

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 979**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/30** (2006.01)  
**A23L 1/00** (2006.01)  
**A23D 7/06** (2006.01)  
**C11B 5/00** (2006.01)  
**A61K 36/53** (2006.01)  
**A61K 31/201** (2006.01)  
**A61K 31/202** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2009 E 09761742 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2285242**

54 Título: **Combinaciones de extracto vegetal y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)**

30 Prioridad:

**10.06.2008 EP 08010506**  
**12.06.2008 EP 08010653**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.08.2013**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**GORALCZYK, REGINA;**  
**ETHEVE, STEPHANE;**  
**PRUDENCE, KEVIN y**  
**SCHWEIGERT, LONI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 420 979 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

Combinaciones de extracto vegetal y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la combinación de un extracto vegetal tal como un extracto de orégano, y un ácido poliinsaturado o un derivado tal como un éster etílico ("PUFA EE" – siglas en inglés) que exhibe una estabilidad incrementada. Además, también se refiere a composiciones dietéticas, nutracéuticas y farmacéuticas que contienen combinaciones de este tipo y/o sus componentes volátiles.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se sabe que muchos extractos vegetales tienen diversas propiedades médicas u otros beneficios para la salud. Por ejemplo, se sabe que el extracto de orégano tiene diversos beneficios para la mente/estado de ánimo tales como los descritos en el documento WO 08/017484, en el que se demuestra que el extracto de orégano es útil para mantener un comportamiento de estado de ánimo y mental equilibrado y puede actuar como un anti-depresor.

15

Sin embargo, con el tiempo se ha observado que los extractos vegetales solidifican parcialmente, especialmente si estos extractos están enriquecidos en contenidos lipófilos. Se expone la teoría de que sustancias ceras presentes en el extracto cristalizan y se separan por precipitación de la disolución. Ingredientes activos presentes en los extractos vegetales pueden ser ligados por estas ceras, con lo que así se vuelven menos biodisponibles y/o se degradan.

20

25

Se sabe también que ácidos grasos insaturados (PUFAs – siglas en inglés) de cadena larga tienen diversos beneficios sobre la salud. Numerosos estudios han demostrado que el consumo de PUFAs puede reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, cáncer, trastornos cardiovasculares, depresión y diversas enfermedades inflamatorias. Un problema con los PUFAs extraídos del aceite de pescado es que son fácilmente degradados en presencia de oxígeno, produciendo un sabor desagradable y un olor a rancio. Con el fin de estabilizarlos, se pueden utilizar diversos conservantes químicos. Sin embargo, los consumidores conscientes de su salud tienden a preferir ingredientes absolutamente naturales para su alimentación.

30

El extracto de orégano ha sido utilizado previamente como un conservante anti-oxidante. Economou et al 1991 *J. Am Oil Chem Soc* 68(2): 109-113 encontraron que un extracto de metanol de orégano era superior a otros extractos de hierbas para conservar la manteca. Kulisic et al 2004 *Food Chemistry* 85: 633-640 encontraron que el extracto de orégano era un antioxidante menos eficaz que el ácido ascórbico, pero equiparable a  $\alpha$ -tocoferol y el antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT). Véase también Sahin et al 2004 *Food Control* 15: 549-557 en que se sometió a ensayo un aceite esencial hidrodestilado de orégano que tenía cariofileno y espatulenol, germacreno-D y  $\alpha$ -terpineol en calidad de sus constituyentes principales, al igual que un extracto de metanol. Ambos tenían actividades antimicrobianas y eran anti-oxidantes. Botsoglou et al 2002 *Meat Science* 62: 259-265 encontraron que cuando pollos eran alimentados con una dieta que incluía 100 mg de aceite esencial de orégano/kg de pienso durante 38 días, existía una menor oxidación de lípidos en la carne cruda y cocida, a pesar de que se obtuvieron resultados mejores con un suplemento dietético de acetato de  $\alpha$ -tocoferol.

35

40

El documento FR-A-2513262 (US 4.525.306) describe cápsulas que contienen aceites y grasas a las que se añade un antioxidante de hierbas en una cantidad de 0,01 a 10%. También están presentes un fosfolípido y un alcohol para mejorar el efecto anti-oxidación.

45

El uso de extractos de orégano, específicamente para conservar PUFAs, también ha sido investigado con resultados contradictorios. Por ejemplo, Bhale et al 2007 *J. Food Sci.* 72(9): C504-508 compararon la capacidad de un extracto de metanol de orégano con un extracto de romero para inhibir la oxidación. Se encontró que el extracto de orégano era superior al extracto de romero, pero solamente a temperaturas elevadas y a una concentración mayor (en torno al 5%). A temperaturas bajas y a menores concentraciones, el extracto de romero era superior. Los PUFAs sometidos a ensayo en esta referencia procedían de aceite de sábalo atlántico. Se sabe que el aceite de sábalo atlántico contiene sólo aproximadamente 30% de ácidos grasos omega-3 de cadena larga insaturados tales como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA).

50

Dado que el contenido en EPA de PUFAs parece estar asociado con un cierto número de sus beneficios para la

salud, sería deseable producir una formulación de PUFAs y extractos vegetales en la que tanto los PUFAs como los extractos vegetales fuesen estables y en la que ambos estuvieran presentes en cantidades suficientes para ser bioactivos.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una combinación estable de PUFAs y un extracto de orégano que exhibe una estabilidad al almacenamiento incrementada, en donde la concentración de los PUFAs es de al menos el 8%, y la concentración de extracto de orégano es de al menos el 15%.

10 La combinación es una mezcla de extracto de orégano y ésteres etílicos de PUFA, en donde los dos componentes están presentes en concentraciones elevadas, es decir al menos 8% (en peso) para los ésteres etílicos de PUFA y al menos 15% (en peso) para el extracto de orégano. Esta combinación exhibe una estabilidad sorprendente y tiene una vida útil prolongada.

15 Esta invención se refiere también al uso de la combinación de extractos de orégano y/o sus componentes volátiles y ésteres etílicos de ácidos grasos poliinsaturados (aquí en lo que sigue "PUFA EE/extractos de orégano") para la fabricación de diversos suplementos nutricéuticos, dietéticos y composiciones farmacéuticas. En realizaciones preferidas, la PUFA EE/extractos de orégano está presente en una cápsula.

20 La cantidad (en peso) de extracto de orégano en la composición es de al menos 15% y puede ampliarse adicionalmente hasta al menos 25% o hasta al menos 50% sin exhibir efectos pro-oxidantes algunos que se observan típicamente en altas concentraciones de antioxidantes convencionales.

25 BREVES DESCRIPCIONES DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 muestra la oxidación de aceite ROPUFA '75' n-3 EE en diversas concentraciones de extracto de orégano a lo largo del tiempo utilizando un ensayo de oxidación acelerada que se basa en la oxidación con oxígeno bajo presión. El consumo de oxígeno se determina mediante la caída de presión. El eje X es el número de horas; el eje Y es la presión.

La FIGURA 2 muestra que la oxidación de aceite ROPUFA '75' n-3 EE (0% de extracto de orégano) es más rápida cuando es puro que cuando se mezcla con extractos de orégano a concentraciones diferentes.

35 La FIGURA 3 muestra un vial de un extracto de orégano que exhibe la formación de cera.

A diferencia de algunos antioxidantes convencionales tales como ácido ascórbico, los cuales a concentraciones elevadas pueden exhibir una actividad pro-oxidación, el extracto de orégano conserva sus capacidades anti-oxidantes a altas concentraciones. Además, se piensa que PUFA EEs estabilizan el aceite de orégano a lo largo de un período prolongado para evitar una precipitación cética que hasta ahora ha sido observada

PUFAs

45 Los PUFAs que se pueden utilizar en esta invención incluyen también derivados de PUFA tales como ésteres. Otros derivados incluyen ésteres palmíticos u otros ésteres comestibles. Un derivado de PUFA particularmente preferido es éster etílico de PUFA (PUFA EE). También están incluidos en esta invención triglicéridos de PUFA, preferiblemente un mínimo de 25% de PUFA, más preferiblemente 30% de PUFA, en especial aquellos que son ricos en EPA.

50 Los PUFAs que se utilizan preferiblemente en esta invención pueden proceder de cualquier fuente, con la condición de cuando el extracto de orégano es el extracto vegetal, los PUFAs no proceden de aceite de sábalo atlántico. Este aceite puede incluir aceites de animales marinos tales como atún, salmón, calamar, camarón antártico (y especialmente excluyen aceite de sábalo atlántico *Brevoortia sp.* y *Ethmidium sp.*), pero también puede incluir otras fuentes de ácidos grasos n-3 de cadena larga tales como los producidos de forma natural o a través de organismos genéticamente modificados tales como plantas, bacterias, hongos (especialmente levaduras) o algas.

En realizaciones preferidas, los PUFAs de esta invención contienen una elevada cantidad, es decir, al menos 30%, y preferiblemente mayor, de ácido eicosapentaenoico o su éster etílico, ácido docosahexaenoico o su éster etílico y mezclas de los mismos. PUFA EEs de este tipo están comercialmente disponibles tales como la mezcla

comercializada por DSM Nutritional Products Ltd., Basilea, Suiza bajo la marca registrada ROPUFA 75. PUFAs comercialmente disponibles contienen a menudo una pequeña cantidad de extracto de romero presente en calidad de un antioxidante. De acuerdo con esta invención, se ha encontrado que no existe efecto adverso alguno en combinar los extractos vegetales de esta invención con la cantidad mínima de extracto de romero presente en los PUFAs.

#### Extractos vegetales y sus componentes volátiles

El extracto vegetal utilizado en esta invención es orégano.

“Extracto”, tal como se utiliza en esta memoria, quiere dar a entender que comprende una amplia categoría de material de procedencia vegetal. Por ejemplo, un extracto puede ser cualquier tipo de extracto que sea adecuado para uso alimentario tal como extractos acuosos, extractos de vapor de agua, aceites vegetales, extractos de disolventes orgánicos que están admitidos en los alimentos (en particular extractos de etanol, extractos de propilenglicol, extractos de acetato de etilo y dióxido de carbono fluido supercrítico (SF CO<sub>2</sub>), etc.). “Extracto” incluye también destilados, concentrados y otras mezclas de ingredientes activos vegetales.

Se sabe que las especies de orégano varían ampliamente en su constitución química. Véase, por ejemplo, Vokou et al 1993 *Biochemical Systematics and Ecology* 21(2): 287-295 que describe la variación de aceite esencial en *O. vulgare* ssp. *hirtum* criado en veintitrés localidades. Debido a esta gran variabilidad, la fuente botánica del extracto no es tan importante para esta invención como lo es el contenido en productos químicos del extracto. Así, extractos de orégano pueden ser de cualquier origen de cualquier planta (planta entera o partes de la misma) que pertenecen al género *Origanum*, siempre que contenga carvacrol y timoquinona junto con otros componentes volátiles a una concentración suficiente como para ser eficaz, según se detalla más abajo.

Ejemplos de plantas del género *Origanum* que se prefieren para uso en esta invención son *O. vulgare* y sus subespecies y/u *O. minutiflorum*. Otras especies que se pueden utilizar son: *O. majorana*, *O. dictamus*, *O. creticum*, *O. x majoricum*, *O. aureum*, *O. compactus*, *O. syriaca*, *O. tythantum*, *O. heracleoticum*, *O. smyrmaeum*, *O. virens* y *O. hirtum*.

Se prefieren extractos que contienen una elevada proporción de al menos uno de sus componentes volátiles. Más preferidos son extractos de orégano que contienen al menos un total de 65% en peso de componentes volátiles, tal como se han mencionado antes, basado en el peso total del extracto. Extractos completamente naturales se pueden fortalecer con al menos un componente volátil específico de los mismos.

Extractos de orégano preferidos en el contexto de la presente invención son aquellos en donde:

- el extracto de orégano comprende al menos 30% en peso de carvacrol,
- el extracto de orégano comprende al menos 50% en peso de carvacrol, y
- más preferiblemente, en donde el extracto de orégano comprende al menos 55% en peso de carvacrol, basado en el peso del extracto de orégano.

También se prefieren extractos de orégano que comprenden timoquinona en una cantidad 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,
- más preferiblemente, en donde el extracto de orégano comprende al menos 4% en peso de timoquinona,
- lo más preferiblemente, en donde el extracto de orégano comprende timoquinona en un intervalo de 4 a 30% en peso, basado en el peso del extracto de orégano.

Otros extractos de orégano preferidos son aquellos en donde el extracto de orégano comprende:

- al menos 50% en peso de carvacrol y de 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, o
- en donde el extracto de orégano comprende al menos 55% en peso de carvacrol y al menos 4% en peso de timoquinona, basado en el peso del extracto de orégano.

5 Extractos de orégano preferidos se obtienen mediante una extracción con el uso de SF CO<sub>2</sub>. Extractos de este tipo tienen la ventaja de que no deberían contener residuos de disolventes orgánicos algunos, proteínas algunas ni metales pesados algunos. Si se desea, una extracción con dióxido de carbono supercrítico puede ser seguida por una segunda etapa de extracción CO<sub>2</sub> fluido supercrítico para reducir las ceras y enriquecer selectivamente los componentes volátiles.

10 Los extractos de orégano o sus componentes volátiles pueden ser de origen natural o sintético o mixto (a saber, parcialmente natural, parcialmente sintético), es decir, los componentes activos se pueden obtener mediante extracción de plantas y fraccionamiento, o se pueden sintetizar químicamente, si se desea, mezclados junto con extractos vegetales en cualesquiera cantidades deseadas. Se pueden preparar y utilizar en cualesquiera purezas y concentraciones deseadas, p. ej. en forma de disoluciones que los contienen en concentraciones tan bajas como, p. ej., 10% (p/p) o menores, o hasta cerca del 100% (p/p).

### 15 PUFAs

Los PUFAs de esta invención contienen preferiblemente una elevada concentración de derivados de ácidos grasos n-3 poliinsaturados; preferiblemente, están en forma de ésteres; preferiblemente en forma de éster etílico del ácido eicosapentaenoico (EPA EE) y éster etílico del ácido docosahexaenoico (DHA EE). En realizaciones preferidas, los PUFAs están presentes en una concentración de al menos 60% en peso en el preparado, más preferiblemente en una concentración de al menos 70% en peso; y lo más preferiblemente en una cantidad de al menos 75% en peso. El preparado de PUFA puede contener aceites de soporte adicionales según se requiera.

25 Composiciones de PUFA EEs son altamente vulnerables a la oxidación y, a menudo, se suministran tratadas con anti-oxidantes tales como tocoferoles, ácido cítrico, extracto de romero y similares. Estos componentes también pueden estar presentes en las mezclas de esta invención. La capacidad del extracto de orégano de estabilizar PUFAs y, en especial, EPA, se observa independientemente de la presencia o ausencia de estos otros anti-oxidantes.

30 Sorprendentemente, se ha encontrado que el extracto de orégano puede estabilizar específicamente EPA EE. Esto es importante, ya que muchos de los beneficios para la salud de PUFAs proceden de la presencia de EPA (o de su derivado, EPA EE). Así, en realizaciones preferidas de esta invención, EPA o un derivado tal como EPA EE constituye un porcentaje más elevado de la mezcla de PUFA que otros PUFAs tales como DHA (o DHA EE).

### 35 COMBINACIONES

En realizaciones preferidas de esta invención, el extracto de orégano y PUFA EEs están presentes en la relación (en % en peso) de 15:85 a 92:8. En realizaciones más preferidas la relación de orégano es al menos el 8% de la mezcla, preferiblemente al menos aproximadamente el 25%, y puede ser de al menos aproximadamente el 50%. Estas relaciones proporcionan dos aspectos de esta invención: existe estabilidad sin efecto pro-oxidativo alguno observado y, en segundo lugar, tanto los PUFA EEs como el extracto de orégano están presentes en concentraciones suficientemente elevadas, de manera que ambos ejercen efectos bioactivos sobre la persona que consume la mezcla.

45 Algunos anti-oxidantes tales como vitamina E pueden convertirse en pro-oxidantes cuando están presentes en una cantidad elevada. Véase, por ejemplo, Setiadi et al 2003 *Teochem* 620(2-3): 93-106.

50 Las composiciones de la presente invención están preferiblemente en forma de cápsulas. Las cápsulas pueden ser una cápsula de gelatina blanda o una cápsula con envuelta dura sellada. La cápsula puede contener la combinación PUFA EE/extracto de orégano. Las propias cápsulas pueden estar hechas por cualquier método convencional y, habitualmente, contendrán, p. ej., una matriz de gelatina (de pescado, cerdo, aves de granja, vacas), una matriz vegetal basada en materiales brutos celulósicos (p. ej. hidroxipropilmetilcelulosa) o un material de almidón o derivado de almidón.

55 Además de la PUFA EE/extracto de orégano, las cápsulas de acuerdo con la presente invención pueden contener, adicionalmente, aditivos farmacéuticos/nutricéuticos convencionales y adyuvantes, excipientes o diluyentes que incluyen, pero no se limitan a: gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, ligninsulfonato, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes saboreantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas, y similares.

Generalmente, la cápsula contendrá un aceite para ajustar el volumen de llenado al tamaño de la cápsula, y puede incluir un excipiente para aumentar la viscosidad, ya que PUFA EE tiende a tener una viscosidad más bien baja. Si está presente un agente que incrementa la viscosidad, éste se puede seleccionar de cualquiera de los agentes de aumento de la viscosidad conocidos tales como cera de abejas, ceras minerales, ceras basadas en vegetales, sílice coloidal o lecitina.

Típicamente, una dosis diaria beneficiosa para un ser humano de extracto de orégano es de 10 mg a 300 mg. Ésta se puede ingerir en una dosis única o, debido a la farmacocinética del extracto de orégano, puede ser aconsejable ingerir dosis parciales varias veces al día. Para alguien que ingiera cápsulas dos veces al día, la cantidad total de orégano suministrado en cada intervalo de dosificación debería, así, oscilar entre 5 mg y 200 mg. Si se hubieran de consumir un total de seis cápsulas al día (3 cápsulas dos veces al día), entonces cada una de las cápsulas debería contener aproximadamente 1,5 a 50 mg de orégano. Basado en esto, un experto ordinario en la técnica puede determinar igualmente la cantidad apropiada para consumir 4, 2 o una sola cápsula al día. Preferiblemente, la dosis será de 30, 60, 120 ó 180 mg, o ~ 3,5%, 7%, 13% o 19% en peso de una dosis.

Para PUFAs la cantidad por cápsula debería oscilar entre 50-1000 mg, esforzándose por una ingesta diaria de al menos 1000 a 6000 mg al día de triglicéridos totales (incluidas fuentes dietéticas no encapsuladas). Para formulaciones con alto contenido en PUFA EE n-3, la cantidad equivalente (es decir, una concentración mayor de triglicéridos que la que se produce de forma natural), las cantidades se pueden ajustar hacia abajo de manera correspondiente, y se puede reducir el tamaño/cantidad de las cápsulas. Una ventaja adicional a las formulaciones concentradas es que son más fácilmente digeridas y dejan un menor sabor de boca a pescado.

Una cápsula preferida de esta invención contendrá la mezcla de 60 mg de extracto de orégano y 750 mg de PUFA EEs. Esta mezcla constituirá entre 50-60% en peso del contenido total de la cápsula. El 50-40% restante incluirá otros excipientes y cargas, incluidos uno o más ajustadores de la viscosidad tales como glicerol, dióxido de silicio, lecitina o cera(s).

### Ejemplos

#### **EJEMPLO 1**

##### **Preparación de materiales**

##### Extracto de orégano

Las hojas secas y flores de *Origanum vulgare* u *O. minutiflorum* se extrajeron mediante extracción con fluido supercrítico con dióxido de carbono natural. El extracto se obtuvo de Flavex Naturextrakte GmbH.

El extracto es un líquido pardo-rojizo con un sabor característico. El extracto utilizado (RV0141-73) fue analizado por Flavex con el sistema GC/MS con el método del área pico del 100% y contiene 85,3% de aceite esencial.

Los componentes principales eran: carvacrol fenólico de área pico del 79,9% y timoquinona de área pico del 6,44%. Otros compuestos presentes son cimeno de área pico del 2,4%, linalool de área pico del 2,8%, borneol de área pico del 2,3%, cariofileno de área pico del 1,9% y una pequeña cantidad de limoneno, 4-terpineol y timol.

El aceite ROPUFA '75' n-3 EE (UT07050003) es un líquido oleoso amarillento y es producido por DSM Nutritional Products GmbH. Contiene al menos 75% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-3 en forma de ésteres etílicos, predominantemente en forma del ácido eicosapentaenoico (EPA EE) y ácido docosahexaenoico (DHA EE). Es tratado y estabilizado con palmitato de ascorbilo, tocoferoles, ácido cítrico y contiene extracto de romero (aproximadamente 1000 ppm).

#### **EJEMPLO 2**

##### **ESTABILIDAD OXIDATIVA**

La estabilidad relativa de muestras de disoluciones de lípidos frente a la oxidación se midió en un ensayo de oxidación acelerada utilizando el aparato Oxipres. Las condiciones iniciales se establecieron a 70°C y 5-6 bar. El aparato ML OXIPRES™ (Mikrolab Aarhus A/S, Dinamarca) es una modificación del método de la bomba que se basa en la oxidación con oxígeno bajo presión. Véase, Gearhart 1957, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 34: 427 y Stuckey et al *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 35: 581 y Blankenship et al 1973 *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 50: 377-318. El ensayo se acelera cuando se lleva a cabo a presión elevada. El consumo de oxígeno se determina por la caída de presión en

la bomba durante el experimento.

5 El primer experimento se realizó con cinco muestras de disolución: ensayo en blanco, aceite ROPUFA '75' n-3 EE mezclado con extracto de orégano a diferentes concentraciones (0%, 8%, 25% y 100%). Durante este experimento no se realizó análisis cuantitativo específico alguno.

10 El segundo experimento se realizó con seis disoluciones de muestra: aceite ROPUFA '75' n-3 EE mezclado con extracto de orégano a diferentes concentraciones (0%, 4%, 8%, 25%, 50% y 100%). Para este experimento se realizaron análisis cuantitativos y cualitativos adicionales a T0 y T final para cada una de las muestras: cuantificación de timoquinona, carvacrol, palmitato de ascorbilo, tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) y PUFA (en forma del éster metílico).

#### Resultados

15 La FIGURA 1 demuestra que la oxidación de aceite ROPUFA '75' n-3 EE puro (0% de extracto de orégano) es más rápida que con las muestras en disolución mixtas a diferentes concentraciones de extracto de orégano (8% y 25%). Al cabo de aproximadamente 65 horas, la capacidad de inhibición de la oxidación de extractos de orégano aumenta significativamente con la concentración creciente de orégano. La curva para el extracto de orégano puro (100%) no disminuye significativamente en comparación con la muestra del ensayo en blanco, demostrando así  
20 que el extracto de orégano puro es estable.

25 En concordancia con el primer experimento, la FIGURA 2 demuestra que la oxidación de aceite ROPUFA '75' n-3 EE puro (0% de extracto de orégano) es más rápida que con las muestras en disolución mixtas a diferentes concentraciones de extracto de orégano (4%, 8%, 25% y 50%). Al cabo de aproximadamente 70 horas, la capacidad de inhibición de oxidación del extracto de orégano aumentaba significativamente con la concentración creciente de extracto de orégano. La curva de extracto de orégano puro (100%) disminuye de forma no significativa, indicando que el extracto de orégano puro es estable.

### EJEMPLO 3

30

#### Análisis de PUFA

35 La identificación de EPA, DHA y DPA se realizó comparando los tiempos de retención con patrones de referencia auténticos. La cuantificación se realizó aplicando un calibre patrón interno con éster metílico del ácido tricosenoico.

40 En la Tabla 1 que figura a continuación, se muestran los resultados de las muestras en disolución antes y después del experimento con Oxipres. Las concentraciones determinadas ( $C_{inicial}$ ) de EPA EE, DHA EE, DPA EE y PUFA total para cada una de las muestras en disolución, analizadas antes del experimento con Oxipres, se utilizan como un valor de referencia para evaluar la estabilidad de compuestos PUFA después del experimento con Oxipres. A partir de los resultados después del experimento con Oxipres ( $C_{final}$ ) se calcula el porcentaje de PUFAs retenidos (expresado como % de precisión =  $C_{final}/C_{inicial} * 100$ ) frente al valor de referencia para cada una de las muestras en disolución para observar la estabilidad de PUFAs.

**Tabla 1** Análisis de PUFA – aceite ROPUFA ‘75’ n-3 EE mezclado con extracto de orégano a diferentes concentraciones. El % de precisión de un proceso analítico expresa la proximidad de concordancia entre el valor encontrado ( $C_{final}$ ) y un valor de referencia aceptado ( $C_{inicial}$ )

5

|   | <b>EPA</b><br>% de precisión | <b>DHA</b><br>% de precisión | <b>DPA</b><br>% de precisión | <b>PUFA total</b><br>% de precisión |
|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Muestra 1</b><br>100% de extracto de orégano                           | <LOQ                         | <LOQ                         | <LOQ                         | <b>&lt;LOQ</b>                      |
| <b>Muestra 2</b><br>50% de extracto de orégano                            | 55,2                         | 49,0                         | 54,5                         | <b>52,9</b>                         |
| <b>Muestra 3</b><br>25% de extracto de orégano                            | 53,4                         | 47,8                         | 53,1                         | <b>51,4</b>                         |
| <b>Muestra 4</b><br>8% de extracto de orégano<br>No parte de la invención | 53,5                         | 47,1                         | 51,6                         | <b>51,1</b>                         |
| <b>Muestra 5</b><br>4% de extracto de orégano                             | 46,7                         | 43,6                         | 49,4                         | <b>45,8</b>                         |
| <b>Muestra 6</b><br>0% de extracto de orégano                             | 41,6                         | 41,4                         | 65,6                         | <b>43,5</b>                         |

En la tabla anterior, “EPA” se refiere a EPA EE, “DHA” se refiere a DHA EE y “DPA” se refiere a DPA EE.

10 El extracto de orégano demostró capacidades significativas para retardar la oxidación PUFA total. En la muestra en disolución de aceite ROPUFA ‘75’ n-3 EE puro, el PUFA total disminuyó hasta 43,5% de la concentración inicial. La capacidad de la inhibición de la oxidación del extracto de orégano aumentó la estabilidad de PUFA total de manera significativa con concentraciones crecientes de extracto de orégano (4%, 8%, 25% y 50%) en las diferentes muestras en disolución, respectivamente, del 45,8%, 51,1%, 51,4% y 52,9% del valor inicial.

15 Los EPA EE, DHA EE y DPA EE retenidos en el aceite ROPUFA ‘75’ n-3 EE puro disminuyeron a 41,6%, 41,4% y 65,6%, respectivamente, de la concentración inicial. EPA EE (329 mg/g) es el componente principal del aceite ROPUFA ‘75’ n-3 EE. EPA EE tiene una mayor estabilidad incrementada con concentraciones crecientes de extracto de orégano (4%, 8%, 25% y 50%) en las diferentes muestras en disolución, respectivamente, del 46,7%, 53,5%, 53,4% y 55,2% del valor inicial.

20 DHA EE (210 mg/g) es el segundo componente principal del aceite ROPUFA ‘75’ n-3 EE. DHA EE tiene un elevado incremento de la estabilidad con concentraciones crecientes de extracto de orégano (4%, 8%, 25% y 50%) en las diferentes muestras en disolución, respectivamente, del 43,6%, 47,1%, 47,8% y 49,0% del valor inicial.

25 DPA EE (47,7 mg/g) es uno de los componentes menores del aceite ROPUFA ‘75’ n-3 EE. DPA EE muestra también una capacidad de inhibición de la oxidación incrementada del extracto de orégano con concentraciones crecientes de extracto de orégano (4%, 8%, 25% y 50%) en las diferentes muestras en disolución, respectivamente, del 43,6%, 47,1%, 47,8% y 49,0% del valor inicial.

30

#### EJEMPLO 4

##### Cápsula de gelatina blanda

35 Cápsulas de gelatina blanda oblongas, tamaño 16 (volumen = 0,985) se preparan de acuerdo con tecnologías comúnmente conocidas y que contienen la siguiente composición:

| <b>Ingrediente</b>          | <b>Cantidad por cápsula</b> |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Extracto de orégano         | 180 mg                      |
| PUFA EE                     | 750 mg                      |
| SiO <sub>2</sub> , coloidal | 30 mg                       |
| Aceite de palma             | 50 mg                       |

Cápsulas similares a las anteriores también se pueden preparar utilizando 30, 60 ó 120 mg de extracto de orégano. Preferiblemente, estas cápsulas se toman una o dos veces al día.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Una composición estable que comprende un extracto de orégano y un ácido graso poliinsaturado (PUFA) o derivado de un PUFA, en donde el extracto de orégano está presente en una cantidad de al menos 15% en peso, y el PUFA o derivado del PUFA comprende al menos 30% de ácido eicosapentaenoico o su éster etílico, ácido docosahexaenoico o su éster etílico, y mezclas de los mismos.
- 2.- La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en que el PUFA es un éster etílico del PUFA.
- 10 3.- La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el extracto de orégano se obtiene de plantas del género *Origanum* mediante extracción con dióxido de carbono líquido bajo condiciones supercríticas.
- 4.- La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la PUFA EE/extracto de orégano se obtiene de *Origanum vulgare* y/u *Origanum minutiflorum*.
- 15 5.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el extracto de orégano contiene una elevada porción de uno de los componentes volátiles.
- 20 6.- La composición de la reivindicación 5, en donde los componentes volátiles comprenden carvacrol, timol, timoquinona y timoquinol.
- 7.- Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es una cápsula.
- 25 8.- Una cápsula de acuerdo con la reivindicación 7 que contiene al menos 3,5% en peso de extracto de orégano.
- 9.- Un alimento que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

FIGURA 1

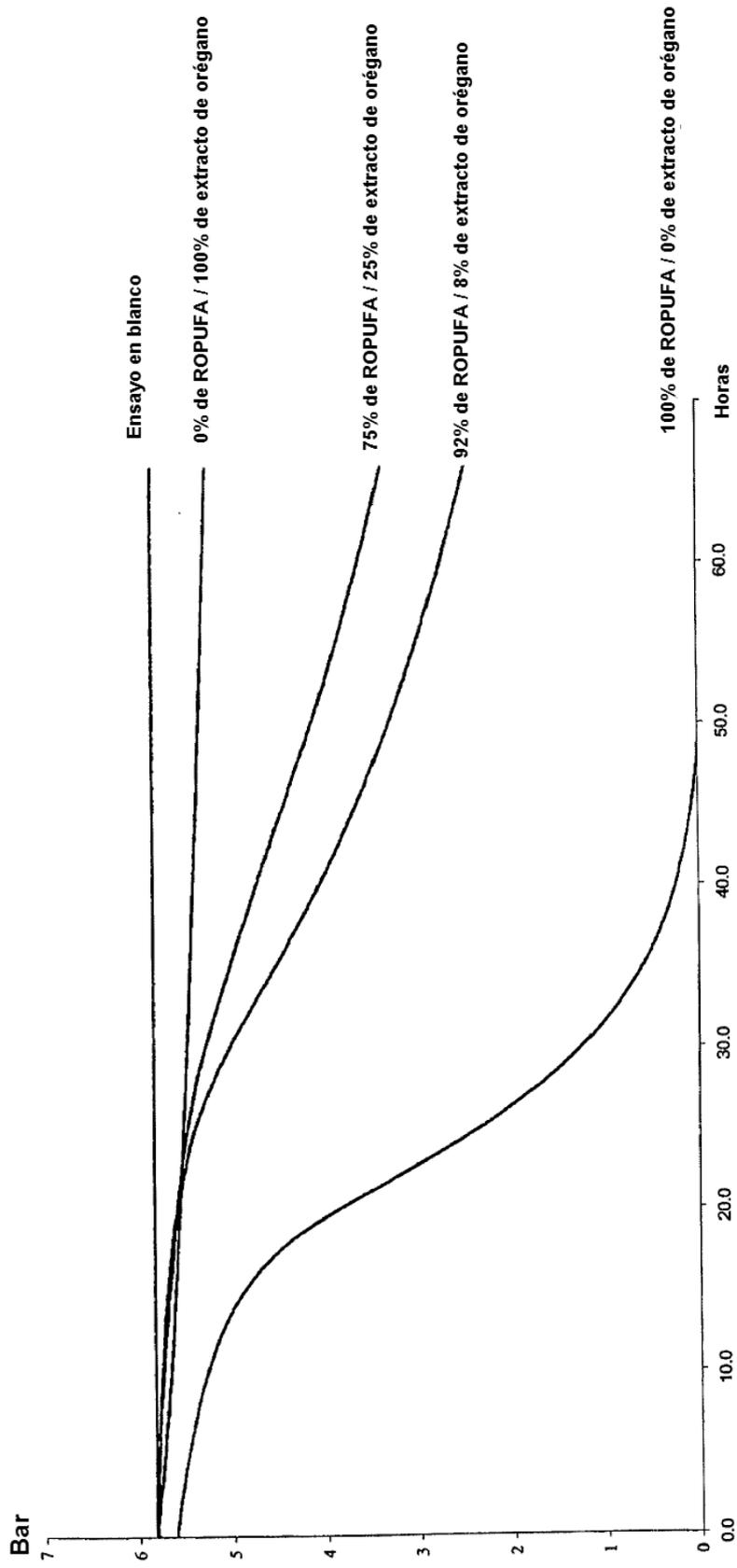


FIGURA 2

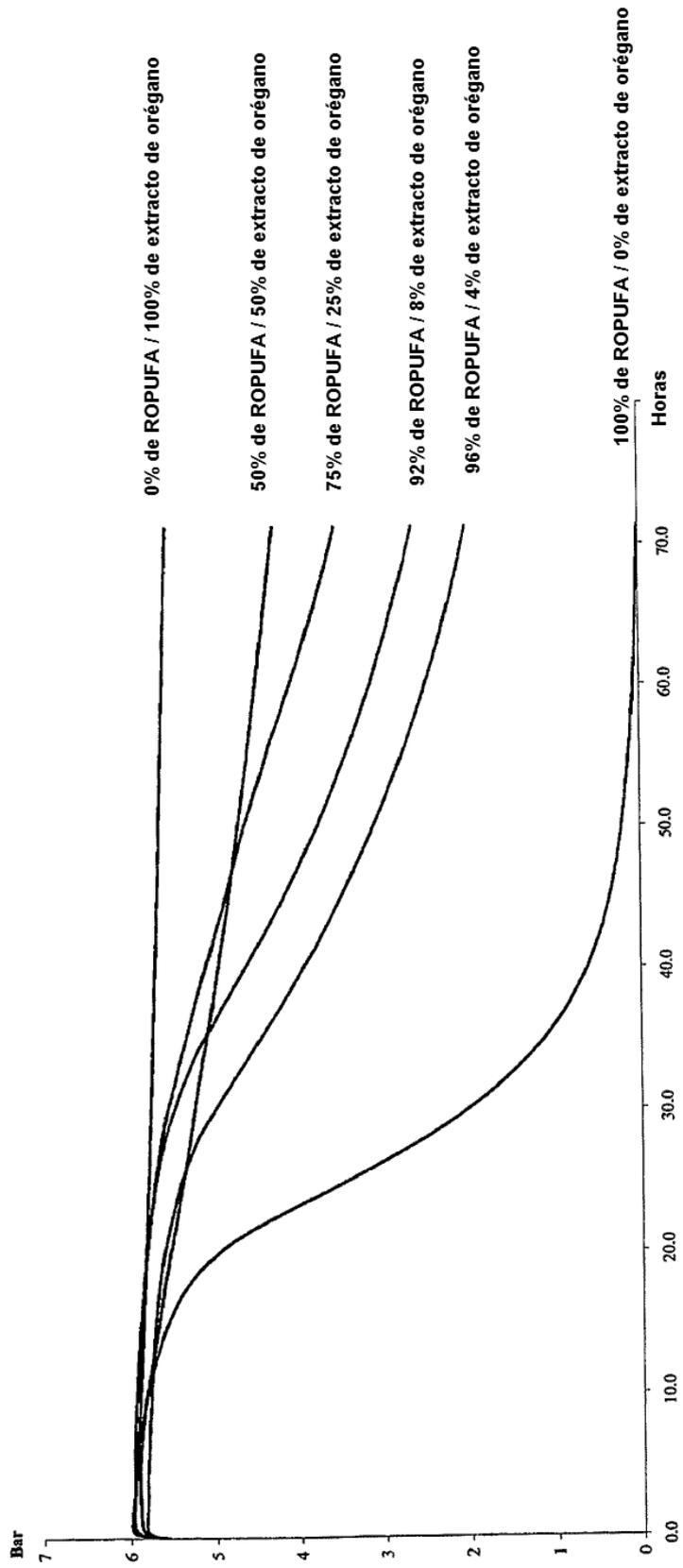


FIGURA 3

