

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 947 500**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7034 (2006.01)
A61K 36/23 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)
A61K 36/54 (2006.01)
A61K 36/61 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014 PCT/EP2014/068992**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15032922**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014 E 14761618 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2023 EP 3041579**

54 Título: **Composiciones orales antiparasitarias**

30 Prioridad:

06.09.2013 EP 13306227

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

10.08.2023

73 Titular/es:

**MARS, INCORPORATED (100.0%)
6885 Elm Street
McLean, VA 22101, US**

72 Inventor/es:

**FEUGIER, ALEXANDRE y
LEROUXEL, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 947 500 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones orales antiparasíticas

5 Las referencias a los métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente divulgación para su uso en un método de tratamiento del cuerpo del animal por terapia.

10 La presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento oral de animales contra parásitos que son *Neospora caninum* o *Toxoplasma gondii*, en donde la composición es:

- una composición que comprende un aceite esencial del género *Cinnamomum* y un aceite esencial del género *Eugenia*
- 15 • una composición que comprende una combinación de aceites esenciales que consiste en un aceite esencial del género *Cinnamomum* y un aceite esencial del género *Origanum*,
- una composición que comprende una combinación de aceites esenciales que consiste en un aceite esencial del género *Cinnamomum* y un aceite esencial de *Thymus*, o
- 20 • una composición que comprende un aceite esencial del género *Eugenia* y un aceite esencial del género *Origanum*.

25 Una composición que no es parte de la invención comprende uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol y/o eugenol, un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Eucalyptus* o una fuente de saponina. También se refiere a un método, que no es parte de la invención, para prevenir o tratar infección parasítica en un animal, comprendiendo el método administrar por vía oral a dicho animal una composición que comprende uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol y/o eugenol, un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Eucalyptus* o una fuente de saponina.

30 La infección parasítica puede afectar a todos los animales. En particular, los perros y los gatos son los principales hospedadores de parásitos, al menos el 80 % de los perros y los gatos son infectados por un tipo de endoparásito. En los entornos de cría, entre el 20-30 % de los perros y los gatos están sometidos particularmente a algunos parásitos internos, tales como coccidianos. La infección por parásitos puede causar síntomas, tales como infestación por gusanos, dolor abdominal, obstrucciones intestinales, diarrea y vómitos, que con el tiempo conducen a deshidratación, problemas del sueño, anemia, dolor de los músculos o las articulaciones, alergias y/o cansancio. En particular, los gatos y los perros son hospedadores de muchos parásitos y así el estrecho contacto puede conducir a un aumento de los riesgos de infección por parásitos de los seres humanos (zoonosis).

35 Se han usado extractos vegetales en combinación con fármacos químicos, en particular para la aplicación sobre la piel de los animales como medicinas antiparasíticas para unción dorsal, por ejemplo el documento de patente EP0116401. El problema con estos métodos de unción dorsal es que la piel del animal se irrita y puede provocar daño en la piel.

40 Dahbi et al. (2010, Parasitol Res, Vol. 107 : 55-58) desvela el uso de un aceite esencial derivado de una variedad específica de *Thymus* contra *Toxoplasma gondii*.

45 Así, existe una necesidad de desarrollar medicinas y/o alimentos alternativos adicionales para los animales que reduzcan la infección por parásitos, en particular endoparásitos en perros y/o gatos, para reducir los riesgos cada vez mayores de zoonosis.

50 La presente invención proporciona una composición que trata esta necesidad. La presente invención se explica en las reivindicaciones adjuntas.

55 La presente divulgación proporciona una composición, que no es parte de la invención, que comprende uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol y/o eugenol, un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Eucalyptus* o una fuente de saponina para su uso por vía oral como antiparasítico en animales. La composición de la presente invención ha mostrado ser eficaz en reducir la infección por parásitos en animales.

60 Además, la composición de la divulgación ha mostrado un efecto beneficioso cuando comprende dos o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol y/o eugenol,

un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Eucalyptus* o una fuente de saponina. El efecto puede ser sinérgico.

5 La presente invención se refiere, para todos los aspectos, a cualquier animal, que incluye a un humano. En particular, la presente invención se refiere a un animal de compañía, tal como un perro o un gato.

10 El primer aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición para su uso como un antiparasítico oral, comprendiendo la composición uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol, y/o eugenol, un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Eucalyptus* o una fuente de saponina.

El uso como antiparasítico incluye tratar y/o prevenir los síntomas de la infección parasítica. El tratamiento incluye mejorar los síntomas de la infección parasítica.

15 La composición de la presente divulgación se puede usar contra parásitos, en particular que pertenecen al filo Apicomplexa. Apicomplexa es un gran grupo de protistas unicelulares. Este grupo de protistas incluyen organismos clasificados como coccidios, gregarinas, piroplasmas, hemogregarinas y Plasmodia. Preferentemente, el parásito es de la clase conoidasida.

20 La composición de la divulgación que no es parte de la presente invención se puede usar contra parásitos de la clase conoidasida. Conoidasida incluye dos subclases, coccidios o gregarina. Preferentemente, el parásito es de la subclase coccidios.

25 La composición de la presente divulgación que no es parte de la presente invención puede ser para su uso para tratar coccidiosis. Preferentemente, la composición trata la infección por parásitos contra parásitos del género *Neospora* o *Toxoplasma*. Lo más preferentemente, la composición de la presente invención puede tratar coccidiosis contra las especies de parásitos *Neospora caninum* o *Toxoplasma gondii*.

30 La composición de la presente divulgación que no es parte de la invención comprende uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno.

35 Los terpinenos son un grupo de hidrocarburos isoméricos clasificados como terpenos que se encuentran naturalmente en plantas y flores. Los terpinenos tienen la fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ y se diferencian entre sí en la posición de los dobles enlaces de carbono. Los terpinenos incluyen (α) alfa-terpineno, (β) beta-terpineno, (γ) gamma-terpineno o (δ) delta-terpineno, en particular gamma-terpineno.

40 Los aceites esenciales son una mezcla volátil de ésteres, aldehídos, alcoholes, cetonas, terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, fenoles y óxidos, que se puede preparar a partir de cualquiera de las partes de la planta. Los métodos de extracción de aceites esenciales de plantas, por ejemplo destilación o extracción con disolventes, son fácilmente conocidos en la técnica.

Los aceites esenciales se pueden extraer de cualquier parte de las plantas, tal como de las hojas, las flores, los tallos, la corteza, las semillas o las raíces. Preferentemente, el aceite esencial se extrae de las hojas.

45 Los aceites esenciales que contienen gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol, y/o eugenol, incluyen el género *Satureja*, *Thymus*, *Trachyspermum*, *Origanum* o *Melaleuca*. Los compuestos también pueden ser sintéticos, o aislarse de fuentes naturales. Se puede usar una mezcla de compuestos de fuentes naturales o sintéticas.

50 En particular, se puede obtener aceite de ajedrea de invierno a partir de las hojas de *Satureja montana*, se puede obtener aceite de tomillo a partir de las hojas de *Thymus vulgaris* o *Thymus zygis*, se puede obtener aceite de orégano a partir de las hojas de *Origanum vulgare*.

55 El aceite esencial que contiene gamma-terpineno puede ser de cualquiera del género *Satureja*, *Thymus*, *Trachyspermum*, *Origanum* o *Melaleuca*.

La composición de la presente invención comprende uno o más de un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Eucalyptus*.

60 El aceite esencial del género *Cinnamomum* puede ser canela. El aceite esencial del género *Eugenia* pueden ser clavo. El aceite esencial del género *Eucalyptus* puede ser eucalipto. Preferentemente, el aceite esencial es canela.

65 La canela es una especia que se obtiene a partir de la corteza interna de los árboles de *Cinnamomum*. La canela incluye *Cinnamomum verum*, *Cinnamomum burmanii*, *Cinnamomum loureiros* o *Cinnamomum cassia*. Preferentemente, el aceite de canela se extrae de *Cinnamomum cassia* (también llamada cassia china). Lo más preferentemente, el aceite de canela se extrae de las hojas de *Cinnamomum cassia*.

- 5 El clavo es una especia que se obtiene de los capullos florales de un árbol en la familia de *Myrtaceae*. En particular, el aceite de clavo se extrae de los capullos florales de *Syzygium aromaticum*. Preferentemente, el clavo es *Eugenia caryophyllus*.
- 10 El eucalipto es un género de los árboles y arbustos que echan flor en la familia de *Myrtaceae* con más de 700 especies. En particular, el aceite de eucalipto se extrae de *Eucalyptus globulus*. Preferentemente, el aceite de eucalipto se extrae de las hojas de *Eucalyptus globulus*.
- 15 Las saponinas son compuestos químicos encontrados naturalmente en diversas plantas y también se pueden encontrar en organismos marinos. Las saponinas se pueden encontrar en las familias botánicas de Quillajaceae, Caryophyllaceae, Sapindaceae, Aceraceae, Hippocastanaceae, Cucurbitaceae, Araliaceae o Asparagaceae.
- 20 Preferentemente, una fuente desvelada de saponina deriva de la familia de Asparagaceae. En particular, la fuente de saponina deriva del género *Yucca*. Lo más preferentemente, la fuente de saponina deriva de la especie *Yucca schidigera*.
- 25 La fuente de saponina se puede encontrar en diversas partes de la planta, tales como: hojas, tallos, raíces, bulbos, flores y fruto. Se conocen métodos de extracción de la fuente de saponina de las plantas.
- 30 Las saponinas son glucósidos anfipáticos compuestos de uno o más restos de glucósidos hidrófilos combinados con un derivado de triterpeno. El número de cadenas de sacáridos unidas puede variar en longitud desde 1 hasta 11, preferentemente desde 2 hasta 5. Las cadenas de sacárido pueden ser lineales y/o ramificadas.
- 35 La fuente de saponina puede ser esteroidea.
- 40 Preferentemente, la saponina desvelada es una saponina esteroidea como diosgenina, sarsapogenina, esmilagenina, tigonenina, hecogenina, 9-dehidrohecogenina, gitogenina, clorogenina, yucagenina, samogenina, manogenina, 9-dehidromanogenina o kamogenina.
- 45 Una composición desvelada preferida que no forma parte de la invención incluye uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno y uno o más de un aceite esencial de canela, clavo o eucalipto. Preferentemente, la composición contiene orégano como el aceite esencial que contiene gamma-terpineno. Lo más preferentemente, la composición incluye aceites esenciales de orégano.
- 50 La composición de la invención es cualquier composición que un animal puede consumir o puede consumir como parte de su dieta.
- 55 La composición puede ser un líquido, un comprimido o un alimento. Preferentemente, la composición puede ser un alimento. Puede ser cualquier alimento, tal como un producto seco, producto semihúmedo, producto alimenticio húmedo o un líquido e incluye suplemento alimenticio, un snack o una golosina. Por lo tanto, la invención cubre productos alimenticios habituales que incluyen líquidos, así como snacks para mascotas (por ejemplo, barritas de snack, masticables para mascotas, golosinas crujientes, barritas de cereales, snacks, galletas y productos dulces) y suplementos.
- 60 La composición se puede incorporar en una matriz de almidón gelatinizado, o en cualquier alimento seco o húmedo, o suplementos. Se conocen en la técnica los métodos de incorporación.
- 65 El alimento es preferentemente un producto para mascotas comercial. Dicho producto se vende preferentemente como un producto para alimentar/ser administrado a un animal, en particular a un gato o un perro.
- Un alimento para mascotas seco típico contiene aproximadamente 10-40 % de proteína cruda y aproximadamente 5-40 % de grasa, siendo el resto hidrato de carbono, que incluye fibra dietética y ceniza. Un producto mojado o húmedo típico contiene (en una base de materia seca) aproximadamente 40 % de grasa, 50 % de proteína y siendo el resto fibra y ceniza. El alimento de la invención puede ser un producto seco (con aproximadamente 5 a aproximadamente 15 % de humedad), un producto semihúmedo (con aproximadamente 15 a aproximadamente 70 % de humedad) o un producto húmedo (con aproximadamente 70 a aproximadamente 90 % de humedad). El alimento de la invención se produce preferentemente como un producto seco que contiene de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 % de humedad. El alimento seco preferido se presenta más preferentemente como una pequeña galleta - como croquetas.
- Los restantes componentes del alimento no son esenciales para la invención y se pueden incluir productos habituales típicos. Los ingredientes combinados del alimento según la invención pueden proporcionar todas las vitaminas y minerales recomendados para el animal particular en cuestión (un aumento completo y equilibrado).

5 El alimento se puede proporcionar como un suplemento alimenticio. El suplemento alimenticio puede ser un polvo, salsa, cobertura, galleta, croqueta, sobre o comprimido que se puede administrar con o sin un alimento adicional. Donde el suplemento alimenticio se administre con un alimento adicional, el suplemento alimenticio se puede administrar uno detrás del otro simultáneamente o por separado. El suplemento alimenticio se puede mezclar con el alimento, rociado sobre el alimento o servir por separado. Alternativamente, el suplemento alimenticio se puede añadir a un líquido proporcionado para beber, tal como agua o leche.

10 El alimento es preferentemente un producto cocinado. Puede incorporar carne o material derivado de animal (tal como ternera, pollo, pavo, cordero, pescado, plasma sanguíneo, hueso de la médula, etc., o uno o más de los mismos). El producto puede estar alternativamente libre de carne (que incluye preferentemente un sustituto de la carne, tal como soja, gluten de maíz o un producto de soja) para proporcionar una fuente de proteína. El alimento puede contener fuentes de proteína adicionales, tales como concentrado de proteína de soja, proteínas de la leche, gluten etc. El alimento también puede contener una fuente de almidón, tal como uno o más granos (por ejemplo, trigo, maíz, arroz, avena, cebada, etc.), o puede estar libre de almidón.

15 El alimento de la invención puede ser o se puede usar en combinación con un alimento completo y equilibrado que proporciona todas las vitaminas y minerales recomendados para los perros en cuestión, por ejemplo, como se describe en National Research Council, 1985, Nutritional Requirements for Dogs, National Academy Press, Washington DC (ISBN:0-309-03496-5); o Association of American Feed Control Officials, Official Publication 1996.

20 Estos valores se aplican a una composición para alimentar a un animal, en particular un animal de compañía, tal como un perro o un gato.

25 En una realización que no es parte de la invención, la cantidad total de aceite esencial/saponina es desde 0,01 hasta 1000 mg/kg (ppm) de alimento (sólido o líquido).

30 La cantidad de aceite esencial/saponina puede tener un intervalo de 0,01 a 500 mg/kg (ppm) 0,01 a 100 mg/kg (ppm), 0,01 a 50 mg/kg (ppm), 0,01 a 1 mg/kg (ppm), 100 a 1000 mg/kg (ppm), 100 a 500 mg/kg (ppm), 50 a 100 mg/kg (ppm), o hasta 50 mg/kg (ppm) o cualquier combinación de los mismos de alimento (sólido o líquido).

35 El segundo aspecto de la divulgación se refiere a un método de prevención o tratamiento de infección parasítica en un animal.

La composición de la invención ha demostrado proporcionar, entre otras cosas, una disminución en la infección por parásitos y proliferación *in vitro*. La composición de la invención previene y/o trata una infección por parásitos en animales, que incluye la prevención de zoonosis y la prevención y/o el tratamiento en un entorno de criaderos.

40 En particular, es un deseo en el área del alimento para mascotas y la salud de animales de compañía proporcionar alimento que incluye suplementos adecuados para reforzar la salud de los animales de compañía. En particular, es un deseo proporcionar dietas adecuadas para promover o mantener la salud de los animales de compañía ya sanos como dietas preventivas.

45 En particular, el segundo aspecto de la invención desvela un método de prevención y/o tratamiento de infección parasítica en un animal, que incluye mejorar los síntomas de la infección por parásitos. El método, que no es parte de la invención, comprende administrar a dicho animal una composición que comprende uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol y/o eugenol, un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Eucalyptus* o una fuente de saponina. El animal puede estar en necesidad del mismo.

50 La presente invención se refiere, para todos los aspectos, a cualquier animal, que incluye a un humano. En particular, la presente invención se refiere a un animal de compañía, tal como un perro, un gato o cualquier otro de dichos animales que padezca o tenga tendencia a padecer infección por parásitos. Puesto que un número significativo de perros y/o gatos son hospedadores de parásitos, son fácilmente propensos a la infección parasítica.

55 En realizaciones particulares, el método desvelado que no es parte de la invención comprende administrar a dicho animal una composición que comprende uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol y/o eugenol, un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Eucalyptus* o una fuente de saponina. La composición puede incluir uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol, y/o eugenol, que incluye el género *Satureja*, *Thymus*, *Trachyspermum*, *Origanum* o *Melaleuca* y uno o más de un aceite esencial de canela, clavo o eucalipto. Preferentemente, la composición contiene orégano como el aceite esencial que contiene gamma-terpineno y carvacrol. Lo más preferentemente, esta composición incluye aceites esenciales de orégano y canela.

65 Además, el método se administra preferentemente a un animal, en particular un animal de compañía tal como un perro y/o un gato, que padece infección por parásitos y está en necesidad de mejorar los síntomas de la infección por parásitos o en necesidad de prevenir síntomas adicionales de la infección por parásitos. Este puede ser, por ejemplo,

- 5 unas mascota joven, tal como un cachorro, o un animal de compañía anciano. Donde la composición es un alimento, el alimento se puede administrar en un régimen dietético según el régimen dietético usual del animal de compañía. El alimento puede comprender 100 % de la dieta del animal de compañía o una menor proporción, dependiendo del nivel de prevención o tratamiento requerido. El alimento permite que la composición sea administrada con facilidad, evitándose así la necesidad de suplementar la comida del animal de compañía. Además, el alimento puede ser administrado por el propietario del animal, evitándose así la constante supervisión del veterinario. El alimento puede estar disponible en cualquier punto de venta de alimentos para animales de compañía o puede estar disponible de un veterinario, o un criador.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "administración" también incluye alimentar o cualquier otro método de administración por vía oral. Otros medios de administración pueden incluir comprimidos, cápsulas, inyección, supositorios o cualquier otro medio adecuado.
- 15 Las características preferidas del primer aspecto de la invención se aplican en cuanto al segundo aspecto de la invención cambiando lo que haya que cambiar.
- 20 En un tercer aspecto de la divulgación se proporciona una composición que comprende dos o más de los siguientes aceites esenciales del género *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Satureja*, *Thymus*, *Trachyspermum*, *Origanum*, *Eucalyptus* o *Melaleuca*.
- 25 Preferentemente, la composición desvelada que no forma parte de la invención comprende un aceite esencial seleccionado de aceite de ajedrea de invierno, tomillo, orégano o árbol del té y un aceite esencial seleccionado de canela, clavo o eucalipto.
- 30 Preferentemente, la composición contiene orégano. Lo más preferentemente, la composición incluye aceites esenciales de orégano y canela.
- 35 Las características preferidas del primer y segundo aspecto de la invención se aplican en cuanto al tercer aspecto de la invención, cambiando lo que haya que cambiar.
- 40 En un cuarto aspecto de la divulgación que no es parte de la invención se proporciona una composición que comprende una fuente de saponina y uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno y/o carvacrol, y/o timol, y/o terpinenol, y/o eucamenteptol y/o eugenol, o un aceite esencial del género *Cinnamomum*, *Eugenia* o *Eucalyptus*.
- 45 Preferentemente, la composición puede incluir uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno y uno o más de un aceite esencial de canela. Preferentemente, la composición contiene orégano como el aceite esencial que contiene gamma-terpineno. Lo más preferentemente, esta composición incluye aceites esenciales de orégano y canela.
- 50 Las características preferidas del primer, segundo y tercer aspecto de la invención se aplican en cuanto al cuarto aspecto de la invención, cambiando lo que haya que cambiar.
- 55 La presente descripción incluye un método de preparación de la composición de la invención.
- 60 La composición puede incluir vehículos adecuados que se conocen en la técnica, por ejemplo, dióxido de sílice, maltodextrina, goma arábiga o minerales de aluminosilicato. La composición se puede incorporar en una matriz de almidón gelatinizado.
- 65 La composición se puede pulverizar sobre el alimento, mezclar con el alimento o incorporar en el alimento en una matriz de almidón gelatinizado. Se conocen en la técnica métodos de inclusión de la composición.
- La presente descripción incluye un método de preparación del alimento de la invención.
- El alimento se puede preparar según cualquier método conocido en la técnica, tal como en Waltham Book of Dog and Cat Nutrition, Ed. ATB Edney, Capítulo por A. Rainbird, titulado "A Balanced Diet" en las páginas 57 a 74 Pergamon Press Oxford.
- Por ejemplo, un proceso para la fabricación de un alimento como se define en el presente documento comprende mezclar juntos los ingredientes con la composición que comprende uno o más de un aceite esencial que contiene gamma-terpineno, un aceite esencial de canela, clavo, eucalipto o una fuente de saponina y formar un alimento, en particular un alimento para mascotas. Se puede aplicar calentamiento/cocción a uno cualquiera o más de los ingredientes antes, durante o después de la mezcla.
- La importancia de la presente invención es las beneficiosas propiedades de uno o más de los aceites esenciales y/o una fuente de saponina. En particular, se puede observar un efecto que es superior al efecto acumulado.

La combinación de los aceites esenciales y/o fuente de saponina en la composición de la presente invención puede proporcionar un efecto sinérgico en términos de uno o más de reducir la infección por parásitos y/o proliferación, prevenir la infección por parásitos y/o proliferación, disminuir los riesgos de zoonosis y tratar la infección por parásitos, en particular la coccidiosis.

Se observa un beneficio adicional cuando se combinan en la composición un aceite esencial que contiene gamma-terpineno y un aceite esencial de canela. En particular, cuando el aceite esencial que contiene gamma-terpineno es tomillo, u orégano y el segundo aceite esencial es canela. Preferentemente, la composición contiene orégano. Lo más preferentemente, la composición incluye los aceites esenciales orégano y canela.

La divulgación se describirá ahora adicionalmente a modo de referencia en los siguientes Ejemplos y Figuras, que se proporcionan con el fin de ilustración solo y no se deben interpretar como limitantes de la invención.

Figura 1: muestra las 7 disoluciones de aceites esenciales y fuente de saponina usadas. Cada disolución se ha etiquetado de A a H.

Figura 2A: muestra un diagrama esquemático del protocolo de proliferación seguido. La Figura 2B muestra microscopía de fluorescencia de células HFF infectadas por diferentes inóculos parasíticos de *Toxoplasma gondii*.

Figura 3: muestra los resultados de una prueba de inhibición de la proliferación del parásito *Neospora caninum* en presencia de diferentes aceites esenciales en diferentes concentraciones. Se expone el resumen de resultados y CI50 en la Tabla 1.

Figura 4: muestra los resultados comparativos de CI50 de 7 aceites esenciales (orégano (E) probado a 50 ppm y 100 ppm) y la viabilidad celular.

Figura 5: muestra los resultados de una prueba de inhibición de la proliferación de *Toxoplasma gondii* con una mezcla de aceites esenciales EB (orégano y clavo).

Ejemplos

El estudio tiene como objetivo determinar una actividad antiparasítica de siete aceites esenciales en el microorganismo intracelular *Neospora caninum*, pero también combinaciones de estos fármacos en *Toxoplasma gondii*. El trabajo se centró en la capacidad de proliferación del parásito en presencia de estas disoluciones que contienen los aceites esenciales y la invasión después del pretratamiento.

Se probaron siete disoluciones de aceites esenciales y una disolución con una fuente de saponina (véase la Figura 1: A a H).

Para solubilizar los aceites esenciales, los aceites se diluyeron en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y luego se pulverizaron sobre el medio de cultivo celular (DMEM) que se complementó con 10 % de suero de ternero fetal (D10). También se usó DMSO a una concentración final que no superó el 0,1 %.

Se prepararon *in vitro* cultivos separados de ambos parásitos, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, en el tipo de célula humana HFF (fibroblastos de prepucio humano), se cultivaron a 37 °C bajo 5 % de CO₂ en medio D10. Ambos cultivos fueron similares, el inóculo usado para las diversas pruebas fue el mismo, 105 parásitos por pocillo. Se observó que el crecimiento de *Neospora caninum* es más lento que el de *Toxoplasma gondii*.

Ejemplo 1: Ensayo de proliferación del parásito *Neospora caninum* en presencia de aceites esenciales

Se mide la proliferación del parásito en las células contando la radiactividad específica del uracilo tritiado incorporado y en comparación con el control sin aceite esencial (100 % de proliferación). La prueba se realiza en placas de 24 pocillos y la prueba completa dura aproximadamente 24 horas. El control positivo se logra usando pirimetamina (CI50: 0,1 g/ml). La Figura 3 muestra la CI50 de cada disolución de aceite esencial probada en diferentes concentraciones en presencia de *Neospora caninum*.

La Tabla 1 (a continuación) resume los resultados del ejemplo 1 en la Figura 3. Los valores representan la inhibición de la proliferación. Los resultados en puntos muestran la CI50 de cada aceite esencial probado.

Aceite esencial	12,5ppm	25ppm	50ppm	100ppm	200ppm	400ppm	800ppm
A (Canela)	43,7%	84,3%	95,3%	94,5%			
B (Clavo)			21,0%	58,7%	78,0%		
C (Ajedrea de invierno)		4,6%	-3,1%	42,2%	85,2%		
D (Tomillo)		6,0%	43,8%	41,1%			
E (Orégano)		26,7%	53,9%	75,9%			
F (Eucalipto)			-1,6%	23,9%	15,0%	20,7%	69,5%
G (Árbol del té)			7,9%	18,7%	11,6%	24,5%	

Ejemplo 2

5 La inhibición de la proliferación se midió incorporando uracilo tritiado en tanto *Toxoplasma gondii* (□) como *Neospora caninum* (▨) y la viabilidad de las células HFF se evaluó usando el ensayo MTT (▧). Los resultados se muestran en la Figura 4.

10 La Figura 4 muestra cada aceite esencial, que tiene una concentración de propiedades de inhibición de la proliferación para cada uno de los parásitos, mientras se mantiene la viabilidad de células HFF próxima al 80 %.

Se puede observar que en los aceites que tienen una actividad pesticida, las concentraciones CI50 obtenidas de *Toxoplasma gondii* son las mismas que para *Neospora caninum*. Sin embargo, los aceites F y G tienen poca o ninguna acción sobre la inhibición de la proliferación de *Neospora caninum*.

15 **Ejemplo 3: Ensayo de proliferación de *Toxoplasma gondii* en presencia de un conjunto de combinaciones de aceites esenciales**

20 El conjunto de combinaciones de aceites esenciales son: AB, AE, AD y BE.

Para cada combinación se dibujó un diseño factorial de 3 por 3. La CI50 teórica se ajusta a la tasa de inhibición - proliferación medida y entonces se usa como la base para hacer diluciones y para hacer las 9 relaciones posteriores diferentes de los 2 aceites esenciales combinados en una mezcla.

Aceite esencial 1

Aceite esencial 2

CI50 AE1/4

CI50 AE2/4

CI50 AE1/4 + CI50 AE2/4
CI50 AE1/4 + CI50 AE2/2
CI50 AE1/4 + CI50 AE2

CI50 AE1/2

CI50 AE2/2

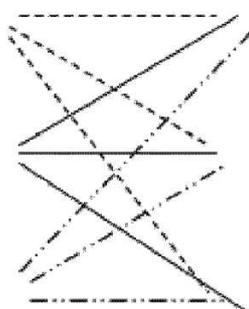


CI50 AE1/2 + CI50 AE2/4
CI50 AE1/2 + CI50 AE2/2
CI50 AE1/2 + CI50 AE2

CI50 AE1

CI50 AE2

CI50 AE1 + CI50 AE2/4
CI50 AE1 + CI50 AE2/2
CI50 AE1 + CI50 AE2



Para cada asociación, se realizaron 9 pruebas de la inhibición de proliferación de *Toxoplasma gondii* (no se muestran todos los datos). Nuevamente, se midió la inhibición de la proliferación por incorporación de uracilo tritiado.

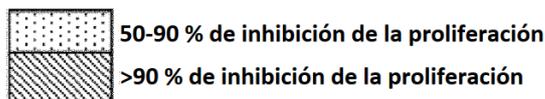
5 Mezcla BE (véase la Figura 5): Muestra el efecto sinérgico de la mezcla BE sobre la proliferación de *Toxoplasma gondii*.

10 El aceite esencial B a 100 ppm solo corresponde a una CI58 (58 % de inhibición de la proliferación). El aceite esencial E a 75 ppm solo corresponde a una CI88 (88 % de inhibición de la proliferación). Suponiendo una relación independiente entre los dos aceites sobre la inhibición de la proliferación, una mezcla de aceite esencial B a CI 58/2 = CI29 con el aceite esencial E a CI88/4 = CI22 conduce a un efecto adicional inesperado de CI22 + CI29 = CI51 (51 % de inhibición de la proliferación). La medida de la inhibición de la proliferación de dicha mezcla (B a CI22 combinada con E a CI29) reveló una sorprendente inhibición de la proliferación medible del 87 % (CI87). Esta diferencia altamente significativa subraya claramente un efecto sinérgico de la mezcla BE sobre la proliferación de *Toxoplasma gondii*.

Mezcla de Bilan

La Tabla 2 (a continuación) incluye los resultados de la inhibición de la proliferación de *Toxoplasma gondii* en presencia de los 36 lotes de aceites esenciales.

	CI 50/4	CI 50/4	CI 50/4	CI 50/2	CI 50/2	CI 50/2	CI 50	CI 50	CI 50
	CI 50/4	CI 50/2	CI 50	CI 50/4	CI 50/2	CI 50	CI 50/4	CI 50/2	CI 50
AB	16,4%	34,3%	63,5%	16,7%	39,3%	63,2%	47,6%	75,2%	82,4%
AE	45,5%	53,3%	85,7%	23,1%	53,5%	86,0%	57,0%	67,0%	91,9%
BE	27,7%	52,1%	79,6%	87,2%	93,4%	81,5%	73,8%	85,2%	96,4%
AD	19,4%	0,3%	31,9%	16,0%	20,2%	53,5%	54,1%	60,0%	69,6%



20 Los valores representan la inhibición de la proliferación. El área con puntos muestra las combinaciones para inhibir entre el 50-90 % de la proliferación del parásito. El área rayada muestra aquellos para inhibir la proliferación de más del 90 %.

Conclusión

5 Diversas pruebas en los dos parásitos han dado resultados muy similares. La combinación de aceites esenciales ha aumentado en algunos casos la capacidad para inhibir la proliferación de los compuestos. Esto indica que los aceites esenciales pueden actuar sinérgicamente. Esto es particularmente cierto para las combinaciones AE (datos no mostrados) y BE, donde el efecto medido de la mezcla es significativamente superior al efecto adicional esperado de ambos aceites esenciales tomados juntos. También es importante tener en cuenta que todos los puntos probados no tuvieron efectos citotóxicos sobre las células HFF (integridad de la monocapa).

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento oral de animales contra parásitos que son *Neospora caninum* o *Toxoplasma gondii*, en donde la composición es:
- 5 - una composición que comprende un aceite esencial del género *Cinnamomum* y un aceite esencial del género *Eugenia*
o
- una composición que comprende una combinación de aceites esenciales que consiste en un aceite esencial del género *Cinnamomum* y un aceite esencial del género *Origanum*, o
- una composición que comprende una combinación de aceites esenciales que consiste en un aceite esencial del género *Cinnamomum* y un aceite esencial de *Thymus*, o
10 - una composición que comprende un aceite esencial del género *Eugenia* y un aceite esencial del género *Origanum*.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, para su uso en un gato o un perro.
- 15 3. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición es un líquido, un comprimido o un alimento.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición se incorpora en una matriz de almidón gelatinizada, o un producto húmedo.
- 20 5. Una composición para su uso según la reivindicación 1, composición que se selecciona entre
- una composición que comprende una combinación que consiste en un aceite esencial del género *Cinnamomum* y un aceite esencial del género *Eugenia*, y
- una composición que comprende una combinación que consiste en un aceite esencial del género *Eugenia* y un aceite esencial del género *Origanum*.
25 composición que se prepara por un proceso que comprende mezclar juntos los ingredientes y opcionalmente presentar la mezcla en una forma adecuada para la composición y administración.
- 30 6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde la composición está en forma de un espray, recubrimiento o se incorpora en una matriz de almidón gelatinizada.

Figura 1

A		B		C		D	
AE Canela China (hojas)		AE Clavo Madagascar (hojas)		AE Aldebra de invierno Balcanes (hojas)		AE Tomillo rojo España (hojas)	
<i>Cinnamomum cassia</i>		<i>Eugenia caryophyllus</i>		<i>Satureja montana</i>		<i>Thymus zygis</i>	
%	%	%	%	%	%	%	%
Cinamaldehído	70-30	Eugenol	75-85	Carvacrol	40-60	Timol	40-60
o-Metoxicinamaldehído	<10	beta-Cariofileno	<15	p-Cumeno	<20	p-Cumeno	<20
Acetato de cinamilo	<5	Acetato de eugenilo	<5	gamma-Terpineno	<10	gamma-Terpineno	<15
Coumarina	<5	Metil Eugenol	<5	Timol	<10	Linalool	<5
Alcohol fenilético	<5			Mirceno	<5	Carvacrol	<5
Benzaldehído	<5			beta-Cariofileno	<5	beta-Cariofileno	<5
Ácido cinámico	<5			alfa-Pineno	<5	Mirceno	<5
Salicilaldehído	<5			alfa-Terpineno	<5	1-Terpinen-4-ol	<5
Alcohol cinámico	<5			1-Terpinen-4-ol	<5	alfa-Terpineno	<5
Estreno	<5			alfa-Tuyeno	<5	alfa-Pineno	<5
Acetofenona	<5			beta-Pineno	<5	alfa-Tuyeno	<5
Eugenol	<5					Metil carvacrol éter	<5
						Limoneno	<5
						Trans-Hidrato sabineno	<5

E		F		G		H	
AE Orégano (hojas)		AE Eucalipto China (hojas)		AE Arbol del té australiano (hojas)		Fuentes de saponina	
<i>Origanum vulgare</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>		<i>Melaleuca alternifolia</i>		<i>Yucca schidigera</i>	
%	%	%	%	%	%	%	%
Carvacrol	65-85	Eucaliptol	70-90	4-Terpinenol	30-50	Diosgenina	
gamma-Terpineno	<5	Limoneno	<10	gamma-Terpineno	<15	sarsapogenina	
p-Cumeno	<5	gamma-Terpineno	<10	alfa-Terpineno	<5	esmilagenina	
beta-Cariofileno	<5	p-Cumeno	<5	alfa-Terpineol	<5	tigogenina	
Linalool	<5	alfa-Pineno	<5	Terpinoleno	<5	hecogenina	
Timol	<5			alfa-Pineno	<5	9-deshidrohecogenina	
Beta-felandreno+limoneno	<5			Eucaliptol	<5	gitogenina	
beta-Pineno	<5			p-Cumeno	<5	clorogenina	
Borneol	<5			Limoneno	<5	yuca genina	
Alcanfor	<5			delta-Cadineno	<5	samogenina	
1-Terpinen-4-ol	<5			Viridiflorol (viridiflorol gamma)	<5	manogenina	
alfa-Terpineol	<5			Sabineno	<5	9-deshidromanogenina	
alfa-Humuleno	<5			beta-Pineno	<5	kamogenina	
alfa-Terpineno	<5						

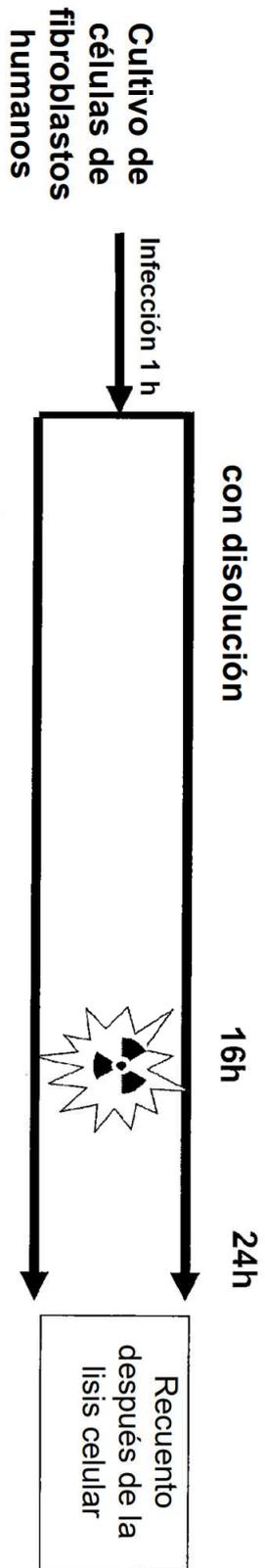


Figura 2A

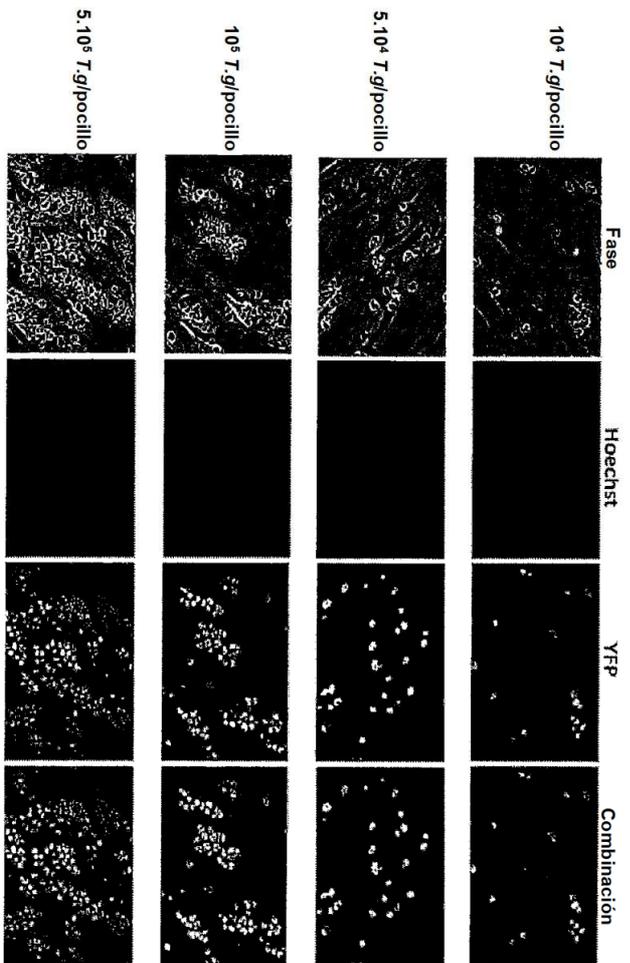


Figura 2B

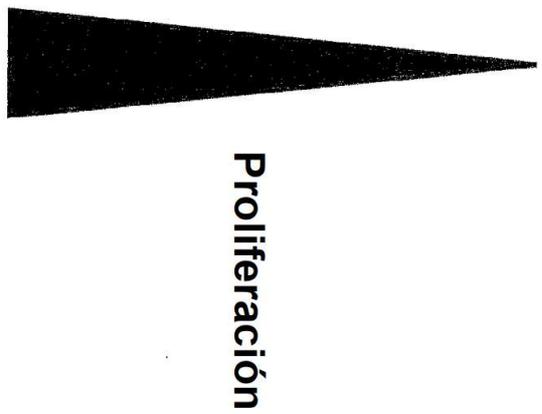
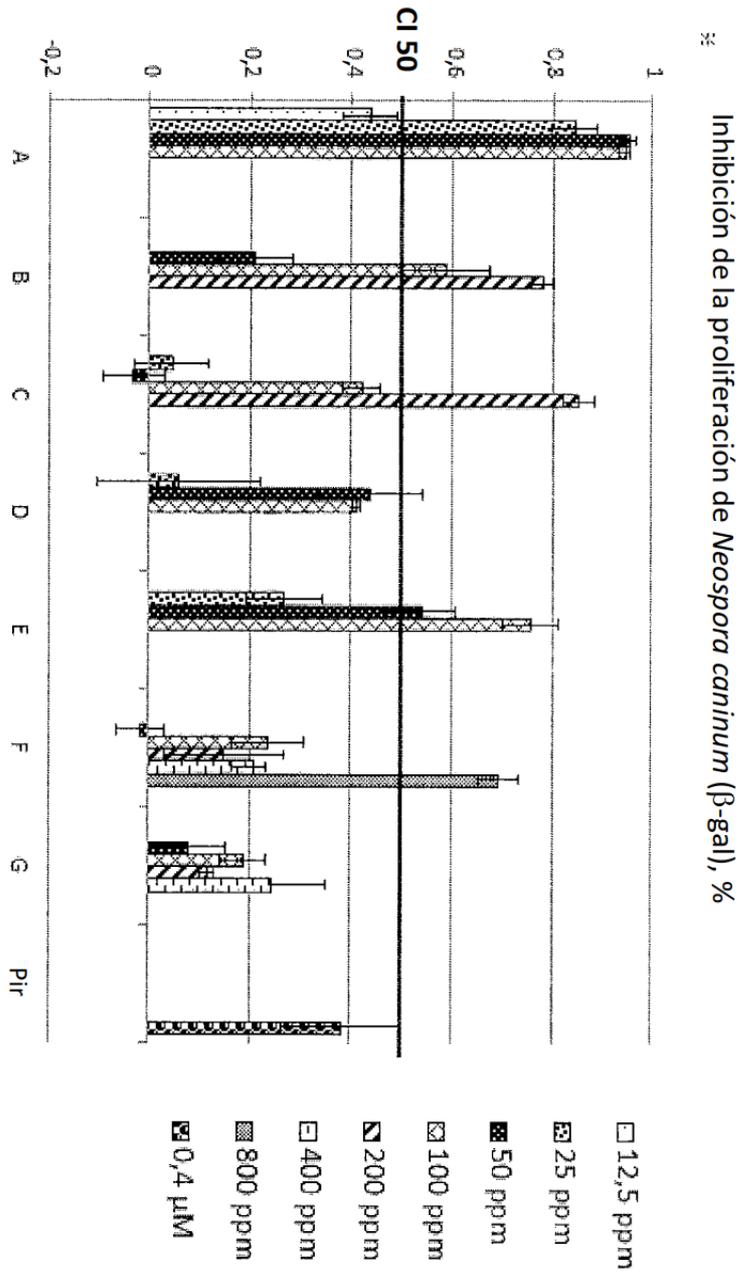


Figura 3



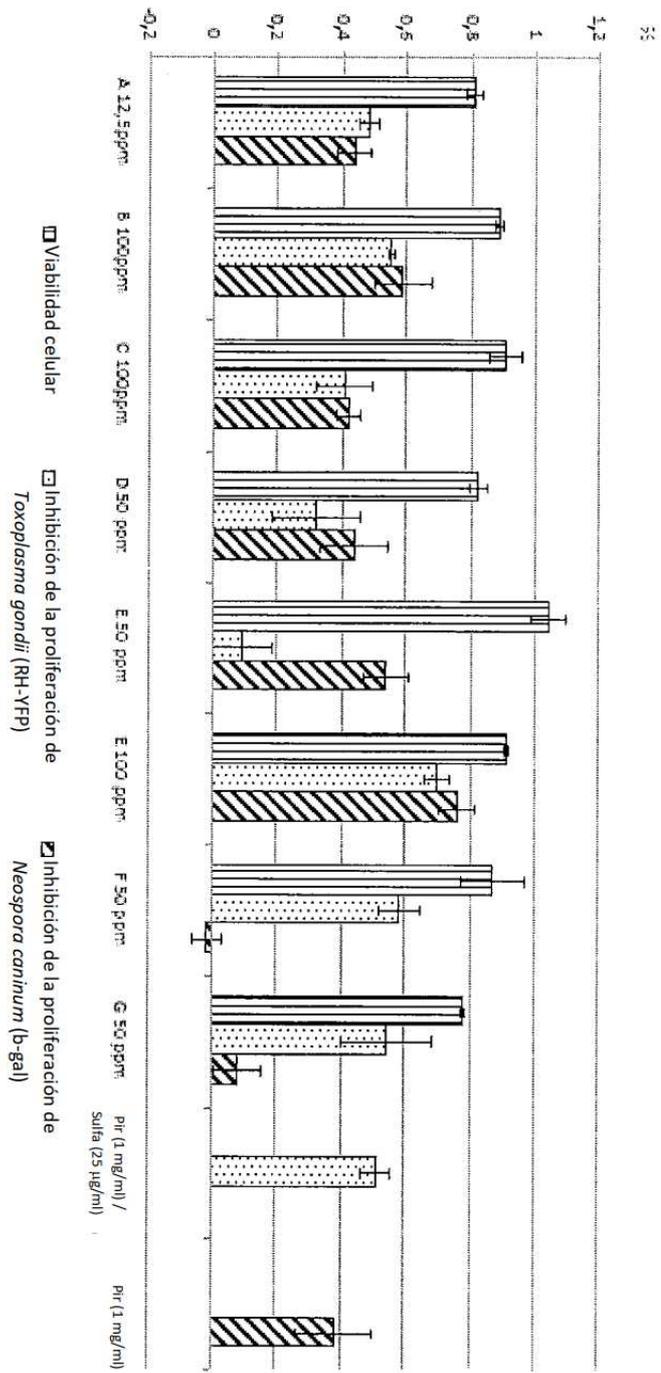


Figura 4

Figura 5

**Inhibición de la proliferación de *Toxoplasma gondii* (RH-YFP):
Mezcla BE**

