos fármacos han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la depresión y la ansiedad, y usualmente son mejor tolerados que los TCAs. Estas medicaciones se inician típicamente a dosis bajas y pueden aumentarse hasta que alcanzan un nivel terapéutico. Un efecto secundario común es la náusea. Otros posibles efectos secundarios incluyen disminución del apetito, boca seca, sudoración, infección, estreñimiento, bostezo, temblor, somnolencia y disfunción sexual.

- 20 Asimismo, las revisiones sistemáticas y las pruebas clínicas aleatorizadas controladas por placebo (RCTs) indican que algunos SSRIs (escitalopram, paroxetina y sertralina), el SNRI venlafaxina, algunas benzodiazepinas (alprazolam y diazepam), el antidepresivo tricíclico imipramina, y el agonista parcial de 5-HT_{1A} buspirona son todos ellos eficaces en tratamiento agudo. En general, el efecto del tratamiento es a menudo moderado y los síntomas reaparecen cuando se interrumpe el período de tratamiento. Por esta razón, un tratamiento o prevención continuo(a) a largo plazo con compuestos que tengan efectos secundarios menores que los SSRIs y pueda seguirse durante largos periodos de tiempo podría ser favorable con respecto al tratamiento con fármacos. Esto se puede conseguir por administración a las personas que lo precisan de extractos de orégano o sus componentes volátiles en la forma de suplementos dietéticos.

- 30 Por esta razón, existe todavía necesidad de compuestos para el método de mejora de los trastornos conectados con neurotransmisión deteriorada que no exhiban los efectos secundarios negativos de los antidepresivos conocidos. Muchos pacientes están interesados en terapias alternativas con menos o ningún efecto secundario asociados con la toma de fármacos conocidos. La depresión grave es una enfermedad de larga duración y recurrente, que por lo general está mal diagnosticada. Adicionalmente, muchos pacientes sufren de depresión ligera o moderadamente grave. Por ello, existe un interés creciente en el desarrollo de compuestos, así como de composiciones farmacéuticas y/o dietéticas, que puedan utilizarse para tratar o prevenir el desarrollo de enfermedades/trastornos mentales tales como depresión, en personas de riesgo, y para estabilización del humor.
- 35 Adicionalmente, compuestos que previenen el catabolismo de los neurotransmisores más ampliamente por inhibición de las monoaminoxidasas (MAOs) A y B, denominados inhibidores de MAO (MAOIs), exhiben efectos antidepresivos. Las MAOs catalizan la oxidación de los neurotransmisores que contienen grupos amina tales como serotonina, noradrenalina, y dopamina.

- 40 Adicionalmente, los moduladores de la neurotransmisión ejercen efectos pleiotrópicos sobre las funciones mentales y cognitivas. Además de la depresión, ejemplos de otras afecciones humanas se enumeran a continuación.

Trastorno de Ansiedad Generalizada (GAD) y Otros Trastornos de Ansiedad

- 45 Es bien sabido que la neurotransmisión deteriorada, v.g. los niveles bajos de neurotransmisores, está conectada con diversas enfermedades y afecciones mentales tales como los trastornos de depresión y ansiedad generalizada (GAD). Los pacientes sufren a menudo, sea como comorbilidad a la depresión o aisladamente, del síndrome de ansiedad generalizada o trastorno de ansiedad generalizada. La GAD es una afección de ansiedad altamente prevalente y enfermedad crónica en atención primaria (~ 10% de los pacientes) (Wittchen et al, 2005 *Eur. Neuropsychopharm.* 15:357-376). Los pacientes se presentan a su médico de atención primaria con síntomas físicos múltiples. La GAD se caracteriza por tensión crónica, y preocupación y tensión ansiosa (> 6 meses), que son incapacitantes e incontrolables, y van acompañadas por un síndrome de hipervigilancia característico (con inclusión de inquietud, tensión muscular, y problemas del sueño). Si no se trata, la GAD sigue un uso crónico fluctuante y tiende a hacerse más grave con la edad. Los pacientes de GAD sufren de depresión sub-síndrome. Los pacientes de GAD se clasifican como usuarios frecuentes con la carga económica global máxima directa e indirecta sanitaria de todos los trastornos de ansiedad y depresivos. A pesar de la alta incidencia de la GAD, pocos enfermos son diagnosticados, tratados con medicación, o remitidos al psiquiatra; se precisan instrumentos diagnósticos simples para ayudar al reconocimiento y la monitorización de los pacientes. Con indiferencia del diagnóstico específico, los médicos requieren tratamientos eficaces de los síntomas de la GAD. Los SSRIs tales como paroxetina son eficaces para el tratamiento de la GAD [Stocchi et al., 2003 *J Clin Psychiatry* 63 (3): 250.]

Varios SSRIs han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de los trastornos de ansiedad:

5	fluoxetina	-	OCD, PD
	sertralina	-	OCD, PD, PTSD, SAD
	paroxetina	-	OCD, PD, SAD, GAD, PTSD
	escitalopram	-	GAD
	fluvoxamina	-	OCD

[OCD: trastorno obsesivo-compulsivo, PD: trastorno de pánico, PTSD: trastorno de estrés post-traumático, SAD: trastorno de ansiedad social, GAD: trastorno de ansiedad generalizado]

Agresión

- 10 La agresividad impulsiva patológica puede asociarse con la inervación serotoninérgica inferior en la corteza cingulada anterior, como se demuestra utilizando PET, donde se ha demostrado que la fijación de [¹¹C]McN 5652 estaba significativamente reducida en esta región cerebral [Frankle et al. 2005 *Am. J. Psych.*, 162:915-923]. A este respecto, debe indicarse también que la disfunción de serotonina se ha correlacionado con comportamientos criminales impulsivos y violentos, abuso de alcohol e intentos suicidas, habiéndose comunicado también en niños internados por comportamiento agresivo.

Se ha demostrado que el empobrecimiento dietético de triptófano da como resultado un aumento en las respuestas agresivas, en una situación de laboratorio, en tanto que el aumento de triptófano daba como resultado una disminución en las respuestas agresivas. Así pues, presumiblemente, la disminución de serotonina está ligada a un aumento en la agresión [Marsh et al. 2002, *Neuropsychopharm* 26:660-671].

20 Trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD)

- Cierto número de antidepresivos que afectan a la reabsorción de una o más de las monoaminas son también eficaces en el tratamiento de la ADHD y constituyen una buena alternativa a las medicaciones estimulantes utilizadas comúnmente: (1) antidepresivos tricíclicos (TCAs), tales como imipramina, desipramina y amitriptilina, cuyo mecanismo de acción incluye el bloqueo de la reabsorción de noradrenalina y serotonina y la regulación decreciente de los receptores β-adrenérgicos; (2) inhibidores duales de la reabsorción, tales como bupropión (inhibidor de la reabsorción de dopamina/noradrenalina) y venlafaxina (SNRI); (3) inhibidores de la reabsorción simples, tales como atomoxetina y tomoxetina (bloqueo de los transportadores de noradrenalina de la corteza presináptica prefrontal) [Greydanus 2005. *Ind. J. Ped.*, 72:953-960; Chouinard 2005 *J. Psych. & Neuro.*, 31 (3): 168-176].

30 Perturbaciones de los Ritmos Circadianos

- Los trastornos del humor y el estrés ocupacional pueden conducir a perturbaciones en los ritmos circadianos (los denominados biorritmos). Estas afecciones son a menudo crónicas y persistentes. Asimismo, la disregulación de los ritmos circadianos inducida por vuelos a larga distancia (jet-lag), así como por el trabajo a turnos, pueden causar síntomas similares y angustia. Por tanto, el uso de suplementos dietéticos para mantener el ritmo circadiano normal (al que está habituado un animal o humano), y/o para aliviar y prevenir los síntomas asociados con un ritmo circadiano perturbado, tales como el deterioro de la función cognitiva y la memoria, y la fatiga mental y física, está justificado para mejorar la calidad global de vida y aumentar la energía vital de una persona que se encuentre en necesidad de ello.

Trastorno del Sueño, Insomnio, y Síndrome de Fatiga Crónica

- 40 El sueño y la depresión están estrechamente ligados. Las anomalías del sueño EEG son habituales en la depresión, y el insomnio puede conducir a depresión. Las alteraciones del sueño afectan a otros ritmos biológicos implicados en la depresión (Vogel et al. 1990 *Neurosci Biobehav Rev* 14:49-63; Mc Carley 1982. *Am J Psych* 139:565-570). Los antidepresivos pueden mejorar la continuidad del sueño, reducir el sueño con movimiento rápido de los ojos (REM) y prolongar el sueño de onda lenta (SWS) (Sraner et al 2006 en *Clinical Pharmacology of Sleep*. S.R. Pandi-Perumal et al (editores). Birkhäuser, Basilea, pp. 103-124.

Los TCAs se utilizan comúnmente para el tratamiento del síndrome de fatiga crónica. Se cree que los TCAs promueven la etapa 4, de sueño sin movimiento rápido de los ojos, [Craig et al 2002. *Am. Fam. Physician*, 65:1083-1090].

Trastorno Obsesivo-Compulsivo (OCD)

- 50 La neurotransmisión mejorada en los receptores 5-HT₂ puede estar implicada en la acción terapéutica de los SSRIs en el OCD; la hiperactividad en el bucle neuronal entre la corteza orbitofrontal, la cabeza del núcleo caudado y el tálamo puede ser atenuada por los SSRIs, debido a activación incrementada de los receptores inhibidores 5-HT₂ en la corteza orbitofrontal [Blair et al 2001 *J. Psych & Neuro.* 26(1): 37-43]. Los SSRIs, tales como zimeldina,

fluoroxetina y sertralina, han demostrado ser eficaces en el tratamiento del OCD [Chouinard, 2005 *J. Psych. & Neuro.* 31(3): 168-176].

Dolor

Los antidepresivos con mecanismos de acción diferentes pueden ser eficaces también en el tratamiento del dolor. Por ejemplo, amitriptilina y mianserina, que son antagonistas 5-HT₂ potentes, se utilizan para el control del dolor crónico [Blier et al 2001. *J. . Psych. & Neuro.* 26(1): 37-43]. El inhibidor de la reabsorción de noradrenalina/serotonina/dopamina, duloxetina, es eficaz en el tratamiento del dolor neuropático asociado con la neuropatía periférica diabética [Chouinard, 2005 *J. Psych. & Neuro.* 31(3): 168-176]. Este tipo de dolor es diferente del asociado con la inflamación. De acuerdo con esta invención, el dolor se reduce utilizando un mecanismo diferente de la disminución de la inflamación.

Como antidepresivo, los extractos de orégano y sus componentes volátiles, así como composiciones/medicamentos que los contienen, pueden utilizarse en métodos de mejora mental, del comportamiento, y de los trastornos emocionales/afectivos, neuróticos, neurodegenerativos, relacionados con la comida y el estrés tales como v.g. depresión unipolar, depresión bipolar, depresión aguda, depresión crónica, depresión subcrónica, distimia, depresión postparto, disforia/síndrome premenstrual (PMS) síntomas depresivos climatéricos, agresión, trastornos de déficit de atención (ADS), trastornos de ansiedad social, trastornos afectivos estacionales, trastornos de ansiedad/ansiedad generalizada (GAD), síndrome de fibromialgia, fatiga crónica, trastornos del sueño (insomnio), trastornos de estrés post-traumático, trastornos de pánico, trastornos obsesivo-compulsivos, síndrome de piernas inquietas, nerviosismo, migraña/dolores de cabeza primarios y dolor en general, emesis, bulimia, anorexia nerviosa, trastorno de excesos en la comida, trastornos gastrointestinales, síndrome de agotamiento, irritabilidad y cansancio.

Como antidepresivo, los extractos de orégano y sus componentes volátiles, así como las composiciones/medicamentos que los contienen, pueden utilizarse también para la fabricación de composiciones para prevención primaria y secundaria y/o el tratamiento del deterioro neurocognitivo. Adicionalmente, aquéllos son eficaces también en el tratamiento de síntomas depresivos u otros síntomas relacionados con neurotransmisión perturbada que aparecen como comorbilidad en enfermedades crónicas, v.g. enfermedades cardiovasculares, ataques, cáncer, Enfermedad de Alzheimer y Enfermedad de Parkinson. De acuerdo con esta invención, los extractos de orégano y sus componentes volátiles, así como las composiciones/medicamentos que los contienen, *no* se utilizan para tratamiento de enfermedades cardiovasculares, derrames cerebrales, cáncer, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson propiamente dichas, sino para tratar la depresión provocada por estas enfermedades.

Los extractos de orégano o sus componentes volátiles pueden utilizarse para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de un trastorno relacionado con la neurotransmisión deteriorada. Los mismos pueden utilizarse adicionalmente para la fabricación de composiciones para uso como agentes de equilibración del humor, mejoradores del humor/vitalidad, aliviadores del estrés, mejoradores del estado, reductores de la ansiedad, reductores de la tensión, reductores de la tristeza, reductores de la infelicidad/descontento, reductores de la irritabilidad, reductores de la disforia, reductores del comportamiento obsesivo-compulsivo, relajantes, mejoradores del sueño y/o aliviadores del insomnio.

"Mejorador del humor", "mejorador de la vitalidad" o "reforzador del bienestar emocional" significa que el humor o la vitalidad de una persona tratada con ello se mejora, que aumenta su autoestima y/o que las ideas negativas y/o la tensión negativa, la tristeza, la infelicidad y el descontento, la irritabilidad y la disforia se reducen. Significa también que las emociones están equilibradas y/o que el bienestar general, especialmente el mental, y la vitalidad se mejoran o se mantienen, y que el riesgo de fluctuaciones del humor se reduce, que se mantiene el humor positivo, y que uno se siente lleno de energía y motivado.

"Reductor de la tensión, reductor de la tristeza, reductor de la infelicidad/descontento, reductor de la irritabilidad, reductor de la disforia" significa que la tensión (crónica) y la preocupación se reducen o se alivian. El síndrome de hipervigilancia, con inclusión de inquietud y tensión muscular, se reduce o se alivia también. Las fobias sociales y de otros tipos se resuelven también al menos parcialmente. En general, el entorno social se siente como menos amenazante. La persona está emocionalmente relajada, experimenta comodidad y goza de la compañía y el contacto con otras gentes. En general, la persona se siente llena de energía y motivada para realizar las tareas diarias.

Un "relajante" actúa corrigiendo completa o parcialmente el ritmo circadiano (biorritmo) de una persona que se ha perturbado debido a jet-lag o trabajo a turnos. Un relajante prevendrá al menos parcialmente o anulará los síntomas asociados con tales perturbaciones, es decir el deterioro de la función cognitiva y la memoria, la fatiga mental y física, y mejorará globalmente la calidad de vida y la energía vital. Así, los extractos de orégano o uno o más de sus componentes volátiles, pueden utilizarse también para prevenir y/o anular el deterioro de la función cognitiva y la memoria, para prevenir y/o anular la fatiga mental y física, y para mejorar la calidad global de vida y la energía vital.

Una realización adicional de la presente invención se refiere al uso de extractos de orégano o sus componentes volátiles y al uso de composiciones que los contienen como "mejoradores del estado", es decir como medios para reducir la irritabilidad y el cansancio, para reducir, prevenir o aliviar la fatiga física y mental, para favorecer el sueño tranquilo, es decir para actuar contra el insomnio y los trastornos del sueño y mejorar el sueño, y para aumentar la energía en términos más generales, especialmente para aumentar la producción de energía cerebral, en individuos enfermos o de salud normal. Además, tales "mejoradores del estado" pueden utilizarse para mejora de la cognición en general, y especialmente para mantenimiento o mejora de la atención y concentración, de la memoria y la capacidad de recordar, de la capacidad de aprendizaje, del procesamiento del lenguaje, de la resolución de problemas y del funcionamiento intelectual; para mejora de la memoria a corto plazo; para aumento del estado de alerta mental; para aumento de la capacidad de concentración y la agudeza mental, para intensificación de la vigilancia mental; para reducción de la fatiga mental; para respaldo del bienestar cognitivo, para mantenimiento de una función cognitiva equilibrada, para la regulación del hambre y la saciedad, y para la regulación de la actividad motora.

Así pues, un aspecto preferido de la invención se refiere al uso de extractos de orégano y sus componentes volátiles como agentes de equilibración del humor y/o aliviadores del estrés.

En una realización adicional preferida de la presente invención, los extractos de orégano o sus componentes volátiles se utilizan para mantener los ritmos circadianos en humanos, para alivio y/o para prevención de los síntomas asociados con un ritmo circadiano perturbado en humanos. Así, el humor se estabiliza y se alcanza un equilibrio emocional para hacer frente al estrés de la vida diaria y mantener la eficiencia física y psicológica. Adicionalmente, los síntomas asociados con un ritmo circadiano perturbado, tales como deterioro de la función cognitiva y la memoria, así como fatiga mental y física, se alivian y/o se previenen, con lo que se mejora la calidad de vida global. Estas personas se benefician también del mantenimiento de la energía vital. Asimismo, la disregulación de los ritmos circadianos inducida por vuelos a larga distancia (jet-lag), así como por el trabajo a turnos y los síntomas asociados con ello, se alivian y/o se previenen.

Otro aspecto preferido de la invención se refiere al uso de los extractos de orégano o sus componentes volátiles para la fabricación de una composición, para uso como antidepresivo.

En el contexto de esta invención, "tratamiento" abarca también co-tratamiento así como prevención. La "prevención" puede ser la prevención de la primera aparición (prevención primaria) o la prevención de una recurrencia (prevención secundaria). La prevención significa también que el riesgo de sufrir neurotransmisión deteriorada, o de humor desequilibrado o estrés se reduce. El término "prevención" abarca especialmente la reducción del riesgo o incidencia del desarrollo de ciertos síntomas, especialmente asociados con un ritmo circadiano perturbado.

En otra realización, una dosis eficaz de extractos de orégano o sus componentes volátiles puede utilizarse especialmente para mantenimiento del bienestar mental, para mantenimiento de una función cognitiva equilibrada, para contribución al mantenimiento de un humor positivo, relajación, y para reforzar el bienestar cognitivo.

Los extractos o sus componentes volátiles de esta invención mejoran, aumentan y refuerzan la neurotransmisión fisiológica, especialmente en el sistema nervioso central, y por consiguiente pueden aliviar la disfunción mental.

Otro aspecto adicional de esta invención es un método para prevención o tratamiento de trastornos conectados con la neurotransmisión deteriorada en humanos por aumento del nivel plasmático de carvacrol hasta al menos 10 ng/ml en humanos, preferiblemente por aumento del nivel de carvacrol en plasma hasta dentro del intervalo de 10 ng/ml a 51.000 ng/ml en humanos. El nivel en plasma puede medirse como se describe en los ejemplos.

USOS VETERINARIOS

Otro aspecto de esta invención son usos veterinarios del extracto de orégano y/o sus componentes volátiles. Los animales pueden exhibir reacciones de comportamiento y/o fisiológicas adversas frente a situaciones estresantes. Por ejemplo, los animales criados en ambientes de producción en gran escala, o que son transportados, pueden tener una disminución en la cantidad o calidad de la carne o la leche. Las aves de corral estresadas pueden recurrir a arrancamiento de las plumas, reducción de la puesta de huevos y canibalismo. Muchos animales pueden volverse agresivos o exhibir comportamientos obsesivo-compulsivos. Los extractos y componentes volátiles de esta invención, al actuar como neurotransmisores, pueden aliviar estos comportamientos y fisiología indeseables en los animales.

En una realización preferida de la presente invención, los extractos de orégano o sus componentes volátiles se administran para prevención del estrés en animales de granja, en la cría de ganado para producción en gran escala, durante el transporte al matadero y/o para prevención de la pérdida de calidad de la carne en dichos animales durante el transporte al matadero.

En otra realización preferida de la presente invención, los extractos de orégano o sus componentes volátiles se administran a mascotas o animales de compañía para reducción del estrés, la tensión y la agresividad y el comportamiento compulsivo exhibido en condiciones estresantes, tales como separación, cambio o pérdida del

propietario, durante la separación en los días festivos y la permanencia en los denominados "hoteles de animales", y el mantenimiento en albergues o refugios para animales.

Especialmente los animales de compañía y animales de granja pueden encontrarse en condiciones de necesidad de mejora o aumento de la neurotransmisión. Tales condiciones se presentan v.g. después de la captura o el transporte o con el alojamiento, cuando los animales desarrollan trastornos análogos y sufren angustia o agresividad, o exhiben comportamientos estereotípicos, o ansiedad, tensión, tristeza, infelicidad/descontento e irritabilidad, disforia y trastorno obsesivo-compulsivo.

Así pues, los extractos de orégano o sus componentes volátiles, y las preferencias expuestas anteriormente, pueden utilizarse en general como antidepresivos para animales con inclusión de los humanos, preferiblemente para humanos y otros mamíferos, particularmente para animales de compañía y animales de granja.

Otra realización de esta invención es un método para reducción del estrés en animales de granja en la crianza de ganado para producción en gran escala, durante el transporte al matadero y/o para prevención de la pérdida de calidad de la carne de dichos animales de granja durante el transporte al matadero, que comprende administrar una dosis eficaz de un extracto de orégano o uno o más de sus componentes volátiles a los animales de granja que se encuentran en necesidad de ello. Los animales de granja son preferiblemente aves de corral, ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos.

En otra realización preferida de la presente invención, los extractos de orégano o sus componentes volátiles se administran a aves de corral para prevención del arrancamiento de las plumas y el canibalismo que dan como resultado v.g. pérdidas de la calidad de la carne y la producción de huevos. Así pues, otro aspecto de esta invención es un método para prevención de la pérdida de la producción de huevos, el arrancamiento de las plumas y el canibalismo y las pérdidas de calidad de la carne debido al estrés por transporte entre las aves de corral, que comprende administrar una dosis eficaz de un extracto de orégano o uno de sus componentes volátiles a aves de corral que se encuentran en necesidad de ello.

Otro aspecto de esta invención es un método para prevención y/o alivio del estrés en piscifactoría que comprende el paso de administrar una dosis eficaz de un extracto de orégano o uno o más de sus componentes volátiles a animales que se encuentran en necesidad de ello, en donde los animales son peces o camarones.

Otro aspecto adicional de esta invención es un método para reducción del estrés, la tensión, la agresividad y/o el comportamiento compulsivo en animales de compañía que se encuentran en condiciones estresantes, tales como separación, cambio o pérdida del propietario, durante la separación de los días festivos y el mantenimiento en los denominados "hoteles de animales", así como el mantenimiento en albergues, y otras condiciones de crianza y reproducción densas, que comprende el paso de administrar una dosis eficaz de un extracto de orégano o uno o más de sus componentes volátiles a animales de compañía que se encuentran en necesidad de ello, especialmente a gatos y perros que se encuentran en necesidad de ello.

Otro aspecto adicional de esta invención es un método para prevención y/o reducción de los síntomas asociados con condiciones estresantes en animales utilizados para la industria de la piel, preferiblemente para visones, zorros y/o liebres.

En el caso de los animales, los extractos de orégano o sus componentes volátiles, se administran preferiblemente como piensos reforzados o bebidas reforzadas (v.g. como adición al agua de bebida).

Extractos de orégano o sus componentes volátiles

Los extractos de orégano pueden ser de cualquier origen de una planta (planta entera o partes de la misma) perteneciente a los géneros *Origanum* tal como *Origanum vulgare* y *Thymus* tal como *Thymus vulgaris* en forma de un concentrado de compuestos extraíbles, especialmente compuestos volátiles. Ejemplos adicionales de plantas del género *Origanum* abarcadas por el término "orégano" son *O. majorana*, *O. dictamnus*, *O. creticum*, *O. majoricum*, *O. aureum*, *O. compactus*, *O. syriaca*, *O. tyt-thantum*, *O. heracleoticum*, *O. smyrnaeum* and *O. virens*. Ejemplos adicionales de plantas del género *Thymus* abarcadas por el término "orégano" son *T. herbos-barona*, *T. citriodorus*, *T. mastichiana*, *T. pulegioides*, *T. serpyllum*, *T. pallasianus* y *T. praecox*. El concentrado puede contener además disolventes utilizados para la extracción, puede estar exento de ellos o puede transferirse a materiales portadores específicos. Los extractos se pueden obtener de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, v.g., por (una) extracción con disolventes como metanol, etanol, acetato de etilo, dietiléter, n-hexano, cloruro de metileno, o con fluidos supercríticos tales como dióxido de carbono (puro o en mixtura con otros disolventes tales como alcoholes) u óxido de dinitrógeno, (b) hidrodestilación para obtención de aceites esenciales o (c) extracción/destilación con gases calientes como nitrógeno.

Preferiblemente, se utilizan extractos de orégano que se obtienen por una extracción con el uso de dióxido de carbono supercrítico. Tales extractos tienen la ventaja de que no contienen cantidad alguna de disolventes orgánicos, proteínas o metales pesados. Si se desea, una extracción con dióxido de carbono supercrítico va seguida

por un segundo paso de extracción con CO₂ fluido supercrítico para eliminar ceras y enriquecer selectivamente las materias volátiles.

Los extractos de orégano o sus componentes volátiles pueden ser de origen natural, sintético o mixto (es decir, parcialmente natural y parcialmente sintético), es decir, que aquéllos pueden, aparte de obtenerse por extracción de plantas y fraccionamiento, sintetizarse químicamente y, en caso deseado, mezclarse unos con otros en cualesquiera cantidades deseadas. Los mismos se pueden preparar y utilizar en cualesquiera purezas y concentraciones deseadas, v.g., como soluciones que los contienen en concentraciones tan bajas como, v.g., 10% (p/p) o menos, o hasta aproximadamente 100% (p/p).

Se prefieren extractos de orégano que contienen una proporción elevada de al menos uno de sus componentes volátiles. Son más preferidos extractos de orégano que contienen al menos un total de 70% en peso de componentes volátiles como se ha mencionado arriba, basados en el peso total del extracto. Los extractos de orégano completamente naturales pueden reforzarse con al menos un componente volátil específico de los mismos.

Extractos de orégano preferidos en el contexto de la presente invención son aquéllos en los cuales:

el extracto de orégano comprende al menos 30% en peso de carvacrol,
el extracto de orégano comprende al menos 50% en peso de carvacrol,
más preferiblemente aquéllos en los cuales el extracto de orégano comprende al menos 60% en peso de carvacrol,
y muy preferiblemente aquéllos en los cuales el extracto de orégano comprende al menos 65% en peso de carvacrol, basado en el peso del extracto de orégano.

Se prefieren también extractos de orégano y extractos de orégano que comprenden timoquinona en una cantidad comprendida en el intervalo de 0 a 30% en peso,
preferiblemente en donde el extracto de orégano comprende al menos 1% en peso de timoquinona, más preferiblemente en donde el extracto de orégano comprende al menos 2% en peso de timoquinona,
aún más preferiblemente en donde el extracto de orégano comprende al menos 5% en peso de timoquinona
y muy preferiblemente en donde el extracto de orégano comprende timoquinona en un intervalo de 5 a 30% en peso, basado en el peso del extracto de orégano.

Otros extractos de orégano preferidos son aquéllos en donde el extracto de orégano comprende al menos 50% en peso de carvacrol y desde 0 a 25% en peso de timoquinona,
preferiblemente en donde el extracto de orégano comprende al menos 50% en peso de carvacrol y al menos 1% en peso de timoquinona;
más preferiblemente en donde el extracto de orégano comprende al menos 55% en peso de carvacrol y al menos 2% en peso de timoquinona,
aún más preferiblemente en donde el extracto de orégano comprende al menos 60% en peso de carvacrol y al menos 5% en peso de timoquinona, y
muy preferiblemente en donde el extracto de orégano comprende al menos 65% en peso de carvacrol y timoquinona en un intervalo de 5 a 25% en peso, basado en el peso de extracto de orégano.

Se prefieren también los métodos en que se utilizan componentes volátiles simples o sus mixturas, en donde los componentes volátiles se seleccionan del grupo constituido por carvacrol, timoquinona, p-cimeno, timoquinol, limoneno, linalol, borneol, 4-terpineol, timol y cariofileno. Preferiblemente, los compuestos volátiles se seleccionan del grupo constituido por carvacrol, timoquinona y p-cimeno, más preferiblemente en donde los componentes volátiles son carvacrol y/o timoquinona, y muy preferiblemente en donde el componente volátil es carvacrol.

Aún más preferidos son extractos de orégano que no contienen: un extracto hidrófilo, una cantidad esencial de uno de los constituyentes siguientes: ácido rosmarínico, eugenol, sales de eugenol, isómeros de eugenol, paredes de células de levadura o 1-piperoilpiperidina. Una "cantidad esencial" como se utiliza en esta memoria la cantidad total de cualquiera de estos ingredientes, si está presente en absoluto, es preferiblemente inferior a 0,5% en peso, más preferiblemente inferior a 0,2% en peso, aún más preferiblemente inferior a 0,1% en peso, basada en el peso total de dicho extracto de orégano o material de orégano o el o los componentes volátiles.

Adicionalmente, ciertas combinaciones de extractos de plantas no se prefieren en esta invención, tales como la combinación de extracto de orégano y:

Agaricus blazei, ortiga, alcachofa, *Crataegus*, *Leonurus*, milenrama común, muérdago, *Crataegus*, *Herba viola tricolor*, *Scutellariae baicalensis*, cúrcuma, hilo de oro, agracejo.

La composición de la presente invención se encuentra preferiblemente en la forma de composición nutricional, tal como alimento reforzado, pienso reforzado, o bebidas reforzadas, o en forma de alimento/pienso líquido reforzado para animales, con inclusión de los humanos.

Las composiciones dietéticas y farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden encontrarse en cualquier forma galénica que sea adecuada para administración al cuerpo animal con inclusión del cuerpo humano, especialmente en cualquier forma que sea convencional para administración oral, v.g. en forma sólida, tal como

(aditivos/suplementos para) alimento o pienso, premezcla de alimento o pienso, alimento o pienso reforzado, tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas, y formulaciones efervescentes tales como polvos y tabletas, o en forma líquida tales como soluciones, emulsiones o suspensiones como v.g. bebidas, pastas y suspensiones aceitosas. Las pastas pueden estar encapsuladas en cápsulas de vaina dura o blanda, en cuyo caso las cápsulas

5 presentan v.g. una matriz de gelatina (de pescado, de cerdo, de ave de corral, de vaca), proteínas de plantas o ligninsulfonato. Ejemplos de otras formas de aplicación son formas para administración transdérmica, parenteral o inyectable. Las composiciones dietéticas y farmacéuticas pueden encontrarse en la forma de formulaciones de liberación controlada (retardada). Las composiciones de la presente invención no se administran por vía nasal.

Las composiciones dietéticas de acuerdo con la presente invención pueden contener adicionalmente hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglomerantes, agentes de formación de film, agentes/materiales encapsulantes, materiales de pared/vaina, compuestos matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), absorbentes, portadores, cargas, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, adyuvantes de procesamiento (disolventes),

10 agentes de fluidificación, agentes enmascaradores del sabor, agentes de aumento de peso, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos.

Ejemplos de alimentos son barras de cereales, productos lácteos, tales como yogures, y artículos de repostería, tales como pasteles y galletas. Ejemplos de alimento reforzado son barras de cereales, y artículos de repostería, tales como pan, panecillos, donuts, pasteles y galletas. Ejemplos de suplementos dietéticos son tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes, en la forma de bebidas no alcohólicas, tales como

20 refrescos, zumos de frutas, limonadas, bebidas constituidas casi exclusivamente por agua, té y bebidas lácteas, en forma de alimento líquido, tales como sopas y productos lácteos (bebidas muesli).

Las bebidas abarcan bebidas no alcohólicas y bebidas alcohólicas así como preparaciones líquidas para añadir al agua de bebida y alimentos líquidos. Las bebidas no alcohólicas son v.g. refrescos, bebidas para deportes, zumos de frutas, zumos de hortalizas, v.g. zumo de tomate), limonadas, té y bebidas lácteas. Los alimentos líquidos son

25 v.g. sopas y productos lácteos (v.g. bebidas muesli).

Además de como mínimo un extracto de orégano o uno de sus componentes volátiles, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden contener adicionalmente aditivos y adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticos convencionales, que incluyen, pero sin carácter limitante, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, ligninsulfonato, talco, azúcares, almidón, goma arábica, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes saborizantes, conservantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas, y análogos. El material portador puede ser un material

30 portador inerte orgánico o inorgánico adecuado para administración oral/parenteral/inyectable.

Para humanos, una dosis diaria adecuada de extractos de orégano o sus componentes volátiles para los propósitos de la presente invención puede estar comprendida dentro del intervalo que va desde 0,001 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal al día. Es más preferida una dosis diaria de

35 aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, y es especialmente preferida una dosis diaria de aproximadamente 0,05 a 5,0 mg por kg de peso corporal.

En las preparaciones unitarias en forma sólida para humanos, el extracto de orégano o sus componentes volátiles está/están presentes adecuadamente en una cantidad que va desde aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente

40 1000 mg, con preferencia desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg por dosis unitaria. Para alivio de los síntomas asociados con afecciones como las mencionadas en esta memoria, el extracto de orégano o cualquiera de sus componentes volátiles se toma(n) una o dos veces al día junto con una comida durante al menos una semana y hasta 6-12 meses. Para prevención de la aparición de síntomas asociados con afecciones como las que se mencionan en esta memoria, y para el mantenimiento de un estado relajado en líneas generales, es

45 adecuado el consumo sobre una base regular.

En las composiciones dietéticas, especialmente en alimentos y bebidas para humanos, el extracto de orégano o sus componentes volátiles está/están presentes convenientemente en una cantidad que va desde aproximadamente 0,0001 (1 mg/kg) a aproximadamente 5% en peso (50 g/kg), con preferencia desde aproximadamente 0,001% (10 mg/kg) a aproximadamente 1% en peso (10 g/kg), de modo más preferible desde aproximadamente 0,01 (100 mg/kg) a aproximadamente 0,5% en peso (5 g/kg) basado en el peso total del alimento o bebida. Para alivio de los

50 síntomas asociados con condiciones como las definidas anteriormente, el producto alimenticio se toma una o dos veces al día al menos durante 1 a 3 semanas o sobre una base regular, es decir al menos una vez al día.

En los alimentos y bebidas en una realización preferida de la invención, la cantidad del extracto de orégano o sus componentes volátiles es/son 10 a 30 mg por servicio, es decir 120 mg por kg de alimento o bebida. El producto

55 alimenticio se toma una o dos veces al día al menos durante 1 a 3 semanas o preferiblemente sobre una base regular de al menos una vez al día.

Para los animales con exclusión de los humanos, una dosis diaria adecuada de un extracto de orégano o sus componentes volátiles, para los propósitos de la presente invención puede estar comprendida dentro del intervalo que va desde 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal al día. Es más preferida una dosis diaria de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal, y es especialmente preferida una dosis diaria de aproximadamente 1 mg a 100 mg por kg de peso corporal. Para prevenir y reducir los síntomas asociados con condiciones estresantes, tales como la cría de ganado para producción en gran escala y para la crianza industrial o piscicultura, el producto que contiene el extracto de orégano o su/sus componentes volátiles se administra durante toda la vida del animal hasta su conducción al matadero. Especialmente en el caso en que los animales de granja, tales como aves de corral, ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos, especialmente ganado vacuno y cerdos, se transportan al matadero, aquéllos deberían administrarse en una dosis diaria de aproximadamente 3 a 800 mg/kg de peso corporal del extracto y/o sus componentes volátiles, preferiblemente durante el transporte, mas preferiblemente al menos 3 días antes del transporte y durante el transporte.

Para mascotas, en condiciones estresantes como en las granjas o albergues de animales o tiendas de mascotas, el producto debería administrarse daten al menos 1-3 semanas, o a lo largo de todo el periodo de crianza. En condiciones de estrés a corto plazo, tales como una separación durante días festivos, mantenimiento en "hoteles para animales", visitas a o permanencia en clínicas veterinarias, el producto puede administrarse al menos 3 días, y preferiblemente 7 días, antes del suceso estresante.

La invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos que siguen.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de dos extractos de *O. vulgare*

En los ejemplos que siguen, "-se" hace referencia a extracto de orégano 1 tipo fenol, obtenido de, y "-to" hace referencia a extracto de orégano 2 de tipo terpineol, obtenidos ambos de Flavex, Alemania.

Hojas secas de *O. vulgare* se molieron y extrajeron con dióxido de carbono supercrítico. Los parámetros de extracción fueron como sigue: temperatura de 45°C; presión de trabajo: 300 bar (-to) o 100 bar (-se); se necesitaron 17 kg (-to) y 15 kg (-se) de dióxido de carbono para 1 kg de material vegetal; los extractos se obtuvieron en el separador por estrangulación de la presión a 60 bar a 30°C.

25 kg (-to) o 50 kg (-se) de material vegetal produjeron respectivamente 1 kg de extracto.

El extracto 1 tenía la composición siguiente (analizada por Cromatografía de Gases)

El contenido total de aceite esencial era 83% (las partes restantes son ceras vegetales)

Componentes volátiles: terpineno 0,2%, cimeno 2,6%, 4-terpineol 1,5%, timoquinona, 23%, timol 0,3%, carvacrol 62%, cariofileno 1,5%.

El extracto 2 (RV141-23) contenía 80-90% de aceite esencial con un contenido elevado de terpineoles que incluían trans-beta-terpineol 35-50%, cis-beta-terpineol 5-10%, 4-terpineol 8-12%, y una cantidad relativamente pequeña de fenoles que incluían timol 5-12%, carvacrol < 1%, basada en el contenido total de aceites esenciales.

Ejemplo 2: Preparación del extracto de orégano 3

Se extrajeron hojas de *Origanum vulgare* con una mezcla de disolventes constituida por metil-terc-butil-éter y metanol con la ratio en volumen 9:1.

Ejemplo 3: Preparación y composición del extracto de orégano 4 Flavex

Las hojas de orégano se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1, extracto puro. Debido a un lote de recolección diferente, la composición era ligeramente diferente al extracto 1.

El contenido total de aceite esencial era 89,5% (las partes restantes son ceras vegetales)

Componentes volátiles: cimeno 7,8%, 4-terpineol 1,2%, timoquinona, 12,1%, timol 0,22%, carvacrol 68,5%, cariofileno 1,6%, limoneno 0,1%, linalol 0,77%, borneol 2,6%.

Ejemplo 4: Composición detallada de los extractos de orégano

Se prepararon extractos por destilación con vapor de hojas de orégano.

La composición era como sigue:

Método de análisis GC/MS

	GC/MS	GC/MS	GC/MS
	Carvacrol	Timoquinona	Timol
	p/p	p/p	p/p
Extracto 5 (especia <i>Oregano dragon</i>)	61,6	-	9,0
Extracto 6 (hierbas Yafa/Marruecos)	30,7	-	21,6
Extracto 7 (Aysun/Derial, Turquía)	64,9	-	0,3

Ejemplo 5: Inhibición de la absorción de serotonina por los extractos de orégano

Células HEK-293 que expresaban de manera estable el transportador de la reabsorción de serotonina humana (hSERT) se obtuvieron de R. Blakely, Vanderbilt University, EE.UU. Las células se dejaron crecer rutinariamente en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco, adquirido de Bioconcept, Allschwil, Suiza, que contenía 10% de suero de ternero fetal, penicilina, estreptomycin, L-glutamina y el antibiótico G418, y se sometieron a pases por tripsinación. Un día antes del ensayo, se sembraron las células en el medio arriba mencionado. Inmediatamente antes del ensayo, se reemplazó el medio por tampón de bicarbonato Krebs-Ringer, adquirido de Sigma Chemicals Ltd., suplementado con pargilina 35 μ M, CaCl_2 2,2 mM, ácido ascórbico 1 mM y ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico 5 mM (tampón "Hepes"). La absorción de serotonina en las células se determinó por adición de serotonina radiomarcada (^3H) (Amersham Biosciences GE Healthcare, Slough, Reino Unido) a una concentración de 20 nM, e incubación durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Después de la eliminación del marcador no incorporado por lavado suave 3 veces con el tampón anterior, se cuantificó la serotonina incorporada por recuento mediante centelleo de líquido.

La absorción de serotonina por el transportador era inhibida por el extracto de orégano de una manera dependiente de la dosis. Los valores Cl_{50} medidos para la inhibición de la absorción de serotonina por 3 extractos de orégano se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Valores Cl_{50} medidos para inhibición de la absorción de serotonina en células transfectadas HEK-293 por los extractos de orégano 1, 2 y 3, y sus componentes volátiles timol, carvacrol y timoquinol. Los datos se muestran como media $\pm$ s.e.m., donde la Cl_{50} se expresa como μ M para los compuestos simples y como μ g/ml para los extractos.

Sustancia	Cl_{50} [μM o μg/ml] para absorción de serotonina tritiada
Extracto de Orégano 1	3,2 μ g/ml $\pm$ 1,4
Extracto de Orégano 2	15,31 μ g/ml $\pm$ 5,3
Extracto de Orégano 3	66,3 μ g/ml $\pm$ 3,0
Extracto de Orégano 4	1,95 μ g/ml $\pm$ 0,94 (n=3)
Extracto de Orégano 5	7,8 μ g/ml
Extracto de Orégano 6	5,8 μ g/ml
Extracto de Orégano 7	4,1 μ g/ml
Timol	5,0 μ M $\pm$ 0,4
Carvacrol	9,5 μ M
Timoquinol	26,6 μ M

Ejemplo 6: Inhibición de las Monoaminoxidasas por el extracto de orégano 1

Se utilizaron las aminas orgánicas p-tiramina o bencilamina como sustratos para las enzimas Monoamino-Oxidasa A (MAO-A) y B (MAO-B), respectivamente. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido por esta reacción se cuantificó por reacción con ácido vainillínico, catalizado por peroxidasa de rábano picante (HRP).

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de microtitulación de poliestireno. Las enzimas MAO (concentración final 2 U/ml) se mezclaron con p-tiramina (Sigma, concentración final 0,5 mM) o bencilamina (Sigma, concentración final 0,5 mM) en caso apropiado y la solución cromógena (que contenía ácido vainillínico (Fluka), 4-aminoantipirina (Fluka) y peroxidasa de rábano picante (Sigma, concentraciones finales 0,25 mM, 0,125 mM y 1 U/ml, respectivamente) en tampón de fosfato de potasio 0,2 M de pH 7,6. Las reacciones se siguieron en un lector de absorbancia de placas de microtitulación, v.g. Spectramax M5 (Molecular Devices Corporation). Se tomaron lecturas de absorbancia a 495 nm cada 15 segundos durante 40 minutos y se calcularon las velocidades de reacción iniciales por regresión lineal utilizando SOFTmaxPro (Molecular Devices Corporation).

El efecto del extracto de orégano 1 sobre las enzimas monoamina-oxidasa se determinó por su inclusión en el ensayo en un intervalo de concentraciones entre 0,03 y 100 µM durante 10 minutos antes de y durante la incubación con sustrato. Para determinar el efecto de los compuestos sobre la porción de la reacción catalizada con HRP, la enzima MAO se reemplazó por H₂O₂ (Molecular Probes, concentración final 0,2 mM). Las reacciones que contenían MAO-A y -B eran inhibidas ambas por el extracto de orégano 1 de una manera dependiente de la dosis, mientras que la reacción de control se mantenía inafectada. Los valores CI₅₀ medidos para inhibición de la actividad de monoaminooxidasa por el extracto de orégano 1 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Valores CI₅₀ medidos para inhibición de las enzimas Monoamina-Oxidasa-A y -B por el extracto de orégano 1. Los datos se muestran como la media ± s.e.m.

Sustancia	CI ₅₀ [µg/ml] para Inhibición de MAO-A	CI ₅₀ [mg/ml] para Inhibición de MAO-B
Extracto de Orégano 1	2,7 µg/ml ± 0,8 s.e.m. n=2	13,4 µg/ml ± 3,6 s.e.m. n=2

Ejemplo 7: Efecto del extracto de orégano 1 en el Test de Observación Primaria (Irwin) en el ratón

El método, que detecta la primera dosis tóxica, el intervalo de dosis activo y los efectos principales de una sustancia de test sobre el comportamiento y la función fisiológica, sigue el descrito por Irwin (Irwin S. 1968 *Psychopharma*. 13:222-257).

Se administró a ratones la sustancia de test y se observaron los animales en comparación simultánea con un grupo de control al que se administró vehículo (condiciones no ciegas). Se compararon 3 grupos tratados con el mismo grupo de control en cualquier momento. Todos los animales comprendidos dentro de un grupo de tratamiento se observaron simultáneamente.

Las modificaciones de comportamiento, los síntomas fisiológicos y de neurotoxicidad, el diámetro de la pupila y la temperatura rectal se registraron de acuerdo con una parrilla de observación estandarizada derivada de la de Irwin. La parrilla contiene los apartados siguientes: letalidad*, convulsiones*, temblor*, Straub*, sedación, excitación, andadura anormal* (bambolearse, andar de puntillas), saltos*, descoordinación motora*, contorsiones*, piloerección*, estereotipos* (olfateo, masticación, movimientos de la cabeza), sacudidas de la cabeza*, rascado*, respiración*, agresividad*, temblor, reactividad al tacto, tono muscular, pérdida del reflejo de enderezamiento, ptosis, exoftalmos, pérdida de agarre, acinesia, catalepsia, pérdida de tracción, pérdida de reflejo corneal, analgesia, defecación, salivación, lacrimación, diámetro de pupila (Unidad = 1/45 mm) y temperatura rectal.

Las observaciones se realizaron 15, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la administración de la sustancia de test y también 24 horas más tarde. Los síntomas marcados (*) se observaron continuamente desde 0 a 15 minutos después de la administración. Se estudiaron 5 ratones por grupo. El extracto de orégano 4 se solubilizó en 3% (v/v) DMSO, 3% (v/v) Tween 80 en solución salina (0,9% p/v NaCl) y se inyectó en los ratones por vía intraperitoneal (i.p.).

Resultados

- El extracto de orégano 1 a 3 mg/kg no inducía cambios adicionales de comportamiento, en comparación con el vehículo.
- A 10 mg/kg, el mismo inducía una sedación ligera en 3 ratones y reducía el temor de 15 a 30 minutos en la totalidad de los 5 ratones.
- A 30 mg/kg, el extracto de orégano 1 inducía sedación ligera en 4 ó 5 ratones de 15 a 60 minutos, inducía temor en 3 ó 4 ratones desde 15 a 60 minutos y reducía el tono muscular en 1 a 5 ratones de 30 a 60 minutos.
- A 100 mg/kg, el extracto de orégano 1 inducía sedación que era ligera a acusada en 4 ó 5 ratones desde los 15 a los 180 minutos y ligera en 1 ratón a las 24 horas. El mismo reducía el temor en 4 ó 5 ratones desde los

15 a 180 minutos, reducía la reactividad al tacto en 4 ratones desde los 60 a los 180 minutos y reducía el tono muscular en 3 ó 4 ratones desde los 30 minutos a las 24 horas.

Así pues, el extracto de orégano 1 exhibía un efecto sedante relajante moderado y dependiente de la dosis, y reducía el temor.

5 **Ejemplo 8: Test de Natación de Porsolt**

El "test de Comportamiento Desesperado" o "Test de Natación Forzada de Porsolt" es un modelo animal validado para la depresión (véase Nagatsu, 2004 *NeuroTox.*, 25: 11-20, y Porsolt et al., 1977 *Arch. Int. Pharmacodyn.* 229: 327-336). El mismo responde a la mejora de la transmisión de varios neurotransmisores que incluyen serotonina, dopamina y noradrenalina.

- 10 El test, que detecta la actividad antidepresiva, se llevó a cabo como ha sido descrito por Porsolt et al *supra*. Los ratones que se ven obligados a nadar en una situación de la cual no pueden escapar se vuelven rápidamente inmóviles. Los antidepresivos reducen la duración de la inmovilidad.

Los ratones se pusieron individualmente en cilindros (altura = 24 cm, diámetro = 13 cm) que contenían 10 cm de agua (22°C) de la cual no podían escapar. Los ratones se pusieron en el agua durante 6 minutos y se midió la duración de la inmovilidad durante los 4 últimos minutos.

Se estudiaron 15 ratones por cada uno de los 4 grupos. El test se realizó a ciegas, es decir que la persona que realizaba el experimento era distinta de la persona que inyectaba a los ratones y por consiguiente no conocía a cuál de los 4 grupos pertenecía cada ratón.

- 20 El extracto de orégano 1 se evaluó a 3 dosis (10, 30 y 60 mg/kg), administrado i.p. 30 minutos antes del test, y se comparó con un grupo de control, al que se administró vehículo de igual manera. El extracto de orégano 4 así administrado se disolvió en vehículo (solución salina que contenía 3% (v/v) de DMSO y 3% (v/v) de Tween® 80). Se administraron venlafaxina (16 mg/kg, i.p.), como sustancia de comparación, e imipramina (32 mg/kg, i.p.), como compuesto de referencia, en las mismas condiciones experimentales.

- 25 Los datos se analizaron por comparación de los grupos tratados con el grupo de control utilizando test de Student no apareados, y se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Reducción del "tiempo de inmovilidad" con concentración creciente de extracto de orégano 1.

TRATAMIENTO (mg/kg) i.p., - 30 min	DURACIÓN DE LA INMOVILIDAD (s)		
	Media $\pm$ s.e.m.	% Cambio respecto al control	
Vehículo	164,7 $\pm$ 7,6	-	-
Extracto de orégano 1 (10)	163,7 $\pm$ 10,3	-1%	NS
Extracto de orégano 1 (30)	137,1 $\pm$ 9,5	-17%	*
Extracto de orégano 1 (60)	125,6 $\pm$ 6,5	-24%	***
Venlafaxina (16)	80,1 $\pm$ 11,1	-51%	***
Imipramina (32)	49,7 $\pm$ 7,9	-70%	***

15 ratones por grupo

Test t de Student: NS = no significativo; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

- 30 Así pues, el extracto de orégano 1 reducía significativamente el tiempo de inmovilidad comparado con el grupo de control, en 17% y 24% en los grupos de dosis intermedia y máxima, respectivamente. En su conjunto, se registraba un efecto significativo dependiente de la dosis del extracto de orégano 1. Imipramina (32 mg/kg i.p.) y venlafaxina (16 mg/kg, i.p.), administradas en las mismas condiciones experimentales, reducían significativamente el comportamiento de inmovilidad, en comparación con el control de vehículo (-70% y -51%, respectivamente, $p < 0,001$).

Estos resultados demuestran que el extracto de orégano 1 (60 mg/kg, i.p.) tiene una eficacia similar que el antidepresivo tricíclico imipramina, y el SNRI, venlafaxina, en su capacidad para reducir significativamente el comportamiento relacionado con la depresión.

40 **Ejemplo 9: Test de Enterramiento de Canicas como Test de comportamiento de tipo ansiedad u obsesivo-compulsivo**

El comportamiento de "enterramiento defensivo" fue demostrado originalmente por ratas que enterraban objetos nocivos (tales como zumos de bebidas llenos con un líquido de sabor desagradable (Wilkie et al., *J. Exp. Anal.*

Behavior 1979, 31:299-306) o pinchazos de choque (Pinel et al 1978, *J. Comp.Physiol. Psych.* 92:708-712). El test de enterramiento de canicas se ideó como una modificación de dicho test. Poling et al. 1981 *J. Exp. Anal. Behavior* 1981, 35:31-44) expusieron ratas a jaulas individuales cada una de las cuales contenía 25 canicas, diariamente durante 10 ó 21 días consecutivos. Se contó el número de canicas enterradas, cada día del periodo de 10 días, o 24 horas después de la exposición durante 21 días. Los autores consignaban que el enterramiento de canicas no estaba determinado por la novedad, o debido a ningún estímulo nocivo.

Se ha comunicado que el comportamiento de enterramiento de canicas por los ratones es sensible a una gama de tranquilizantes menores (v.g. diazepam) y mayores (v.g. haloperidol) (Broekkamp et al., 1986 *Eur. J. Pharmacol.* 126:223-229), además de los SSRIs (v.g. fluvoxamina, fluoxetina, citalopram), antidepresivos tricíclicos (v.g. imipramina, desipramina) e inhibidores selectivos de la absorción de noradrenalina (v.g. reboxetina), a dosis que no inducen sedación. El modelo puede reflejar comportamiento de tipo ansiedad o comportamiento obsesivo-compulsivo (véase De Boer et al, 2003 *Eur. J. Pharma.* 463:145-161).

El método aplicado aquí sigue el descrito por Broekkamp et al., 1986, *supra*. Los ratones (n = 15 por grupo de tratamiento) se pusieron individualmente en jaulas de plástico transparentes (33 x 21 x 18 cm) con 5 cm de serrín en el suelo y 25 canicas (de 1 cm de diámetro) agrupadas en el centro de la jaula. Una segunda jaula, puesta boca abajo, servía como tapa. El número de canicas cubiertas por el serrín (al menos en sus dos terceras partes) se contó al final del periodo de test de 30 minutos. Los tests fueron realizados por investigadores ciegos al protocolo de tratamiento con fármacos.

Antes del test, la totalidad de las jaulas y canicas se "impregnaron" dejando 10 ratones naïf en cada jaula durante 15 minutos.

Se evaluó el extracto de orégano 1 a 10, 30 y 60 mg/kg, administrados i.p. 30 minutos antes del test, y se comparó con un grupo de control de vehículo. El extracto de orégano 1 se disolvió en una solución salina que contenía 3% (v/v) de DMSO y 3% (v/v) de Tween® 80 "vehículo". Se administró vehículo al grupo de control del mismo modo, mientras que se utilizó fluoxetina (32 mg/kg) como sustancia de referencia, administrada en las mismas condiciones experimentales. Los datos se analizaron por comparación de los grupos tratados con el control de vehículo utilizando tests t de Student no apareados.

Resultados:

Tabla 4: Efectos del extracto de orégano 1 y fluoxetina en el test de enterramiento de canicas en los ratones

TRATAMIENTO (mg/kg) i.p., - 30 min	NÚMERO DE CANICAS CUBIERTAS POR SERRÍN	
	Media ± s.e.m.	% Cambio respecto al control
Vehículo	21,2 ± 1,6	-
Extracto de orégano 1 (10)	12,7 ± 2,7	-40% *
Extracto de orégano 1 (30)	5,8 ± 2,6	-73 % ***
Extracto de orégano 1 (60)	6,9 ± 2,6	-67 % ***
Venlafaxina (16)	0,5 ± 0,3	-98 % ***
Fluoxetina (32)	1,4 ± 1,0	-93 % ***

15 ratones por grupo

Test t de Student: NS = no significativo; * = p < 0,05; *** = p < 0,001

El extracto de orégano 1 (10, 30 y 60 mg/kg), administrado i.p. 30 minutos antes del test, reducía de manera dependiente de la dosis el número de canicas cubiertas, en comparación con el control de vehículo de control (-40%, p < 0,05, -73%, p < 0,001 y -67%, p < 0,001, respectivamente).

Fluoxetina (32 mg/kg i.p.) y venlafaxina (16 mg/kg, i.p.), administradas en las mismas condiciones experimentales, anulaban prácticamente el enterramiento de las canicas, en comparación con el control de vehículo (-93% y -98%, respectivamente, p < 0,001).

Estos resultados demuestran que el extracto de orégano 1 tiene una eficacia similar al SSRI, fluoxetina, y al SNRI, venlafaxina, en su capacidad para reducir significativamente el comportamiento de ansiedad/obsesivo-compulsivo.

Ejemplo 10: Efecto del Extracto de Orégano 1 en el Test de la Jaula Iluminada-Oscura en el Ratón

El método, que detecta actividad ansiolítica, sigue el descrito por Crawley, 1981 *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15:695-699. Los ansiolíticos aumentan el tiempo pasado en el compartimiento iluminado.

Los animales se pusieron en el compartimiento iluminado de una jaula de 2 compartimientos, con una mitad iluminada y abierta (25 x 27 x 27 cm) y la otra mitad oscura y cerrada (20 x 27 x 27 cm). El tiempo pasado en cada compartimiento, así como el número de veces que el animal cruza de un lado al otro, se registra durante un test de 3 minutos. Se estudiaron 15 ratones por grupo. El test se realizó a ciegas.

El extracto de orégano 1 se evaluó a 3 dosis (10, 30 y 60 mg/kg), administradas i.p. 30 minutos antes del test, y se comparó con un control de vehículo. El extracto de orégano 1 se disolvió en una solución salina que contenía 3% (v/v) de DMSO y 3% (v/v) de Tween® 80 ("vehículo"). Se administró vehículo al grupo de control, se utilizó venlafaxina (16 mg/kg i.p.) como sustancia de comparación y se utilizó clobazam (16 mg/kg, i.p.) como sustancia de referencia, administrándose todos ellos i.p., 30 minutos antes del test.

Tabla 5: Resultado del Test de la Jaula Iluminada-Oscura en el ratón

TRATAMIENTO (mg/kg) i.p. -30 min	TIEMPO PASADO EN EL COMPARTIMIENTO ILUMINADO (s)		NÚMERO DE CRUZAMIENTOS	
	media $\pm$ s.e.m.	% cambio respecto al control	media $\pm$ s.e.m.	% cambio respecto al control
Vehículo	55,3 $\pm$ 6,3	-	4,7 $\pm$ 1,1	-
Extracto de orégano 1 (10)	70,7 $\pm$ 7,5	NS +28%	7,1 $\pm$ 0,9	NS +51%
Extracto de orégano 1 (30)	56,8 $\pm$ 5,8	NS +3%	3,2 $\pm$ 0,7	NS -32%
Extracto de orégano 1 (60)	74,9 $\pm$ 7,2	NS +35%	3,5 $\pm$ 0,6	NS -26%
Venlafaxina (16)	55,2 $\pm$ 9,3	NS 0%	4,4 $\pm$ 0,9	NS -6%
Clobazam (16)	118,4 $\pm$ 3,4	*** +114%	7,9 $\pm$ 0,9	* +68%

15 ratones por grupo
Test t de Student: NS = no significativo; * = p < 0,05; *** = p < 0,001

El extracto de orégano 1 a 10 y 60 mg/kg aumentaba el tiempo pasado en el compartimiento iluminado, en comparación con el control de vehículo (+28%, y +35%, p = 0,0506 respectivamente, próximo a la significación). El mismo tendía a aumentar el número de cruzamientos a 10 mg/kg (+51%, p = 0,0888) pero no tenía efecto claro alguno a 30 y 60 mg/kg. Así pues, puede suponerse que el extracto de orégano 1 tiene un efecto ansiolítico moderado, tal como se mide en el test de la jaula iluminada-oscura en el ratón.

Ejemplo 11: Efecto del extracto de orégano 4 en el test de natación forzada de Porsolt en el ratón después de alimentación oral por sonda esofágica subcrónica

Este test, que detecta la actividad antidepresiva, se realizó del mismo modo que se describe en el ejemplo 7, excepto que la ruta de administración del compuesto y las dosis eran diferentes. El extracto de orégano 4 se evaluó a 3 dosis (75, 150 y 300 mg/kg), administradas por vía oral (p.o.) 24, 5, y 1 hora antes del test, y se comparó con un grupo de control de vehículo. El extracto de orégano 1 así administrado se disolvió en "vehículo" de aceite de maíz exento de tocoferol. Se administró vehículo (p.o.) al grupo de control, mientras que se administró imipramina (32 mg/kg), p.o.; disuelta en agua) a un grupo separado como compuesto de referencia, 24, 5 y 1 hora antes del test.

Los ratones se pusieron individualmente en cilindros (altura = 24,5 cm, diámetro = 19,5 cm) que contenían 13,5 cm de agua (22°C) de la que no podían escapar. Los ratones se dejaron en el agua durante 6 minutos, se examinaron automáticamente mediante una cámara de vídeo y se monitorizaron por un sistema de software disponible comercialmente (VideoMot2, TSE Systems GmbH, Alemania), y se midió la duración de la inmovilidad durante los últimos 4 minutos.

Se estudiaron 10 ratones por cada uno de los 5 grupos. Los datos se analizaron por comparación de los grupos tratados y el grupo de control positivo con el grupo de vehículo utilizando el Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test post-hoc de Bonferroni.

Tabla 6: Resultados del test de natación forzada en el ratón después de administración subcrónica de 3 concentraciones del extracto de orégano 1.

TRATAMIENTO (mg/kg) p.o., - 24, -5, -1 h	DURACIÓN DE LA INMOVILIDAD (s)	
	Media $\pm$ s.e.m.	% cambio respecto al control
Vehículo	129,35 $\pm$ 11,10	- -
Extracto de orégano 1(75)	76,74 $\pm$ 46,02	-41 % *
Extracto de orégano 1(150)	87,79 $\pm$ 14,08	-32 % *
Extracto de orégano 1 (300)	102,06 $\pm$ 13,69	-21 % NS
Imipramina (32)	64,59 $\pm$ 8,26	-50 % ***

10 ratones por grupo

Test t de Student: NS = no significativo; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

Así pues, el extracto de orégano 4 reducía significativamente el tiempo de inmovilidad, comparado con el grupo de control, en 41% y 32% respectivamente en los grupos de dosis baja e intermedia. Globalmente, se apreciaba un efecto significativo del extracto de orégano 4. La imipramina (32 mg/kg i.p.) administrada en las mismas condiciones experimentales, reducía significativamente el comportamiento de inmovilidad, en comparación con el control de vehículo (-50%, $p < 0,001$).

Estos resultados demuestran que el extracto de orégano 4 (75 y 150 mg/kg, p.o.) tiene una eficacia similar al antidepresivo tricíclico imipramina, en su capacidad para reducir significativamente el comportamiento relacionado con la depresión.

Ejemplo 12: Efecto del extracto de orégano 4 sobre los niveles de serotonina en el hipocampo medidos por microdiálisis *in vivo*

Ratas macho Sprague-Dawley (250-320 g) se alojaron en grupos de 4-5 en condiciones de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad ($55 \pm 10\%$) controladas con acceso libre a comida y agua (con las luces encendidas desde las 07,00 a las 19,00). Las ratas se anestesiaron utilizando hidrato de cloral (400 mg/kg i.p.) y con una sonda simple de microdiálisis (BASi tipo MD2200, membrana de 2 mm, punto de corte 30.000 Daltons) implantada en el hipocampo dorsal utilizando un marco estereotáxico en las coordenadas siguientes (rostro-caudal -4,5 mm; medio-lateral -2,5 mm; dorso-ventral -4,5 mm del bregma y la superficie de la duramadre de acuerdo con Paxinos & Watson 6) y fijada en posición con cemento dental. La temperatura corporal se mantuvo a 36°C utilizando una almohadilla de calentamiento y se monitorizó por medio de un termómetro rectal digital. La sonda de microdiálisis se sometió a perfusión con fluido cerebrospinal artificial (aCSF) a $1 \mu\text{l}/\text{min}$ y los niveles extracelulares de monoaminas se determinaron por recogida de muestras de medio perfundido cada 15 min y se ensayaron utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica.

La fase móvil de la HPLC (EDTA 0,5 M, ácido monocloroacético 0,1 M de pH 3,1, 0,15 g/l de octil-sulfato de sodio, 5% de acetonitrilo, 0,7% de tetrahidrofurano) se bombeó a través del sistema a $70 \mu\text{l}/\text{min}$. Se separaron las monoaminas utilizando una columna capilar de fase inversa de 1×100 mm ODS 3 mm con bucle de inyección de 5 μl y se detectaron utilizando un detector electroquímico epsilon (BASi) con un electrodo vítreo de carbono ajustado a +650 mV frente a un electrodo de referencia Ag/AgCl. Se identificaron los picos de dializado por comparación de los tiempos de elución de pico con estándares de referencia y se cuantificaron de acuerdo con la medida del área de pico utilizando análisis de regresión lineal. Los límites de detección para 5HT y 5 HIAA se definieron como la cantidad de muestra que producía un área de pico doble del ruido de fondo por unidad de tiempo y eran aproximadamente 0,1 fmol/muestra en ambos casos.

Los estudios preliminares demostraron que después de la implantación de la sonda de diálisis, el nivel de 5HT era inicialmente alto debido a la liberación de plaquetas activadas por la coagulación de la sangre causada por la cirugía, pero dentro de 150 minutos de la terminación de la cirugía el nivel basal de 5HT era prácticamente constante. Por esta razón, las inyecciones se administraron rutinariamente a 150, 210 y 270 min después de la cirugía y se recogieron muestras de perfundido hasta 60 minutos después de la inyección final.

Para ensayo de rutina, se prepararon dos ratas, una de las cuales se utilizó para testar el extracto de orégano y la otra como muestra de control (vehículo). Debido a la variabilidad de la liberación basal de 5HT entre los ensayos y la variabilidad en la eficiencia de las sondas de microdiálisis para detectar 5HT en el fluido extracelular, estos datos se normalizaron de acuerdo con los dos valores obtenidos inmediatamente antes de la primera inyección (es decir las muestras en los momentos de 135 y 150 min). Los datos procedentes de estudios replicados para cada compuesto se expresan por tanto como % del nivel basal, como es la práctica normal para los estudios de microdiálisis. A fin de

determinar el efecto de cada dosis del extracto sobre la cantidad total de 5HT liberada, se estimó el área bajo la curva (AUC) utilizando el método del trapecio a lo largo del periodo de muestreo subsiguiente a cada administración de la dosis y se compararon los valores para el compuesto de ensayo/extracto con el control apropiado por ANOVA de dos vías (siendo los factores de test Tratamiento y Dosis) seguido por comparaciones post-hoc a dosis individuales utilizando el test t de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graphpad Prism.

El extracto de orégano 4 (10, 30 y 60 mg/kg, i.p.) se disolvió en solución salina que contenía 0,2% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulosa, mientras que el compuesto de referencia, fluoxetina (3, 10 y 30 mg/kg, i.p.) se disolvió en solución salina. Se investigaron adicionalmente 2 grupos de control, a los que se administraron solución salina que contenía 0,2% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulosa o solución salina sola, respectivamente.

Tabla 7: Efecto del Extracto de Orégano 1 sobre 5HT acumulativa en cada periodo de dosificación y expresado con relación al nivel basal de 5HT medido inmediatamente antes de la inyección de la primera dosis de compuesto. Las inyecciones se realizaron a los 150, 210 y 270 min después de la cirugía. La dosis de cada compuesto se expresa como mg/kg. Los datos se expresan como la media $\pm$ s.e.m. (n = 5-6). El análisis estadístico para cada dosis de compuesto se compara contra el periodo de tiempo correspondiente para el vehículo apropiado, sea solución salina o solución salina + 0,2% de hidroxipropilmetilcelulosa, utilizando el test t de Bonferroni y para cada compuesto globalmente por ANOVA de dos vías.

TRATAMIENTO (mg/kg)	Tiempo de inyección después de la cirugía (min)	5-HT LEVEL (% basal)		
		Media $\pm$ s.e.m.	Significación estadística	
Solución salina	150	84 $\pm$ 4		
	210	71 $\pm$ 9		
	270	65 $\pm$ 7		
0,2 % (p/v) hidroxipropilmetil celulosa en solución salina	150	80 $\pm$ 7		
	210	68 $\pm$ 4		
	270	67 $\pm$ 5		
Extracto de orégano 4 (10)	150	88 $\pm$ 3	†	
Extracto de orégano 4 (30)	210	82 $\pm$ 5	†	
Extracto de orégano 4 (60)	270	75 $\pm$ 5	†	
Fluoxetina (3)	150	85 $\pm$ 4	†††	
Fluoxetina (10)	210	131 $\pm$ 9	†††	***
Fluoxetina (30)	270	160 $\pm$ 7	†††	***
5 - 6 ratas por grupo ANOVA de dos vías: frente a grupo de control de solución salina, global; †p < 0,05, †††p < 0,001 Test post-hoc de Bonferroni: frente a grupo de control de solución salina; ***p < 0,001				

La estimación de la liberación acumulativa de 5HT medida como AUC en los 60 min después de la administración de cada dosis de tratamiento (Tabla 7) tal como se analizó por ANOVA de dos vías indicaba también un efecto global significativo del tratamiento con extracto de orégano 4 ($F(1,30) = 5,61$; $p < 0,05$).

Ejemplo 13: Inhibición de la absorción de dopamina por el extracto de orégano 1

Las acciones de varios neurotransmisores, con inclusión de dopamina, están reguladas por su absorción y aclaramiento rápidos de las juntas sinápticas por las proteínas de transporte de la membrana plasmática. El transportador de dopamina en las neuronas dopaminérgicas centrales es responsable de la recuperación de hasta 90% del neurotransmisor liberado. Los transportadores de monoaminas son dianas de afinidad alta para cierto número de agentes psicoactivos tales como cocaína, amfetamina, y antidepresivos. Estos agentes, por bloqueo de los transportadores y prevención consiguiente de la absorción neuronal, elevan los niveles de concentración de neurotransmisores extracelulares tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, contribuyendo a sus efectos de comportamiento y autonómicos.

Células CHO-Ki/hDAT, que expresaban el transportador de dopamina humano (hDAT) se extendieron en placas antes del ensayo. Las células (2×10^5 /ml) se incubaron con extracto de orégano y/o vehículo en tampón Tris-HEPES modificado de pH 7,1 a 25°C durante 20 minutos antes de la adición de [3 H]dopamina 50 nM durante 10 minutos. La señal específica se determinó en presencia de nomifensina 10 μ M. Las células se solubilizaron luego

con tampón de lisis SDS al 1%. La reducción de la absorción de [3 H]dopamina en 50% o más ($\geq 50\%$) con relación a los controles de vehículo indica una actividad inhibidora significativa. Los compuestos puros (nomifensina tимоquinol) se cribaron a 10 concentraciones hasta 100 μ M: 0,00316, 0,01, 0,0316, 0,1, 0,316, 1, 3,16, 10, 31,6 y 100 μ M. El extracto de orégano se cribó a 10 concentraciones hasta 100 μ g/ml: 0,00316, 0,01, 0,0316, 0,1, 0,316, 1, 3,16, 10, 31,6 y 100 μ g/ml. Estas mismas concentraciones se aplicaron simultáneamente a un grupo separado de células sin tratar y se evaluaron respecto a posible citotoxicidad inducida por el compuesto únicamente si se observaba una inhibición significativa de la absorción.

Tabla 8: Valores CI_{50} medidos para inhibición de la reabsorción de dopamina en células CHO-Ki transfectadas por el extracto de orégano 1, y su componente volátil tимоquinol. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m., donde la CI_{50} se expresa como μ M (o nM) para los compuestos individuales y como μ g/ml para el extracto de orégano.

Compuesto	CI_{50}
*Nomifensina	11 nM
Timoquinol	65,6 $\pm$ 1,2 μ M (n=2)*
Extracto de orégano 1	6,3 μ g/ml

* Indica el agente estándar de referencia utilizado.

Referencias:

Giros, et al. 1992 Mol. Pharmacol. 42: 383-390
 Pristupa, et al 1994 Mol. Pharmacol. 45:125-135

Ejemplo 14: Inhibición de la absorción de noradrenalina por el extracto de orégano

Las acciones de varios neurotransmisores, con inclusión de noradrenalina, están reguladas por su absorción y aclaramiento rápidos de las juntas sinápticas por las proteínas de transporte de la membrana plasmática. El transportador noradrenalina en las neuronas adrenérgicas centrales es responsable de la recuperación de hasta el 90% de neurotransmisor liberado. Los transportadores de monoaminas son dianas de alta afinidad para varios agentes psicoactivos tales como cocaína, anfetamina, y antidepresivos. Estos agentes, por bloqueo de los transportadores y prevención consiguiente de la absorción neuronal, elevan los niveles de concentración de neurotransmisores extracelulares tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, contribuyendo a sus efectos de comportamiento y autonómicos.

Células MDCK de riñón de perro que expresaban de manera estable el transportador de noradrenalina humana recombinante se extendieron en placas un día antes del ensayo. Las células (2×10^5 /ml) se preincubaron con el extracto de orégano y/o vehículo en tampón Tri-HEPES modificado de pH 7,1 a 25°C durante 20 minutos, después de lo cual se añadió [3 H]noradrenalina 25 nM para incubación durante 10 minutos. Las células contenidas en el pocillo se lavaron luego dos veces, se solubilizaron con tampón de lisis SDS al 1% y el lisado se sometió a recuento para determinar la absorción de [3 H]noradrenalina. La señal específica se determinó en presencia de desipramina 10 μ M. La reducción de la absorción de [3 H]noradrenalina en un 50% o más ($\geq 50\%$) con relación a los controles de vehículo indica una actividad inhibidora significativa. Los compuestos puros (desipramina) se escrutaron a 10 concentraciones hasta 100 μ M: 0,00316, 0,01, 0,0316, 0,1, 0,316, 1, 3,16, 10, 31,6 y 100 μ M. El extracto de orégano 1 se cribó a 10 concentraciones hasta 100 μ g/ml: 0,00316, 0,01, 0,0316, 0,1, 0,316, 1, 3,16, 10, 31,6 y 100 μ g/ml. Estas mismas concentraciones se aplicaron concurrentemente a un grupo separado de células sin tratar y se evaluaron respecto a posible citotoxicidad inducida por el compuesto únicamente si se observaba una inhibición significativa de la absorción.

Tabla 9: Valores CI_{50} medidos para inhibición de la reabsorción de noradrenalina en células MDCK transfectadas por el extracto de orégano 1. Los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m., donde la CI_{50} se expresa como nM para los compuestos individuales y como μ g/ml para el extracto de orégano.

Inhibidor	CI_{50}
*Desipramina	1,9 nM
Extracto de orégano	13,6 μ g/ml

* Indica el agente estándar de referencia utilizado.

Referencia:

Galli, et al. 1995. J. Exp. Biol. 198: 2197-2212

Ejemplo 15: Medida del nivel plasmático de carvacrol

Las concentraciones de carvacrol "libre" (aglicona) y carvacrol "total" (aglicona + forma conjugada) se determinaron en 64 muestras de plasma de rata. Cuatro ratas macho y cuatro ratas hembra recibieron una sola dosis de 800 mg de extracto de orégano 4 por kg de peso corporal por sonda esofágica oral, respectivamente. La solución de aplicación se preparó en aceite de maíz a una concentración de 200 mg de extracto por gramo de formulación. Se recogieron muestras de plasma a las 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 horas y 48 horas (terminal) después de la aplicación por sonda esofágica de al menos 3 animales macho y 3 animales hembra.

El análisis de las muestras se realizó con un sistema de cromatografía líquida - espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS), utilizando un sistema de cambio de columna para purificación y desalado en línea de las muestras.

Después de la adición del estándar interno (D2-timol) y la precipitación de la proteína (en el caso del analito "libre") o pre-digestión por β -glucuronidasa seguida por precipitación de la proteína (en el caso del analito "total"), las muestras se inyectaron en una columna de guarda Waters XTerra™ MS C18 utilizada como columna de purificación, y se transfirieron luego a una columna Waters XTerra™ MS C18. La detección se realizó utilizando espectrometría de masas en tándem en modo MRM.

Las muestras de calibración y control de calidad se prepararon en solución de suero de albúmina bovina al 5% y plasma humano. Se controló el comportamiento día a día con los resultados de las muestras de control de calidad (QC) dentro de cada lote analítico. El límite inferior de cuantificación se ajustó a 10,0 ng/ml para carvacrol "libre" y 20,0 ng/ml para carvacrol "total".

Se realizó un estudio cinético después de la administración oral del extracto de orégano 4 a las ratas macho y hembra.

El objetivo de este estudio analítico era la determinación de las concentraciones "libre" y "total" de carvacrol en las muestras de plasma de rata. Se analizaron con buen resultado un total de 64 muestras.

Se recogieron las muestras de plasma en momentos diferentes después de la aplicación de la sonda esofágica. La dosis administrada era 800 mg/kg de extracto de orégano 4 en aceite de maíz.

Las concentraciones de carvacrol "libre" medidas variaban desde indetectable a 50.100 ng/ml, y las concentraciones de carvacrol "total" desde indetectable a 50.000 ng/ml.

Tabla 10: Determinación de carvacrol libre y total en muestras de plasma de ratas hembra

Número ID	Nombre de la Muestra (Sexo / # Rata / Tiempo)			Carvacrol Libre (ng/ml)	Carvacrol Total (ng/ml)
1	F	1	0	*ND	*ND
2	F	1	0,5	30,9	2160
3	F	1	1	192	4220
4	F	1	2	64,3	829
5	F	1	3	128	3540
6	F	1	4	246	4480
7	F	1	6	135	4000
8	F	1	8	159	3810
9	F	1	24	127	5850
10	F	1	Terminal (48h)	*ND	< LOQ = 20,0 ng/ml
11	F	2	0	*ND	*ND
12	F	2	0,5	5120	14800
13	F	2	1	6050	18600
14	F	2	2	840	3550
15	F	2	3	228	1780
16	F	2	4	102	1160
17	F	2	6	91,9	1920

18	F	2	8	1630	6800
19	F	2	24	8,91	1530
20	F	2	Terminal (48h)	*ND	< LOQ = 20,0 ng/ml
21	F	3	0	*ND	*ND
22	F	3	0,5	4090	11000
23	F	3	1	3610	10000
24	F	3	2	1360	6470
25	F	3	3	174	1360
26	F	3	4	50,3	928
27	F	3	6	48,3	1140
28	F	3	8	< LOQ = 10,0 ng/ml	541
29	F	3	24	< LOQ = 10,0 ng/ml	1680
30	F	3	Terminal (48h)	*ND	< LOQ = 20,0 ng/ml
31	F	4	0	*ND	< LOQ = 20,0 ng/ml
32	F	4	0,5	50100	50000

ND* no detectada

LOQ* por debajo del límite inferior de cuantificación: LOQ* (carvacrol libre) = 10,0 ng/ml

LOQ* (carvacrol total) = 20,0 ng/ml

5 Tabla 11: Determinación de carvacrol libre y total en muestras de plasma de ratas macho

Número ID	Nombre de la Muestra (Sexo / # Rata / Tiempo)			Carvacrol Libre (ng/ml)	Carvacrol Total (ng/ml)
33	M	1	0	*ND	*ND
34	M	1	0,5	1320	18700
35	M	1	1	1820	25200
36	M	1	2	199	5590
37	M	t	3	51,5	3010
38	M	1	4	30,4	2750
39	M	1	6	83,4	6290
40	M	1	8	185	8610
41	M	1	24	68,1	8460
42	M	1	Terminal (48h)	*ND	< LOQ = 20,0 ng/ml
43	M	2	0	*ND	*ND
44	M	2	0,5	1530	11100
45	M	2	1	1790	13500
46	M	2	2	166	1260
47	M	2	3	58,4	665
48	M	2	4	40	1040
49	M	2	6	980	8080
50	M	2	8	156	2780

51	M	2	24	< LOQ = 10,0 ng/ml	1820
52	M	2	Terminal (48h)	*ND	< LOQ = 20,0 ng/ml
53	M	3	0	*ND	*ND
54	M	3	0,5	103	2310
55	M	3	1	1150	8550
56	M	3	2	584	6380
57	M	3	3	1580	11200
58	M	3	4	316	2900
59	M	3	6	100	2040
60	M	3	8	140	3630
61	M	3	24	< LOQ = 10,0 ng/ml	2750
62	M	3	Terminal (48h)	*ND	< LOQ = 20,0 ng/ml
63	M	4	0	*ND	*ND
64	M	4	0,5	55,9	4960

ND* no detectada

LOQ* por debajo del límite inferior de cuantificación: LOQ* (carvacrol libre) = 10,0 ng/ml

LOQ* (carvacrol total) = 20,0 ng/ml

5 **Ejemplo 16: Preparación de una cápsula de gelatina blanda**

Puede prepararse una cápsula de gelatina blanda que comprende los ingredientes siguientes:

Ingrediente	Cantidad por Cápsula
Extracto de Orégano	500 mg
Lecitina	50 mg
Aceite de soja	250 mg

Pueden administrarse dos cápsulas por día durante 3 meses a un adulto humano para el tratamiento de la distimia crónica leve.

10 **Ejemplo 17: Preparación de una cápsula de gelatina blanda**

Puede prepararse una cápsula de gelatina blanda que comprende los ingredientes siguientes:

Ingrediente	Cantidad por Cápsula
Extracto de Orégano	200 mg
Aceite de primavera de noche	300 mg
Vitamina B ₆	100 mg

Puede tomarse una cápsula por día, preferiblemente durante la segunda mitad del ciclo menstrual, durante 14 días para el tratamiento del síndrome premenstrual y el trastorno disfórico premenstrual.

15 **Ejemplo 18: Preparación de un refresco instantáneo aromatizado**

Ingrediente	Cantidad [g]
Extracto de Orégano	0,9
Sacarosa, polvo fino	922,7
Ácido ascórbico, polvo fino	2,0
Ácido cítrico, polvo anhidro	55,0
Esencia de limón	8,0
Citrato trisódico, polvo anhidro	6,0
Fosfato tricálcico	5,0
β-Caroteno 1% CWS de DNP AG, Kaiseraugst, Suiza	0,4
Cantidad total	1000

Se mezclan Todos los ingredientes y se tamizan a través de un tamiz de 500 µm. El polvo resultante se pone en un recipiente apropiado y se mezcla en un mezclador tubular durante al menos 20 minutos. Para preparación de la bebida, se mezclan 125 g del polvo mixto obtenido con agua suficiente para producir 1 litro de bebida.

El refresco listo para beber contiene aprox. 30 mg de extracto de orégano por servicio (250 ml). Como reforzador y para bienestar general se recomiendan 2 servicios por día (240 ml).

Ejemplo 19: Preparación de una barra de cereales reforzada no horneada

Ingrediente	Cantidad [g]
Extracto de Orégano	0,95
Azúcar	114,55
Agua	54,0
Sal	1,5
Jarabe de glucosa	130,0
Jarabe de azúcar invertido	95,0
Jarabe de sorbitol	35,0
Grasa de almendra de palma	60,0
Grasa de horneado	40,0
Lecitina	1,5
Aceite de palma hidrogenado	2,5
Manzana desecada y cortada	63,0
Copos de maíz	100,0
Granos de arroz crujientes	120,0
Granos de trigo crujientes	90,0
Avellana tostada	40,0
Leche desnatada en polvo	45,0
Esencia de manzana 74863-33	2,0
Ácido cítrico	5,0
Cantidad total	1000

El extracto de orégano se mezcla previamente con polvo de leche desnatada y se pone en un mezclador de bols planetario. Se añaden copos de maíz y granos crujientes de arroz, y se mezcla suavemente. Se añaden luego las manzanas secadas y cortadas. En una primera cazuela de cocción se mezclan azúcar, agua y sal en las cantidades arriba indicadas (solución 1). En una segunda cazuela de cocción se mezclan jarabes de glucosa, azúcar invertido y sorbitol en las cantidades arriba indicadas (solución 2). Una mixtura de manteca de horno, manteca de almendra de palma, lecitina y emulsionante es la fase de grasa. La solución 1 se calienta a 110°C. La solución 2 se calienta a 113°C y se enfría luego en un baño de agua fría. Después de ello se combinan las soluciones 1 y 2. La fase de grasa se funde a 75°C en un baño de agua. Se añade la fase de grasa a la mixtura combinada de las soluciones 1 y 2. Se añaden saborizante de manzana y ácido cítrico a la mezcla líquida azúcar-grasa. Se añade la masa líquida a los ingredientes secos y se mezcla bien en el mezclador de bols planetario. Se coloca la masa sobre una placa de mármol y se lamina al espesor deseado. Se enfría la masa a la temperatura ambiente y se corta en piezas. La barra de cereales no horneada contiene aprox. 25 mg de extracto de orégano por servicio (30 g). Para bienestar general y aporte de energía pueden tomarse 1-2 barras de cereales al día.

Ejemplo 20: Alimentación seca para perros que comprende extracto de orégano o sus componentes volátiles para alivio del estrés y revitalización del perro

Una dieta basal comercial para perros (v.g. Mera Dog "Brocken", MERA-Tiernahrung GmbH, Marienstraße 80-84, D-47625 Kevelaer-Wetten, Alemania) se pulveriza con una solución de extracto de orégano en una cantidad suficiente para administrar a un individuo una dosis diaria de 50 mg por kg de peso corporal, basada en el peso del extracto de orégano o el concentrado de sus componentes volátiles. La composición alimenticia se seca a fin de que contenga aproximadamente 90% en peso de materia seca. Para un perro medio de 10 kg de peso corporal que consume aprox. 200 g de alimentación seca por día, la comida para perro contiene aprox. 2500 mg de extracto de orégano o sus componentes volátiles/kg de alimento. Para perros de mayor peso, la mezcla de pienso se prepara análogamente.

Ejemplo 21: Comida húmeda para gatos que comprende extracto de orégano o sus componentes volátiles

Una dieta basal comercial para gatos (v.g. Happy Cat "Adult", Tierfeinnahrung, Südliche Hauptstraße 38, D-86517 Wehringen, Alemania) se mezcla con una solución de extracto de orégano o sus componentes volátiles en una cantidad suficiente para administrar a un individuo una dosis diaria de 100 mg por kg de peso corporal, basada en el peso del extracto de orégano seco o concentrado de sus componentes volátiles. Para un gato medio de 5 kg de peso corporal que consuma aprox. 400 g de comida húmeda, la comida para gatos contiene aprox. 1250 mg/kg de extracto de orégano. La composición de comida se seca de modo que contenga aproximadamente 90% en peso de materia seca.

Ejemplo 22: Tratamientos para perros que contienen extracto de orégano

Se pulverizan tratamientos comerciales para perro (v.g. Mera Dog "Biscuit", MERA-Tiernahrung GmbH, Marienstraße 80-84, D-47625 Kevelaer-Wetten, Alemania) con una solución de extracto de orégano o sus componentes volátiles en una cantidad suficiente para administrar a los tratamientos 5-50 mg por g de tratamiento, basado en el peso del extracto de orégano seco o el concentrado de sus componentes volátiles. La composición alimenticia se seca de modo que contenga una materia seca de aproximadamente 90% en peso.

Ejemplo 23: Tratamientos para gatos que contienen extracto de orégano

Se pulverizan tratamientos comerciales para gato (v.g. Whiskas Dentabits para gatos suministrado por Whiskas, Master-foods GmbH, Eitzer Str. 215, 27283 Verden/Aller, Alemania) con una solución de extracto de orégano o sus componentes volátiles en una cantidad suficiente para administrar a los tratamientos 5-50 mg por g de tratamiento, basado en el peso del extracto de orégano seco o el concentrado de sus componentes volátiles. La composición alimenticia se seca de modo que contenga una materia seca de aproximadamente 90% en peso.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición dietética o farmacéutica administrable por vía oral que comprende un extracto obtenido a partir de plantas del género *Origanum* por extracción con un disolvente o fluidos supercríticos, hidrodestilación para obtener aceites esenciales, o extracción/destilación con gases calientes en un proceso para:
5 mantenimiento o la mejora de la atención y la concentración, la memoria y la capacidad para recordar, capacidad de aprendizaje, procesamiento del lenguaje, resolución de problemas y funcionamiento intelectual,
 mejora de la memoria a corto plazo,
 aumento del estado de alerta mental,
 aumento de la capacidad de concentración y la agudeza mental,
10 intensificación de la vigilancia mental,
 reducción de la fatiga mental,
 refuerzo de la salud mental,
 mantenimiento de una función cognitiva equilibrada,
 regulación del hambre y la saciedad y la regulación de la actividad motora,
15 uso como antidepresivo, mejorador del humor/vitalidad, aliviador del estrés, reductor de la ansiedad, reductor de la tensión, reductor de la tristeza, reductor de la infelicidad/descontento, reductor de la irritabilidad, reductor de la disforia, reductor del comportamiento obsesivo-compulsivo, y/o relajante, o
 utilización como preventivo o normalizador de las alteraciones de los ritmos circadianos,
 con la salvedad de que la composición no incluye la combinación de orégano y extractos de *Crataegus*.
20 2. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto de orégano se obtiene de *Origanum vulgare*.

3. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la composición se selecciona del grupo constituido por productos lácteos, yogures, comida reforzada, barras de cereales, artículos de repostería, pasteles, galletas, suplementos dietéticos, tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas, formulaciones efervescentes, bebidas no alcohólicas, refrescos, bebidas para deportes, zumos de fruta, limonadas, bebidas
25 fundamentalmente acuosas, té, bebidas de base láctea, alimento líquido, sopas, y bebidas muesli.

4. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que es un uso veterinario.

5. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el extracto de orégano comprende al menos 30% en peso de carvacrol.

30 6. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el extracto de orégano comprende timoquinona en una cantidad comprendida en el intervalo de 0 a 30% en peso.

7. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el extracto de orégano comprende al menos 50% en peso de carvacrol y de 0 a 25% en peso de timoquinona.

8. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el extracto de
35 orégano contiene un componente volátil simple seleccionado del grupo constituido por carvacrol y timoquinona.

9. Uso de una composición dietética o farmacéutica que comprende un extracto obtenido a partir de plantas del género *Origanum* por extracción con un disolvente o fluidos supercríticos, hidrodestilación para la obtención de aceites esenciales, o extracción/destilación como gases calientes en un proceso para:
 utilización como inhibidor de la reabsorción de noradrenalina, inhibidor de la reabsorción de dopamina, y/o
40 reinhidores duales de la absorción de serotonina, noradrenalina y/o dopamina, o
 utilización como inhibidor triple de la absorción de noradrenalina, serotonina y/o dopamina, con la salvedad de que la composición no incluye la combinación de orégano y extracto de *Crataegus*.