



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 152**

51 Int. Cl.:
A61K 36/15 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04022793 .6**
96 Fecha de presentación : **24.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1520585**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2005**

54 Título: **Tratamiento de cáncer de mamíferos utilizando productos naturales o aceites esenciales o componentes de las especies de pistacia.**

30 Prioridad: **02.10.2003 US 676101**

73 Titular/es: **DATA MEDICA PADOVA S.p.A.**
Via Zanchi, 89
35133 Padova, IT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2011

72 Inventor/es: **Belloni Regazzo, Maria Paola**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2011

74 Agente: **No consta**

ES 2 366 152 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

Tratamiento de cáncer de mamíferos utilizando productos naturales o aceites esenciales o componentes de las especies de pistacia.

5

La presente invención hace referencia, en general, a productos naturales terapéuticamente efectivos y compuestos farmacéuticos que contienen aceite esencial vegetal de la especie Pistacia, o componentes, para la prevención o el tratamiento de cáncer en mamíferos, incluyendo humanos, tales como por ejemplo cáncer de mama.

10 Es conocido que la naturaleza representa una gran fuente de medicamentos terapéuticamente activos (Buffoni 1996). En efecto, el uso de plantas u otros productos naturales para objetivos terapéuticos se remonta básicamente al comienzo de la humanidad (Farnsworth 1985; Cragg 1997).

15 Las plantas, como todo lo demás, pueden considerarse una mezcla de diferentes sustancias que a pesar de un destino metabólico diversificado se mantienen en un equilibrio perfecto. Varios medicamentos contienen principios activos con diversas actividades farmacológicas, algunas de las cuales son fundamentales para algún uso terapéutico específico. De este modo, la fitoterapia no debería considerarse una cura alternativa, sino más bien un sector importante de la farmacoterapia.

20 De hecho, los remedios fitoterapéuticos a menudo se asocian a los medicamentos de síntesis que, en varios casos, son sólo para completar terapias “naturales”.

Los productos naturales representaron durante tiempo una excelente fuente de medicinales para el tratamiento del cáncer. Los antitumorales de origen natural que se utilizan con éxito en la práctica clínica son por lo tanto varios y algunos de ellos son muy bien conocidos tales como por ejemplo el taxol, aislado de *Taxus brevifolia*; la vinicristina y la vinblastina, aisladas de *Vinca rosea*; etopósido y tenipósido, derivados semisintéticos de podofilotoxina, aislados de *Podophyllum peltatum*. Los productos naturales, además, dada su variedad estructural, continúan atrayendo el interés en el campo antitumoral (Farnsworth 1990; Cragg 1999).

30 Entre los productos naturales vegetales que tienen una potencial actividad farmacológica, los aceites esenciales, mezclas puras de sustancias orgánicas, juegan un papel central. Incluso en la misma especie la composición de un aceite esencial es muy variable debido a la elevada sensibilidad vegetal a diferentes condiciones climáticas. Los aceites esenciales generalmente se obtienen mediante compresión o hidrodestilación. La destilación en corriente de vapor es el método de extracción utilizado más ampliamente. Dada la composición muy compleja de los aceites esenciales y los muchos cambios cuantitativos que ocurren durante el ciclo vegetativo de la planta, su caracterización es bastante difícil.

El género Pistacia (Anacardaceae) incluye varias especies y está constituida por matorrales o pequeños árboles, arbustos con corteza resinosa.

40

Las especies encontradas en el área mediterránea son:

- *P. vera*

45 - *P. terebinthus*

- *P. lentiscus*.

El aceite obtenido por los frutos secos de *Pistacia vera* se usa poco y está presente sólo en un número limitado de preparados farmacéuticos, mientras que el aceite esencial extraído de la resina del *Pistacia terebinthus* ha demostrado ejercer una actividad antiinflamatoria significativa en un modelo experimental de inflamación auricular en ratas (Giner-Larza 2000). Desde luego mucho más utilizado en su lugar es el medicamento llamado caucho o mastique de lentiscus extraída del *Pistacia lentiscus*. Este se utiliza en píldoras como expectorante, mientras que su actividad tónica y astringente es explotada para el tratamiento de diarreas infantiles. El mastique también es masticado por su ligera actividad antiséptica oral y a veces es asociado también al alcanfor, la sandálica y el bálsamo de Perú para eliminar el mal aliento. El hallazgo de la resina lentiscus en momias que datan hasta el siglo VII a.C. muestra que los egipcios utilizaron esta sustancia para embalsamar los muertos explotando su actividad antiséptica (Colombini 2000).

60 También es sabido que:

✓ el extracto de agua de *Pistacia lentiscus*, rico en potasio, sodio y magnesio, induce una actividad hipotensora en las ratas (Sanz 1987, 1988), probablemente debido a la presencia de n-butanólico y etilo en el extracto;

65 ✓ el aceite esencial obtenido de la hidrodestilación de la resina de lentiscus ejerce una actividad antibacteriana *in vitro* más marcada hacia la bacteria gram+, respecto a la gram-. Identificar en el aceite esencial, una acción

ES 2 366 152 T3

antibacteriana “natural” es de interés también porque podría reemplazar las sustancias conservantes, a menudo sospechosas de toxicidad, cancerogenicidad y teratogenicidad (Magiatis 1999);

- ✓ entre los varios extractos obtenidos por hojas de *P. lentiscus* criodesecadas, la decocción es el único que tiene *in vitro*, una buena actividad antibacteriana en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* y *Escherichia coli* y tiene una actividad antimicótica modesta, probada en cultivos celulares de *Torulopsis glabrata* y *Candida parapsilosis*;
- ✓ la resina del lentiscus, incluso cuando se usa en dosis bajas, actúa rápidamente contra la úlcera péptica gracias a su efectividad contra *Helicobacter pylori* (Huwez 1998, Marone 2001);
- ✓ el córtex y las hojas de *Pistacia lentiscus* se utilizan contra la diarrea y la gonorrea.

Los aceites esenciales del género *Pistacia* son ricos en monoterpenos, que de hecho representan la mayor parte de los componentes. Los monoterpenos son compuestos dietéticos no nutritivos que se encuentran también en los aceites esenciales de muchas plantas comestibles tales como cítricos, cerezas, menta verde, eneldo, alcaravea, y otros. Sus funciones naturales pueden ser como quimiotácticos o quimiorepelentes, ya que son responsables en gran parte de la fragancia agradable de la planta. Estos simples carbono isoprenoides 10 son derivados de la vía mevalonato en plantas pero no son producidos en mamíferos. Por ejemplo, en la menta verde y otras plantas, el d-limoneno es formado por la ciclización de geranilpirofosfato por la enzima limoneno sintasa (Croteau 1987). El limoneno entonces sirve como un precursor para otros monoterpenos monocíclicos vegetales tales como la carvona, el carveol y el perilil alcohol (Elson 1994).

Los efectos antitumorales de los monoterpenos dietéticos se consiguen con poca o ninguna toxicidad del huésped (Elson 1994, Crowell 1994 a, b, Evans 1995). Un número de monoterpenos dietéticos tiene actividad antitumoral, exhibiendo no sólo la capacidad de prevenir la formación o el progreso del cáncer, sino de remitir tumores malignos existentes. El limoneno y el perilil alcohol tienen una actividad quimiopreventiva bien establecida contra muchos tipos de cáncer. De hecho, el d-limoneno tiene una amplia gama de actividades antitumorales (Elson 1994, Crowell 1994). El limoneno dietético reduce la incidencia de linfomas espontáneos en ratones p53^{-/-} (Hursting 1995). Además, el limoneno tiene una actividad quimiopreventiva contra cánceres espontáneos y químicamente inducidos de mama, piel, hígado, pulmón, y preestómago en roedores, así como cáncer de mama oncogen ras inducido en ratas (Gould 1994). Además, cuando se administra bien en forma pura, bien como aceite de cáscara de naranja (95% d-limoneno), el limoneno inhibe el desarrollo de cánceres químicamente inducidos de mama (Elegbede 1984, Elson 1988, Maltzman 1989, Wattenberg 1983), de piel (Elegbede 1986 a), de hígado (Dietrich 1991), de pulmón y preestómago (Wattenberg 1989, 1991) en roedores (revisado en Crowell y Gould 1994, Elson y Yu 1994, Elson 1995). En modelos de carcinogénesis mamaria en ratas, los efectos quimiopreventivos del limoneno son evidentes durante la fase de iniciación de 7-12 dimetilbenz(a)antraceno (DMBA)² - cáncer inducido (Elson 1988) y durante la fase de promoción de cánceres inducidos por DMBA y nitrosometilurea (NMU), (Elson 1988, Matzman 1989). Kawamori *et al.* (1996) informaron de que el desarrollo de focos de cripta aberrante inducidos por azoximetano en el colon de ratas se redujo significativamente cuando se les administró 0,5% de limoneno en el agua para beber. Un ensayo clínico de fase I comprobando la actividad quimioterapéutica del limoneno contra el cáncer está en progreso (McNamee 1993).

El aceite de semilla de alcaravea, y su principal monoterpeno, carvona, previenen el desarrollo del carcinoma químicamente inducido de pulmón y preestómago cuando se administra antes del carcinógeno (Wattenberg 1989). Además, el carveol (Crowell 1992) y el mentol (Russin 1989) tienen actividad quimiopreventiva contra el cáncer de mama inducido por DMBA en ratas cuando se suministran como el 1% de la dieta sólo durante la fase de iniciación. El geraniol, un monoterpeno dietético acíclico, tiene actividad antitumoral *in vivo* contra la leucemia murina, hepatoma y células melanoma (Shoff 1991, Yu 1995) cuando se administra antes y después del trasplante de célula tumoral.

Además, muchos estudios animales han mostrado que el perilil alcohol es un agente quimioterapéutico muy potente contra varios tipos de cáncer, incluyendo el pancreático, el de mama y el de hígado (Crowell 1999) y que tiene actividad quimiopreventiva de fase de promoción contra el cáncer de hígado inducido en ratas (Mills 1995) y que es muy efectivo para prevenir recurrencias tumorales o tumores secundarios en animales tratados con un régimen de quimioterapia (Haag 1994). El perilil alcohol tiene actividad quimioterapéutica contra el cáncer pancreático en dosis que causan poca toxicidad para el huésped (Stark 1995). El perilil alcohol redujo el crecimiento de tumores pancreáticos trasplantados en hámsteres a menos de la mitad que el de los controles. Además, una porción significativa de tumores pancreáticos tratados con perilil alcohol fueron completamente remitidos, mientras que ninguno de los tumores de control regresaron (Stark 1995). La quimioterapia con perilil alcohol también reduce la tasa de crecimiento de carcinomas prostáticos trasplantados en ratas desnudas (Jeffers 1995). De esta forma, los monoterpenos tienen actividad quimioterapéutica contra un número de tipos sólidos, incluyendo el cáncer pancreático, uno de los más refractarios de todos los cánceres humanos a terapias de cáncer disponibles. La eficacia de la quimioterapia con perilil alcohol contra el cáncer humano se probará en los próximos ensayos clínicos de fase I (Phillips 1995).

Tanto el limoneno (Elegbede 1986 b, Haag 1992) y el perilil alcohol (Haag 1994) tienen actividad quimioterapéutica contra tumores mamaros en ratas, provocando la completa regresión de >80% de tumores mamaros inducidos por DMBA o NMU establecidos con limoneno y el aromatasa inhibidor 4-hidroxiandrostenediona fue más efectivo que cualquiera de los medicamentos por sí sola.

Varios mecanismos de acción pueden explicar las actividades quimioterapéuticas de los monoterpenos. Los efectos quimiopreventivos bloqueadores del limoneno y otros monoterpenos durante la fase de iniciación de la carcinogénesis mamaria probablemente son debidos a la inducción de enzimas carcinogen-metabolizantes de fase II, resultando en la desintoxicación carcinogénica. La actividad quimiopreventiva supresora de tumores de la fase post iniciación de los monoterpenos puede ser debida en parte a la inhibición de la isoprenilación de pequeñas proteínas G asociadas al crecimiento celular tales como p21 ras por limoneno, perill alcohol, y sus metabolitos (Crowell 1991, 1994). Esta inhibición ocurre al nivel de las proteínas prenil transferasas. Además, el perill alcohol afecta la vía mevalonato inhibiendo la biosíntesis ubiquinona así como la conversión de latosterol en colesterol (Ren 1994). La quimioterapia de tumores mamarios químicamente inducidos con monoterpenos resulta en la rediferenciación del tumor (Haag 1992). En los tumores mamarios tratados con limoneno la expresión del receptor del factor de crecimiento II de tipo manosa-6-fosfato-insulina y el factor de crecimiento transformador $\beta 1$ se aumentan en los tumores regresivos diferenciados es, pero no en el pequeño número de tumores que no responden al limoneno (Jirtle 1993). Además, los efectos antitumorales de monoterpenos dietéticos se consiguen con poca o ninguna toxicidad del huésped (Elson 1994, Crowell 1994, a, b, Evans 1995). En resumen, una variedad de monoterpenos dietéticos han demostrado ser efectivos en la quimiopreención y quimioterapia del cáncer. Ahora la investigación de monoterpenos progresa hacia ensayos clínicos humanos para la actividad quimioterapéutica. Los monoterpenos poseen también muchas características de agentes quimiopreventivos ideales, a saber, eficaz actividad antitumoral, disponibilidad comercial, bajo coste, biodisponibilidad oral, baja toxicidad y nuevos mecanismos de acción diferentes a los de los medicamentos quimioterapéuticas convencionales contra el cáncer, haciendo que sea factible empezar a considerarlos para las pruebas de quimiopreención en el cáncer humano (Crowell 1996).

Varios estudios se han realizado con el objetivo de identificar la composición química del aceite obtenido de las hojas de *P. lentiscus*. Concluyendo que según el área geográfica de origen los diversos aceites están caracterizados por un monoterpeno inusual, el mirceno está presente en particular en 19-25% en el aceite que viene de España y Sicilia (Calabro 1974, Boelens 1991) a partir del análisis de los estudios realizados en la literatura; el α -pineno está presente en el 16% en los que vienen de Francia (Buil 1975); el terpeno-4-ol está presente en el 22% del aceite que viene de Cerdeña (Castola 2000) y δ -3-careno en el aceite de Egipto 65% (De Pooter 1991). Los miembros presentes en menor cantidad son unos pocos sesquiterpenos, lo que: D-germacreno (9%) (Boelens 1991), β -cariofileno (3,5-9%) (Buil 1975, Boelens 1991), δ -cadineno y α -cadinolo (6% de todos) (Buil 1975), el β -bisaboleno, β -burboneno y óxido de cariofileno (alrededor del 3-4% de todos) (De Pooter 1991). Las concentraciones de los monoterpenos, además, cambian significativamente si el aceite es obtenido de la fruta. En particular, comparando dos aceites, uno viniendo de España (Boelens 1991) y uno de Australia (Wyllie 1990), se obtiene, que componente hay más, respectivamente mirceno (72 y 39%), α -pineno (10 y 28%) y el limoneno (87 y 11%).

Los aceites obtenidos para hidrodestilación por el mastique que viene de España y Grecia en su lugar están caracterizados por un elevado contenido de α -pineno (65-86%) y un bajo contenido de mirceno (3-25%) (Scurbis 1975, Papageorgiou 1981; Katsiotis 1984; (Boelens 1991).

De interés particular es el trabajo de Magiatis y coll. (1999) quienes, utilizando cromatografía de gas y espectroscopia de masas, identificaron 69 miembros de treoles esenciales de *P. lentiscus*, variedad chia, obtenidos respectivamente a partir de las hojas, las ramas y el mastique.

GR 1 003 868 muestra el uso de un producto que deriva de la planta *Pistacia lentiscus* variedad chia de la familia Anacardiaceae como un antioxidante, como inductor cicatrizante y como citostático.

WO 03/092712, que es citada como técnica anterior según el artículo 54 (3) EPC, muestra la actividad citostática o citotóxica del *Pistacia lentiscus* variedad chia.

Karpozilos A *et al.*, "El tratamiento de cáncer en la antigüedad griega", European Journal of Cancer, Pergamon Press, Oxford, GB, volumen 40, n° 14, Septiembre 2004, páginas 2033-2040, que es citado como técnica anterior según el artículo 54 (3) EPC, que muestra que Archígenes de Apameia, Galeno de Pergamo y Orbasio de Pérgamo informaron del uso de *P. terebinthus* en el tratamiento del cáncer.

La presente invención trata del uso de productos naturales de Pistacia o aceites esenciales y/o componentes, naturales o sintéticos o mezclas o derivados, y posiblemente otros productos naturales suyos relacionados para la prevención y el tratamiento del cáncer. En particular la presente invención hace referencia al uso de lo mencionado anteriormente, bien mediante administración oral o parenteral, también como adyuvante en combinación con otras curas, en regímenes preventivos o terapéuticos dirigidos hacia la inhibición del crecimiento celular o a matar células tumorales en humanos y otras especies animales.

Objetos adicionales y ventajas esperadas de la presente invención se establecerán en parte en la descripción que sigue, o pueden aprenderse practicando o utilizando la presente invención.

Los objetos y las ventajas pueden ser realizados o conseguidos mediante las características y combinaciones particularmente citadas en las reivindicaciones anexadas.

Debe entenderse que en la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada proveen la base experimental para la invención, son ejemplares y explicativas sólo y no han de verse como restrictivas de la invención tal y como se reivindica.

ES 2 366 152 T3

La figura 1 muestra el efecto citotóxico del aceite de *Lentiscus* de Portugal.

Las figuras 2a, 2b, y 2c muestran el efecto citotóxico de componentes de aceite único.

5 La figura 3 muestra el efecto citotóxico de DM1C en células MCF-7.

La figura 4 muestra el efecto citotóxico de DM2A1 en células 2008 y LoVo.

10 La figura 5 muestra el efecto citotóxico de DM3Z en células MCF-7, 2008 y LoVo.

La figura 6 muestra el efecto citotóxico de DMF1 en células MCF-7, 2008 y LoVo.

La figura 7 muestra el efecto citotóxico de DMP en células 2008.

15 La figura 8 muestra el efecto citotóxico de DMG2 en células LoVo.

La figura 9 muestra el efecto citotóxico de DM3P en células LoVo

20 La figura 10 muestra el efecto citotóxico de DM72 en células MCF-7, 2008 y LoVo.

La figura 11 muestra el efecto citotóxico de DM2Z en células 2008.

La figura 12 muestra el efecto citotóxico de DM1Z en células 2008 y LoVo.

25 La figura 13 muestra el efecto citotóxico de DMF3 en células MCF-7, 2008 y LoVo.

La figura 14 muestra el efecto citotóxico de DMV2X en células LoVo.

30 La figura 15 muestra el efecto citotóxico de DMV5X en células MCF-7, 2008 y LoVo.

La figura 16 muestra el efecto citotóxico de DM4a en células LoVo.

La figura 17 muestra el efecto citotóxico de DM4p en células 2008 y LoVo.

35 La figura 18 muestra el efecto citotóxico de DM5a en células 2008.

La figura 19 muestra el efecto citotóxico de DM4C en células MCF-7, 2008 y LoVo.

40 La figura 20 muestra el efecto citotóxico de DMK en células 2008.

La figura 21 muestra el efecto citotóxico de DMF2 en células MCF-7, 2008 y LoVo.

La figura 22 muestra el efecto citotóxico de DM1P en células MCF-7.

45 La figura 23 muestra el efecto citotóxico de DMG1 en células MCF-7 y 2008.

La figura 24 muestra el efecto citotóxico de DM2C en células LoVo.

La figura 25 muestra el efecto citotóxico de DM3C en células LoVo.

50 La figura 26 muestra el efecto citotóxico de DM2P en células LoVo.

La figura 27 muestra el efecto citotóxico de DM1S en células MCF-7.

55 La figura 28 muestra el efecto citotóxico de DMNP en células 2008 y LoVo.

La figura 29 muestra resultados del análisis citofluorimétrico.

60 La figura 30 muestra una evaluación de la concentración de nitrito.

La presente invención hace referencia al uso para fabricar un medicamento para tratar o prevenir cáncer en mamíferos, incluyendo humanos, que comprende la administración de una cantidad efectiva de un aceite esencial obtenido de una planta del género *Pistacia* seleccionada de *P. vera* y *P. integerrima*.

65 La presente invención también hace referencia al uso de acetato de bornilo para fabricar un medicamento para tratar el adenocarcinoma de colon y ovarios.

“Productos obtenidos de una planta del género Pistacia” tal y como se usa en la presente especificación y reivindicaciones, significa cualquier parte de una planta del género Pistacia, tal como hojas, ramitas, semillas, raíces, frutos, agallas, bayas, ramas, flores, y cualquier producto natural de una planta del género Pistacia, tales como resinas, productos obtenidos de una planta del género Pistacia por cualquier técnica, por ejemplo pero no limitado a la extracción, el molido, o tratamientos químicos, físicos o físico-químicos.

“Planta del género Pistacia” tal y como se utiliza en la presente especificación y reivindicaciones significa una de la especie *P. vera* y *P. integerrima*. En un ejemplo de realización de la presente invención, la planta del género Pistacia es de origen europeo y asiático.

En particular la presente invención hace referencia al uso de los aceites esenciales mencionados anteriormente, mediante administración oral o parenteral, también como adyuvante en combinación con otras curas en regímenes preventivos y terapéuticos dirigidos hacia la inhibición del crecimiento celular o para matar células tumorales en humanos y otras especies animales.

Las características y ventajas de la presente invención resultarán aparentes de forma más clara apreciadas a partir de la siguiente descripción de datos experimentales que indican la actividad antitumoral *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de varias especies de Pistacia.

Métodos

Recolección de plantas

Las partes aéreas (hojas y ramitas, ramas, frutos, frutos secos, semillas, flores y agallas) de las plantas se recolectaron en diferentes estaciones y a varias horas del día en tres regiones italianas diferentes: Veneto (*P. terebinthus*); la Toscana (*P. lentiscus*); Sicilia (*P. vera*). Otras muestras se recolectaron fuera de Italia: una de las muestras de *P. lentiscus* se recogió en Portugal, mientras que las plantas de *P. integerrima* se recolectaron en Nepal.

Las partes de planta en la mayoría de los casos se recolectaron y luego se enjuagaron, secaron y congelaron a -21°C dentro de las tres horas a partir de su recolección. El material fue entonces hidrodestilado a los pocos meses. El material vegetal expuesto a la hidrodestilación consistió en hojas, flores, frutos, ramas, agallas y frutos secos de *P. terebinthus*, *P. lentiscus*, *P. vera* y/o *P. integerrima*. Las muestras se lavaron y secaron con cuidado y se preservaron a baja temperatura (-21°) para mantener su composición fitoquímica inalterada hasta el momento de la destilación. Todas las muestras, antes de ser expuestas a destilación, fueron picadas para obtener el máximo rendimiento de extracción y hacer el proceso de difusión de la esencia más fácil (Boelens 1991, De Pooter 1991, Magiatis 1999, Papageorgiu 1981).

Extracción del aceite esencial

El equipo utilizado para la extracción de los aceites esenciales consistió en un contenedor de acero inoxidable (10 l), en el que se añadió 1750 ml de agua destilada, separada del medicamento picado por una rejilla de acero, para evitar el contacto directo del medicamento con el agua de extracción. La muestra es compactada por otra rejilla para evitar el manejo del medicamento durante el procedimiento de extracción y al mismo tiempo dejar que el vapor de agua fluya libremente hacia abajo. Hasta este punto el contenedor de acero está cerrado. La caldera está equipada con un termómetro, para poder comprobar en todo momento de la destilación la temperatura en la caldera, y también está conectado a una columna de destilación en acero, que lleva un refrigerante a la extremidad superior, siempre en acero, con agua corriente refrigerante. El agua en el contenedor de gama a la ebullición desarrolla vapor que yendo más allá de la rejilla, solapa el medicamento y extrae las esencias contenidas, yendo más allá de la rejilla, el vapor es dirigido a lo largo de la columna de destilación y condensado en el refrigerante; la mezcla de agua-esencias a este punto es recogida en un cilindro graduado que contiene algún éter etílico para disolver el aceite esencial extraído por el vapor, que por su naturaleza liofílica, presenta una mayor afinidad para el solvente. La fase orgánica es entonces tratada con natrium sulfato anhidro, filtrada y evaporada (Boelens 1991, De Pooter 1991, Magiatis 1999, Papageorgiou 1981). La destilación normalmente duró hasta cuatro horas con calentamiento constante; el peso inicial medio de la muestra fue: hojas (450 g), ramas (250 g), bayas (100 g), flores (270 g). El rendimiento para las diversas partes de la planta, expresada como porcentaje del peso inicial mojado fue: hojas (0,05%), ramas (0,06%), bayas (0,11%), flores (0,08%), agallas (0,40%).

Determinación de la composición química del aceite

La composición química de los aceites esenciales obtenidos por *P. lentiscus*, *P. terebinthus*, *P. vera* y *P. integerrima* fue determinada mediante análisis gascromatográfico acoplado a un espectro fotómetro de masa detector (GC/MS) utilizando un sistema operativo Hewlett-Packard 6890-5973 en modalidad provista El (ionización electrónica con potencial 70 eV), equipado con columna capilar HP-5 MS (30 m x 0,25 mm), con grosor de la película igual a 0,25 m, fase estacionaria de polidimetil siloxano al 95%. Se operó aplicando un programa de temperatura empezando de 60°C para los primeros tres minutos subiendo hasta 280° con una velocidad de 3°C/min. durante 5 minutos; el Inyector se mantuvo a 200°C. El espectro obtenido se comparó con los espectros de masa de Wiley (Boelens 1991, De Pooter 1991, Magiatis 1999, Papageorgiou 1981).

ES 2 366 152 T3

Ensayos biológicos

Preparación de muestras: la solución madre de aceites esenciales (9%) se preparó en DMSO (1%) y en medio de cultivo (90%). Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones estériles. Antes de cada experimento las soluciones madre se diluyeron con medio de crecimiento y se usaron inmediatamente.

Líneas celulares: la toxicidad se evaluó en tres líneas celulares de adenocarcinoma humano: ovárico (2008), mama (MCF-7), colon (LoVo).

La línea celular de adenocarcinoma ovárico humano 2008, amablemente suministrado por el profesor G. Marveti (Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Modena) y fue mantenido en RPMI 1640 medio suplementado con 10% FCS (suero fetal de ternera) inactivado por calor, 1% antibióticos (todos los productos de Biochrom KG Seromed, Berlín) y 1% 2 mM glutamina (Merck).

Las líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, suministradas por el instituto de Zooprofilaxis experimental de Lombardía y Emilia (Brescia, Italia), fueron cultivadas en MEM con sales de Eagle, más diez 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor, 1% antibióticos y piruvato sódico (todos los productos de Biochrom KG Seromed), 1% 200 mM glutamina (Merck).

La línea celular de adenocarcinoma de colon humano LoVo, amablemente suministrado por el Dr. G. Toffoli, Centro de Referencia Oncológico, Aviano, Italia. La línea celular fue cultivada en Ham's F12 con la adición de 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor, 1% glutamina 200 mM (Merck), y 1% piruvato sódico (Seromed Biochrom KG, Berlín).

Citotoxicidad: las células (1×10^5 células/ml) fueron sembradas en placas de tejido de 96 pocillos (Falcon) y tratadas 24 horas después con cada aceite esencial a diferentes concentraciones. Después de tres horas de exposición, el medio fue descartado, las placas fueron lavadas con PBS estéril y luego añadidas con medio de crecimiento.

El efecto citotóxico fue evaluado mediante sales de tetrazolio ensayo de reducción (MTT) después de 21 horas de incubación. Una cantidad de 20 μ L de solución MTT (5 mg/mL en PBS) se añadió a cada pocillo, y placas fueron incubadas durante 4 horas a 37°C. Se añadió DMSO (150 μ L) a todos los pocillos y se mezcló concienzudamente para disolver los cristales azul oscuro. La absorbancia se midió en un lector de placa de microcultivo (Titertek Multiscan) utilizando una longitud de onda de ensayo de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm.

Análisis estadístico: el IC_{50} se determinó mediante análisis de regresión lineal, después de transformación logit (Rodbard 1975) y la curva de respuesta-dosis más adecuada fue elaborada por Software "GraphPad Prism Version 3.0". Para cada ensayo los experimentos se realizaron por triplicado y cada aceite esencial fue probado por triplicado en tres líneas celulares diferentes.

Ensayo nitrito: la concentración de nitrito en el medio de cultivo se midió como un indicador de producción de óxido nítrico utilizando reacción Griess. Cien microlitros de cada sobrenadante se mezclaron con el mismo volumen de reactivo Griess A (1% sulfanilamida en 5% de ácido fosfórico) y después de diez minutos, se añadió 100 μ l de reactivo Griess B (0,1% diclorhidrato de naftiletilendiamina en agua). Después de 15 minutos la absorbancia de la mezcla se determinó en 543 nm.

Citofluorimetría: las células se recogieron y enjuagaron dos veces con PBS frío y luego se resuspendieron en tampón de unión 1X a una concentración de 1×10^6 células/ml. Transferencia de 100 μ l de la solución (1×10^5 células) a un tubo de cultivo de 5 ml. 5 μ l de Annexin V-FITC y 5 μ l de PI fueron añadidos. Las células son agitadas suavemente en un vórtex e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) en la oscuridad. 400 μ l de tampón de unión 1X fueron entonces añadidos a cada tubo y muestras analizadas por citometría de flujo al cabo de una hora. Annexin V es una proteína de unión de fosfolípidos dependiente 35-36 kDa Ca^{2+} que tiene una elevada afinidad para el PS, y se enlaza con células con PS expuesto. Annexin V puede ser conjugado a fluorocromos tales como Yoduro de Propidio (PI). Este formato retiene su elevada afinidad para el PS y de este modo sirve como una sonda sensible para el análisis de flujo citométrico de células que están experimentando apoptosis. Puesto que la externalización del PS ocurre en las fases tempranas de apoptosis, la coloración Annexin V-FITC puede identificar la apoptosis en una fase más temprana que los ensayos basados en cambios nucleares tales como fragmentación de ADN. La coloración Annexin V-FITC precede la pérdida de integridad de membrana que acompaña a las últimas etapas de la muerte celular que resulta de los procesos apoptóticos o necróticos. Por lo tanto, la coloración con Annexin V-FITC es utilizada típicamente junto con un colorante vital tal como Yoduro de Propidio para permitir al investigador identificar células apoptóticas tempranamente (Annexin V-FITC positivo, PI negativo). Por ejemplo, células que son viables son Annexin V-FITC y PI negativo; células que están en apoptosis temprana son Annexin V-FITC positivo y PI negativo; y células que están en apoptosis tardía o ya muertas son tanto Annexin V-FITC como PI positivo. Este ensayo no distingue *per se* entre células que ya han sufrido muerte apoptótica y las que han muerto como resultado de una vía necrótica porque en cada caso, las células muertas colorearán tanto con Annexin FITC como con PI. Sin embargo, cuando la apoptosis es medida con el tiempo, las células pueden a menudo ser rastreadas de Annexin V-FITC y PI negativo (viable, o apoptosis no medible), a Annexin V-FITC positivo y PI negativo (apoptosis temprana, la integridad de membrana está presente) y finalmente a Annexin V-FITC y PI positivo (apoptosis de etapa final y muerte). El movimiento de células a través de estas tres etapas sugiere la apoptosis. En contraste, una única observación indicando que las células son

ES 2 366 152 T3

tanto Annexin V-FITC como PI positivas por sí misma revela menos información acerca del proceso mediante el cual las células sufrieron la muerte.

5 *Reactivos*

1. Annexin V-FITC
2. Yoduro de Propidio
- 10 3. 10X Annexin V tampón de unión

15 *Coloración*

1. Lavar las células dos veces con PBS frío y luego resuspender las células en tampón de unión 1X a una concentración de 1×10^6 células/ml.
2. Transferir $100 \mu\text{l}$ de la solución (1×10^5 células) a un tubo de cultivo de 5 ml.
- 20 3. Añadir $5 \mu\text{l}$ de Annexin V-FITC y $5 \mu\text{l}$ de PI.
4. Mezclar suavemente las células e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) en la oscuridad.
- 25 5. Añadir $400 \mu\text{l}$ de tampón de unión 1X a cada tubo. Analizar mediante citometría de flujo al cabo de una hora.

Los resultados se muestran en la tabla 1a, Tabla 1b y Tabla 1c.

Los resultados mostrados en la tabla 1a y tabla 1b no hacen referencia a la invención reivindicada.

35 (Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 366 152 T3

TABLA 1a
Composición *P. Lentiscus*

RT*	Composición de aceite	Aceite Portugues	Hojas					Frutos			Ramas	
			DM1C	DM2A1	DM3Z	DMF1	DMP	DMG2	DM3P	DM72	DM2Z	
6.08	Triciclono	-	0.33	0.58	0.14	0.06	-	-	-	0.90	-	
6.22	α -Felandreno	-	1.51	0.12	0.14	0.20	0.61	-	0.20	-	0.14	
10	6.48	α -Pinoeno	12.62	11.45	12.97	9.17	24.68	20.13	6.11	40.68	18.15	13.73
	6.94	Canfeno	2.12	1.46	2.49	0.52	0.58	1.06	-	0.98	3.90	0.22
	7.78	Sabineno	0.76	4.31	4.56	2.87	2.32	0.99	1.21	0.86	2.83	6.77
	7.88	β -Pinoeno	3.82	3.07	4.38	1.15	8.64	4.13	0.48	7.60	4.19	0.94
15	8.40	β -Mirceeno	8.40	0.97	0.67	4.45	0.91	23.80	57.79	1.08	4.08	5.47
	8.86	1-Felandreno	-	4.64	0.80	4.60	2.12	3.84	3.79	0.92	0.81	8.35
	9.33	α -Terpineno	-	4.66	3.60	3.76	3.11	2.71	0.90	1.13	0.72	1.73
	9.69	Paracimeno	7.79	0.64	0.22	0.50	0.35	0.48	0.34	0.16	0.42	0.98
20	9.81	β -Felandreno	-	6.48	4.93	5.79	11.35	6.48	3.44	8.03	-	6.61
	9.89	Limoneno	18.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10.21	Cis-Ocimeno	-	0.60	0.35	1.00	0.72	-	0.29	0.22	1.08	0.61
	10.62	Trans- β -Ocimeno	-	0.41	0.23	0.53	0.46	-	0.57	-	0.32	0.23
25	10.96	Ácido Butanoico	-	-	-	0.55	-	-	1.07	-	-	-
	11.03	γ -Terpineno	-	7.42	5.90	6.11	4.89	4.93	1.85	2.24	1.51	2.96
	12.26	α -Terpinoleno	-	2.48	2.08	2.35	2.59	2.08	0.63	2.27	0.64	1.04
	12.49	2-Nonanona	-	0.34	0.17	0.19	0.63	0.44	0.31	1.65	-	-
30	15.74	Endoborneol	6.90	0.12	0.34	-	0.24	0.32	-	0.65	-	-
	16.20	1-4 Terpineol	3.08	14.89	12.26	13.11	7.12	8.78	4.09	2.63	3.03	6.98
	16.79	α -Terpineol	0.72	4.92	5.36	6.42	7.41	7.97	1.11	9.83	1.41	1.13
	19.44	Ácido octanoico	-	0.18	0.13	0.22	-	-	-	0.54	-	0.17
35	21.04	Acetato de bornilo	28.19	2.12	1.77	0.17	-	1.94	-	-	0.98	0.28
	21.42	2-Undecanona	0.60	0.69	0.19	0.55	0.99	0.41	0.59	1.38	1.47	0.65
	24.77	α -Ylangene	-	0.42	0.87	0.70	-	-	0.32	-	0.46	0.60
	25.39	β -Cubebeno	-	-	0.25	0.21	-	-	-	-	-	0.34
40	25.47	β -Elemeno	-	0.15	0.19	0.23	0.11	-	-	-	0.52	0.51
	26.61	β -Cariofileno	1.63	2.79	3.21	3.24	4.02	0.44	0.81	1.18	3.91	1.70
	27.85	α -Cubebeno	-	-	0.05	0.24	-	-	-	-	-	-
	27.96	α -Humuleno	-	1.02	0.88	1.13	0.48	0.25	0.37	-	1.10	0.60
45	28.99	α -Amorfeno	0.43	0.85	1.51	1.30	0.17	0.35	0.80	0.39	1.16	1.13
	29.10	Germacreno D	-	4.71	6.82	5.00	1.37	2.06	2.76	1.23	8.36	8.32
	29.66	α -Elemeno	-	0.33	0.41	0.51	0.26	-	-	0.35	0.90	0.99
	29.89	α -Muroleeno	-	0.71	1.21	1.07	0.33	-	0.68	0.44	0.98	0.93
50	30.05	Germacreno A	-	0.14	0.18	0.30	0.16	-	-	-	0.44	0.68
	30.42	Butilhidroxitoluol	-	0.60	0.81	1.36	0.44	0.88	1.23	1.72	4.33	1.25
	30.81	δ -Cadineno	-	2.82	4.80	4.40	1.11	1.32	3.28	1.74	4.44	3.99
	33.20	Óxido de cariofileno	2.53	-	-	-	0.12	-	-	-	0.83	-
55	34.79	Cadino 1,4-Dieno	-	0.83	1.26	1.50	0.20	-	0.46	-	0.86	0.71
	34.92	γ -Eudesmol	-	1.21	0.96	1.07	0.48	0.41	0.63	0.28	-	0.61
	35.31	α -Cadinol	-	2.50	3.29	4.13	1.63	0.76	1.96	0.97	3.18	2.70
	35.45	α -Copaeno	-	0.75	1.03	1.29	0.49	-	0.53	0.31	1.22	0.81
60	35.58	β -Eudesmol	-	0.47	0.31	0.41	0.19	-	-	0.20	-	0.46
	35.80	T-Cadinolo	0.85	3.16	3.90	4.73	2.61	1.15	2.79	1.68	4.53	3.77
	56.28	Nonadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	61.56	Octadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	67.79	4 cloro 2 fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	67.96	Benzeno 1 Metoxi 2,3,5 Trimet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	69.78	4,12 bisHidroximetilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 1b. Composición: *P. terribilinus*

RT ^a	Composición de aceite	Hojas						Frutos						Agallas						Flores		Ramas		
		DMF2	DMF5	DMF72X	DMF5XX	DM44	DM46	DM4C	DMK	DMF3	DMG1	DM1P	DM5C	DM6C	DM5C	DM6C	DM6C	DM5C	DM6C	DM5C	DM6C			
6.08	Trilino																				0.48	0.45	0.18	0.36
6.22	α-Pineno	35.63	12.17	41.63	11.61	14.09	60.99	10.04	10.99	18.67	31.63	2.69	54.19	42.16	28.90	26.43	28.72				0.21			
6.48	Camfeno	0.55	0.26	1.62			1.56	0.24	0.37	0.46	1.50	0.48	0.69	0.67	2.12	1.83	1.06							
7.78	Sabineno				0.62	0.39		0.22	0.15	0.28	1.28	0.65	0.65	0.18	2.00	0.91	4.53							
7.88	β-Pineno	1.12	1.14	6.17	1.39	0.71	1.87	0.32	1.48	3.27	7.44	1.39	3.68	1.81	6.40	5.85	4.07							
3.40	β-Mirceno	1.57	1.68	1.37	1.82	2.03	1.98	1.41	1.60	2.90	1.11	1.05	1.42	1.68	0.97	1.67								
2.86	β-Felandreno	0.62	0.35	0.49	0.75	0.62	0.47	0.19	0.29	0.27	3.36	7.66	0.69	6.61	0.32	0.37	0.39							
9.35	α-Terpineno		0.03	0.63	0.71		0.44		0.21	0.34	0.25	0.34			0.53	0.51	1.46							
9.69	γ-Pineno						0.11								0.19	0.20	0.49							
9.81	β-Felandreno																							
9.89	γ-Pineno	27.45	50.78	6.09	21.84	69.47	6.16	1.23	8.03	69.74	12.59	32.85	13.97	31.07	28.76	23.03	6.56							
10.21	β-Ocimeno	19.63	15.64	10.93	20.97	3.86	6.31	63.60	54.19	0.96	6.79	17.99	1.89	0.37		3.88	13.64							
10.62	Trans-F-Ocimeno	5.49	4.45	3.80	6.06	1.17	1.86	18.29	16.46	0.38	1.56	5.01	0.42			1.22	1.53							
10.96	Ácido butírico																							
11.03	γ-Terpineno	0.22	0.69	0.48	0.62		0.49	0.17	0.54	0.69	0.33	0.42	0.12		1.08	0.77	2.46							
12.26	α-Terpineno	0.92	0.93	17.87	16.59	4.90	7.13	0.38	0.46	1.76	0.64	1.27	0.26	0.21	0.57	2.99	1.08							
12.49	α-Nonano																							
15.74	Endobornol																							
16.20	1-β-Terpinol	0.31	1.63	0.29	1.86	1.21	0.29	0.35	0.50	0.46	1.00	0.87	0.18	0.18	2.86	1.55	8.91							
16.79	α-Terpinol	1.63	4.05	5.22	1.92	1.18	2.23	1.35	1.22	2.87	2.45	0.93	0.35	1.36	1.69	1.45	2.26							
19.44	Ácido octanoico																							
21.06	Acetato de bornilo																							
21.42	1-Octenano																							
24.77	α-Undeceno	0.23	0.16																					
25.39	β-Cubebeno																							
25.47	β-Zimeno																							
26.61	β-Cariofileno	3.23	1.30	2.75	4.72	2.00	3.86	0.62	1.29	3.43	4.77	1.64	1.33	0.94	0.97	8.65	1.06							
27.85	α-Cubebeno	0.47	0.32		0.86	1.07	1.21			1.46	1.47	0.55	2.15	0.33	0.63	1.24	0.22	0.74						
27.96	α-Humuleno		0.24					0.17		0.30	0.55	0.24			0.15	0.43	0.48	0.77						
28.99	α-Amarfeno							0.14	0.45				2.24	9.62	2.91	5.37	2.44	2.91						
29.10	Geranaceno D	0.23	0.62		1.56	1.40						0.18					3.46							
29.66	α-Elemano																							
29.89	α-Mirceno										0.25				0.33	0.27	0.47							
30.05	Geranaceno A														0.14									
30.42	Buzilacrisolololol	0.32	0.77	0.37	3.34	2.36	0.62	0.46	0.45	0.55	0.58	0.56	0.30	0.65	1.56	1.58	1.82							
30.81	β-Cadineno	0.44	0.67		1.32	0.92	0.31	0.31	0.63	0.61	0.40	0.23	0.31	0.55	1.22	3.61	3.51							
33.20	Oxido de terpenileno		0.25				0.27																	
34.79	Cajiso 1,4-Diene																							
34.92	γ-Eudemol																							
35.31	α-Cadinol														0.70									
35.45	α-Copreno														0.21	0.81	0.73	0.53						
35.58	β-Eudemol														0.21									
35.86	T-Cadidol														0.50	1.34	0.87	0.36						
56.28	Nonadecano															2.20	1.04							
61.56	Oxidecano										0.25					1.99	0.71							
67.79	ácido 8 fenilbutírico				0.47																			
67.96	Biseno 1-Miroxi 3,6,9-T-Triol																							
69.78	6,12 bis Hidroxirido																							

ES 2 366 152 T3

TABLA 1c

Composición de *P. Vera* (DMIS) y *P. Intergerrima* (DMNP)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

RT ^a	Composición de aceite	DMIS DMNP	
		Frutos secos	Agallas
6.08	Tricileno	-	-
6.22	α-Felandreno	-	-
6.48	α-Pineno	0.99	14.41
6.94	Canfeno	-	0.94
7.78	Sabineno	-	2.51
7.88	β-Pineno	-	5.62
8.40	β-Mirceno	-	2.81
8.86	1-Felandreno	-	0.56
9.33	α-Terpineno	-	0.80
9.69	Paracimeno	-	2.09
9.81	β-Felandreno	-	-
9.89	Limoneno	1.54	5.94
10.21	Cis-Ocimeno	-	-
10.62	Trans-β-Ocimeno	-	-
10.96	Ácido butanoico	-	-
11.03	γ-Terpineno	-	1.52
12.26	α-Terpinoleno	-	0.58
12.49	2-Nonanona	-	-
15.74	Endoborneol	-	3.12
16.20	1-4 Terpineol	2.13	29.52
16.79	α-Terpineol	2.56	14.08
19.44	Ácido octanoico	-	-
21.04	Acetato de bornilo	-	4.55
21.42	2-Undecanona	-	-
24.77	α-Ylangene	-	-
25.39	β-Cubebeno	-	-
25.47	β-Elemenol	-	-
26.61	β-Cariofileno	0.60	2.81
27.85	α-Cubebeno	-	-
27.96	α-Humuleno	-	-
28.99	α-Amorfeno	-	-
29.10	Germacreno D	0.62	-
29.66	α-Elemenol	-	-
29.89	α-Muroloeno	-	-
30.05	Germacreno A	-	-
30.42	Butilhidroxitoluol	15.74	-
30.81	δ-Cadineno	0.66	-
33.20	Oxido de cariofileno	-	-
34.79	Cadino 1,4- Dieno	-	-
34.92	γ-Eudesmol	-	-
35.31	α-Cadinol	-	-
35.45	α-Copaeno	-	-
35.58	β-Eudesmol	-	-
35.80	γ-Cadinolo	-	-
56.28	Noñadecano	-	-
61.56	Octadecano	-	-
67.79	4 cloro 2 fenilaniлина	32.88	-
67.96	Benzeno 1 Metoxi 2,3,5 Trimet	25.63	-
69.78	4,12 bis Hidroximetilo	4.29	-

RT^a = Composición de aceite

Resultados de los test biológicos

A continuación hay algunos ejemplos de resultados obtenidos evaluando la citotoxicidad de diversos aceites esenciales contra las líneas celulares tumorales seleccionadas (MCF-7, LoVo y 2008) y mostraron que el aceite de las hojas del *P. lentiscus* portugués (véase tabla 1 a para la composición) fue activo para inducir un efecto citotóxico (Figura 1) con IC₅₀ de 248 (242,3-255,7) µg/ml en células MCF-7, 181,5 (166,5-197,7) µg/ml en células 2008 y 181,4 (163,7-201,3) µg/ml en células LoVo. El efecto citotóxico también fue ensayado utilizando algunos de los componentes únicos del aceite y el único componente testado activo, en nuestras condiciones experimentales, fue acetato de bornilo (figura 2), pero cuando este compuesto se utilizó a la concentración equivalente del aceite, resultó inactivo (figura 2). Entre los componentes únicos testados, el limoneno, que ha sido informado en la literatura como que tiene efectos antitumorales, no demostró ser activo en nuestras condiciones experimentales.

Otros resultados mostraron que los aceites esenciales de Pistacia fueron capaces de reducir el crecimiento celular. En particular, DM1C (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7 con IC₅₀ de 239,8 (137,5-418,3) µg/ml (figura 3). DM2A1 (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad tanto en líneas celulares 2008 como LoVo con IC₅₀ de 220,4 (107,0-454,2) µg/ml y 398,8 (368,3-431,8) µg/ml, respectivamente (Fig. 4) DM3Z (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad tanto en líneas celulares MCF-7, 2008 y LoVo con IC₅₀ de 707,5 (613,1-816,4) µg/ml, 412,1 (330,4-514,0) µg/ml y 460,2 (350,1-604,7) µg/ml, respectivamente (Fig. 5). DMF1 (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad tanto en líneas celulares MCF-7, 2008 y LoVo con IC₅₀ de 499,4 (447,9-556,9) µg/ml, 667,2 (494,3-900,7) µg/ml y 452,0 (403,1-506,9) µg/ml, respectivamente (Fig. 6). DMP (aceite extraído de una muestra de bayas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares 2008 con IC₅₀ de 519,4 (439,3-614,1) µg/ml (Fig 7). DMG2 (aceite extraído de una muestra de bayas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares LoVo con IC₅₀ de 407,5 (371,3-447,1) µg/ml (Fig 8). DM3P (aceite extraído de una muestra de bayas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares LoVo con IC₅₀ de 539,3 (475,0-621,3) µg/ml (Fig. 9). DM72 (aceite extraído de una muestra de ramas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7, 2008 y LoVo con IC₅₀ de 356,1 (295,1-429,7) µg/ml, 388,0 (334,6-450,0) µg/ml y 369,1 (334,1-407,7) µg/ml, respectivamente (Fig. 10). DM2Z (aceite extraído de una muestra de ramas de *P. lentiscus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares 2008 con IC₅₀ de 375,7 (201,1-702,0) µg/ml (Fig. 11).

DM1Z (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad tanto en líneas celulares 2008 como LoVo con IC₅₀ de 411,7 (336,4-462,5) µg/ml y 439,9 (311,5-621,2) µg/ml, respectivamente (Fig. 12). DMF3 (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7, 2008 y LoVo con IC₅₀ de 501,2 (429,6-584,7) µg/ml, 464,1 (384,0-560,9) µg/ml y 464,4 (421,9-511,3) µg/ml, respectivamente (Fig. 13). DMV2X (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares LoVo con IC₅₀ de 427,6 (411,7-444,2) µg/ml (Fig. 14). DMV5X (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7, 2008 y LoVo con IC₅₀ de 392,0 (357,1-430,4) µg/ml, 325,0 (238,9-442,1) µg/ml y 410,1 (383,4-438,6) µg/ml, respectivamente (Fig. 15). DM4a (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares LoVo con IC₅₀ de 406,7 (367,2-450,4) µg/ml (Fig. 16). DM4p (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad tanto en líneas celulares 2008 como LoVo con IC₅₀ de 398,0 (367,0-431,5) µg/ml y 400,4 (270,0-593,6) µg/ml, respectivamente (Fig. 17). DM5a (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares 2008 con IC₅₀ de 371,5 (292,0-472,8) µg/ml (Fig. 18). DM4C (aceite extraído de una muestra de hojas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7, 2008 y LoVo con IC₅₀ de 572,6 (424,8-771,8) µg/ml, 509,2 (428,9-604,4) µg/ml y 394,2 (275,7-563,7) µg/ml, respectivamente (Fig. 19). DMK (aceite extraído de una muestra de bayas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares 2008 con IC₅₀ de 557,8 (487,8-637,8) µg/ml (Fig. 20). DMF2 (aceite extraído de una muestra de bayas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7, 2008 y LoVo con IC₅₀ de 512,9 (323,6-812,9) µg/ml, 453,2 (403,7-508,7) µg/ml y 411,8 (276,4-613,6) µg/ml, respectivamente (Fig. 21). DM1P (aceite extraído de una muestra de agallas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7 con IC₅₀ de 254,9 (243,3-267,1) µg/ml (Fig. 22). DMG1 (aceite extraído de una muestra de agallas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7 y 2008 con IC₅₀ de 503,3 (470,9-537,9) µg/ml y 591,9 (509,2-688,0) µg/ml, respectivamente (Fig. 23). DM2C (aceite extraído de una muestra de flores de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares LoVo con IC₅₀ de 441,0 (404,4-481,0) µg/ml (Fig. 24). DM3C (aceite extraído de una muestra de flores de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares LoVo con IC₅₀ de 345,2 (297,8-400,1) µg/ml (Fig. 25). DM2P (aceite extraído de una muestra de ramas de *P. terebinthus*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares LoVo con IC₅₀ de 405,6 (355,5-462,7) µg/ml (Fig. 26).

DM1S (aceite extraído de una muestra de frutos secos de *P. vera*) resultó activo para inducir la citotoxicidad en líneas celulares MCF-7 con IC₅₀ de 280,8 (252,4-312,3) µg/ml (Fig. 27).

DMNP (aceite extraído de una muestra de agallas de *P. integerrima*) resultó activo para inducir la citotoxicidad tanto en líneas celulares 2008 como LoVo con IC₅₀ de 359,0 (328,1-392,9) µg/ml y 444,7 (418,3-472,8) µg/ml, respectivamente (Fig. 28).

Sólo DM1S y DMNP son aceites utilizados en la invención reivindicada.

Las actividades de DM2A1, DM1Z, DM3Z, así como la del aceite de Portugal también fueron testadas con dos ensayos citofluorimétricos para analizar la naturaleza de la muerte celular (Annexin V más Yoduro de Propidio; producción NO), que resultaron mayoritariamente en muerte apoptótica para todos los aceites.

Los ensayos citofluométricos indicaron un efecto citotóxico con los mismos aceites fig. 29-30.

Los resultados obtenidos evaluando la concentración de nitrito en el medio de cultivo de células 2008 tratado para 1,5 y 3 h con DM2A1, DM1Z y DM3Z indicaron la activación de mecanismos apoptóticos. Debería señalarse que estos resultados estuvieron de acuerdo también con los estudios citotóxicos, de hecho aumentando el NO detectado en medio, aumentando el efecto citotóxico: DM2A1 fue el aceite más citotóxico en células 2008 y fue capaz de inducir la mayor producción de NO.

Referencias

➤ **Boelens M. H., Jemenez R.** Chemical composition of the essential oil from the gum and various parts of *Pistacia lentiscus* L. (Mastic Giim Tree). *Flav. Fragr. J.*, 6:271-275, 1991.

➤ **Buffoni F.** La natura come fonte inesauribile di farmaci. *Acta Phytotherapeutica.*, 2, 3-6, 1996.

➤ **Buil P. et al.** Contribution à la connaissance de la composition chimique de l'essence de lentisque de Provence. *Riv. Ital. EPPOS Cosmet Aerosol.*, 56:245-252, 1975.

➤ **Calabro G., Curro P.** Costituenti degli oli essenziali Nota IV. Essenza di lentisco. *Essence Deriv. Agrum.*, 44:82-92, 1974.

➤ **Castola V. et al.** Intraspecific chemical variabilità of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochem. System. Ecol.*, 28:79-88, 2000.

➤ **Chander S. K., Lansdown A. G. B., Luqmani Y. A., Gomm J. J., Coope R. C., Gould M. N. & Coope R. C. Gould M. N. & Coombes R. C.** Effectiveness of combined limonene and 4-hydroxyandrostenedione in the treatment of NMU-induced rat mammary tumors. *Br. J. Cancer.*, 69:879-882.

➤ **Colombini M. P. et al.** Characterization of the balm of an Egyptian mummy from the seventh century B.C. *Studies in Conservation.*, 45:19-29, 2000.

➤ **Conner D. E., Beuchat L. R.** Sensitivity of heat stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:229-233, 1984.

➤ **Cragg G. M. et al.** Natural products in drug discovery and development. *J. Nat Prod.*, 60:52-60, 1997.

➤ **Cragg G. M., Newman D. J.** Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest.*, 17:153-163, 1999.

➤ **Croteau R.** Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev.*, 87:929-954, 1987.

➤ **Crowell P. L., Kennan W. S., Haag J. D., Ahmad S., Vedejs E. & Gould M. N.** Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of *d*-limonene. *Carcinogenesis.*, 13:1261-1264, 1992.

➤ **Crowell P. L., Elson, Bailey, H. H., C. E., Elegbede A., Haag J. H., Gould M. N.** Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent *d*-limonene. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 35:31-37, 1994 (a).

➤ **Crowell P. L., Gould M. N.** Chemoprevention and therapy of cancer by *d*-limonene. *CRC. Crit. Rev. Oncogenesis.*, 5:1-22, 1994 (b).

➤ **Crowell P. L. et al.** Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment. *Plenum Press, New York*, 1996.

➤ **Crowell P. L.** Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J. Nutr.*, 129(3):775S-778S, 1999.

➤ **De Pooter H. L. et al.** Essential oil of the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flav. Fragr. J.*, 6:229-232, 1991.

➤ **Dietrich D. R. & Swenberg J. A.** The presence of α_{2u} -globulin is necessary for *d*-limonene promotion of male rat kidney tumors. *Cancer Res.*, 51:3512-3517, 1991.

ES 2 366 152 T3

- **Elegbede J. A., Elson C. E., Qureshi A., Tanner M. A. & Gould M. N.** Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpene *d*-limonene. *Carcinogenesis.*, 5:661-665, 1984.
- **Elegbede J. A., Maltzman T. H., Verma A. K., Tanner M. A. & Gould M. N.** Mouse skin tumor promoting activity of orange peel oil and *d*-limonene: a reevaluation. *Carcinogenesis.*, 7:2047-2049, 1986 (a).
- **Elegbede J. A., Elson C. E., Tanner M. A., Qureshi A. & Gould M. N.** Regression of rat primary mammary tumors following dietary *d*-limonene. *J. Natl Cancer Inst.*, 76:323-325, 1986 (b).
- **Elson C. E., Maltzman T. H., Boston J. L., Tanner M. A. & Gould M. N.** Anti-carcinogenic activity of *d*-limonene during the initiation and promotion-progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis.*, 9:331-332, 1988.
- **Elson C. E., Yu S. G.** The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. *J. Nutr.*, 124:607-614, 1994.
- **Elson C. E.** Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer roles in cancer and cardiovascular disease. *J. Nutr.*, 125:1666S-1672S, 1995.
- **Evans E., Arneson D., Kovatch R., Supko J., Morton T., Siemann L., Cannon R., Tomaszewski J., Smith A.** Toxicology and pharmacology of perillyl alcohol (NSC-641066) in rats and dogs. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 36:366, 1995.
- **Farnsworth N. R. et al.** Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organ.*, 63:965-981, 1985.
- **Farnsworth N. R.** The role of ethnopharmacology in drug development. *Ciba Found Symp.*, 154:2-11, 1990.
- **Giner-Larza Eva M. et al.** On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A₂ activity of extract from lanostane-rich species. *ETH.J.*, 73:61-69, 2000.
- **Gould M. N., Moore C. J., Zhang R., Wang B., Kennan W. S. & Haag J. D.** Limonene chemoprevention of mammary carcinoma induction following direct *in situ* transfer of v-Ha-ras. *Cancer Res.*, 54:3540-3543, 1994.
- **Haag J. D., Lindstrom M. J. & Gould M. N.** Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 52:4021-4026, 1992.
- **Haag J. D. & Gould M. N.** Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 34:477-483, 1994.
- **Hursting S. D., Perkins S. N., Haines D. C., Ward J. M. & Phang J. M.** Chemoprevention of spontaneous tumorigenesis in p53-knockout mice. *Cancer Res.*, 55:3949-3953, 1995.
- **Huwez F. U. et al.** Mastic Gum Kills *Helicobacter pylori*. *N. Engl. J. Med.*, 339(26):365, 1998.
- **Jeffers L., Church D., Gould M. and Wilding G.** The effect of perillyl alcohol on the proliferation of human prostatic cell lines. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 36:303, 1995.
- **Jirtle R. L., Haag J.D., Ariaza E., Gould M. N.** Increased mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and transforming growth factor b 1 levels during monoterpene-induced regression of mammary tumors. *Cancer Res.*, 53:3849-3853, 1993.
- **Kawamori T., Tanaka T., Hirose Y., Ohnishi M. & Mori H.** Inhibitory effects of *d*-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis.*, 17:369-372, 1996.
- **Kawata S., Nagase T., Yamasaki E., Ishiguro H., Matsuzwawa Y.** Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and *d*-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br. J. Cancer.*, 69:1015-1020, 1994.
- **Magiatis P. et al.** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Pistacia lentiscus* var.chia. *Planta Med.*, 65(8):749-752, 1999.
- **Maltzman T. H., Hurt L. M., Elson C. E., Tanner M. A. & Gould M. N.** The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by *d*-limonene and orange oil. *Carcinogenesis.* 10:781-785, 1989.
- **Marone P. et al.** Bacterial activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *J. Chemoth.*, 13(6):611-614, 2001.
- **McNamee D.** Limonene trial in cancer. *Lancet.*, 342:801, 1993.

ES 2 366 152 T3

➤ **Mills J. J., Chari R. S., Boyer I. J., Gould M. N., & Jirtle R. L.** Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res.* 9 55:979-983, 1995.

5 ➤ **Papageorgiou V. P. et al.** GLC-MS computer analysis of the essential oil of mastic gum. *Chim. Chronica, New Ser.*, 10:119-124, 1981.

➤ **Phillips L. R., Malspeis L. & Supko J. G.** Pharmacokinetics of active drug metabolites after oral administration of perillyl alcohol, an investigational antineoplastic agent, to the dog. *Drug Metab. Dispos.*, 23:676-680.

10 ➤ **Ray M., Kratz D., Lewis K., Hohl R. J.** Effects of combinations of lovastatin and monoterpenes on ras processing, *Proc of AACR.*, 36:428, 1995.

➤ **Ren Z. and Gould M. N.** Inhibition of ubiquinone and cholesterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett.* 76:185-190, 1994.

15 ➤ **Rodbard D and Frazier G. R.** Statistical analysis of radioligand assay data. *Methods Enzymol.* 37:3-22; 1975.

➤ **Russih W. A., Hoesly J. D., Elson C. E., Tanner M. A. & Gould M. N.** Inhibition of rat mammary carcinogenesis by monoterpenoids. *Carcinogenesis.*, 10:2161-2165, 1989.

20 ➤ **Sanz M. J. et al.** In vivo hypotensive activity of *Pistacia lentiscus* L. *Phytother. Res.*, 2(4):201-203, 1988.

➤ **Scurbis B., Markakis P.** Essential oil of mastic gum. *Int. Flavours Food Addit.*, 6:349, 1975.

25 ➤ **Shoff S. M., Grummer M., Yatvin M. B. & Elson C. E.** Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. *Cancer Res.*, 51:37-42, 1991.

➤ **Stark M. J. et al.** Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer lett.*, 96 (1):15-21, 1995.

30 ➤ **Wattenberg L. W.** Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, 43:2448s-2453s, 1983.

➤ **Wattenberg L. W., Sparnins. V. L. & Barany G.** Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res.*, 49:2689-2694, 1989.

35 ➤ **Wattenberg L. W., & Coccia J. B.** Inhibition of 4-methylnitrosoamino)-1-butanone carcinogenesis in mice by *d*-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis.*, 12:115-117, 1991.

➤ **Wyllie S. G. et al.** Volatile components of the fruits of *Pistacia lentiscus*. *J. Food Sci.*, 55:1325-1326, 1990.

40 ➤ **Yu S. G., Hildebrandt L. A. & Elson C. E.** Geraniol, an inhibitors of mevalomate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *J. Nutr.*, 125:2763-2767, 1995.

45

50

55

60

65

ES 2 366 152 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un aceite esencial obtenido de una planta del género Pistacia seleccionada de *P. vera* y *P. integerrima* para fabricar un medicamento para tratar o prevenir el cáncer en mamíferos, incluyendo a los humanos, mediante la administración de una cantidad efectiva.

2. Uso de la reivindicación 1, en el que las plantas del género Pistacia seleccionadas de *P. vera* y *P. integerrima* son de origen europeo y asiático.

10 3. Uso de la reivindicación 1, en el que el aceite esencial es un aceite esencial obtenido a partir de semillas de *P. vera* de origen italiano.

15 4. Uso de la reivindicación 3, en el que el aceite esencial es un aceite esencial obtenido a partir de semillas de *P. vera* de Sicilia.

5. Método de la reivindicación 1 en el que el aceite esencial es un aceite esencial de las agallas de *P. integerrima* de origen asiático.

20 6. Método de la reivindicación 5 en el que el aceite esencial es un aceite esencial obtenido a partir de las agallas de *P. integerrima* de Nepal.

7. Uso de la reivindicación 1 en el que el cáncer es adenocarcinoma de mama y el aceite esencial es seleccionado del grupo consistente en aceites esenciales obtenidos de los frutos secos de *P. vera* de Italia.

25 8. Uso de la reivindicación 1 en el que el cáncer es adenocarcinoma ovárico y el aceite esencial es un aceite esencial obtenido a partir de las agallas de *P. integerrima* de Nepal.

30 9. Uso de la reivindicación 1 en el que el cáncer es adenocarcinoma de colon y el aceite esencial es obtenido a partir de agallas de *P. integerrima* de Nepal.

10. Uso de (-)-acetato de bornilo para fabricar un medicamento para tratar o prevenir un cáncer seleccionado del grupo consistente en adenocarcinoma de colon y adenocarcinoma ovárico.

35

40

45

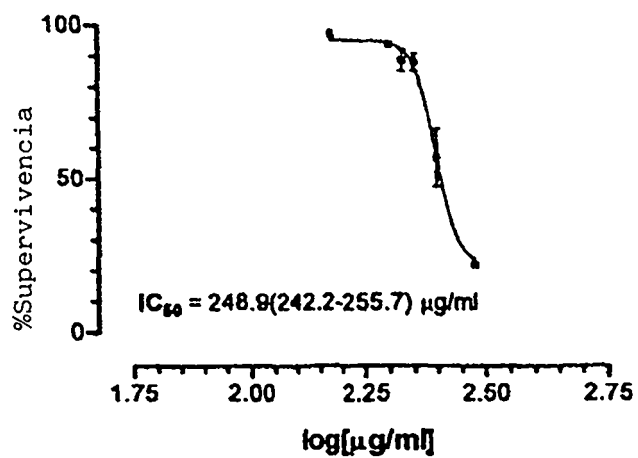
50

55

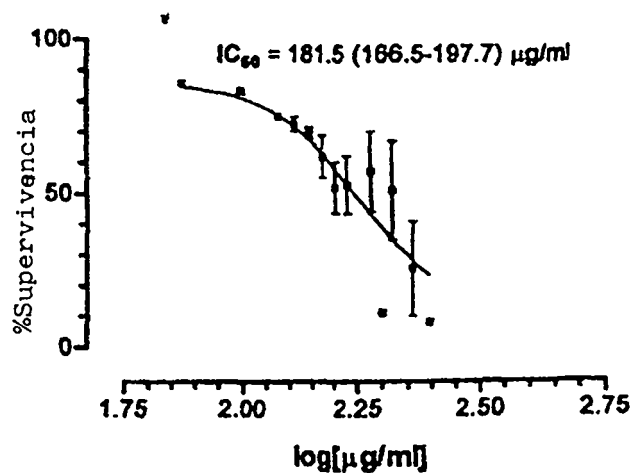
60

65

Aceite portugués en células MCF-7



Aceite portugués en células 2008



Aceite portugués en células LoVo

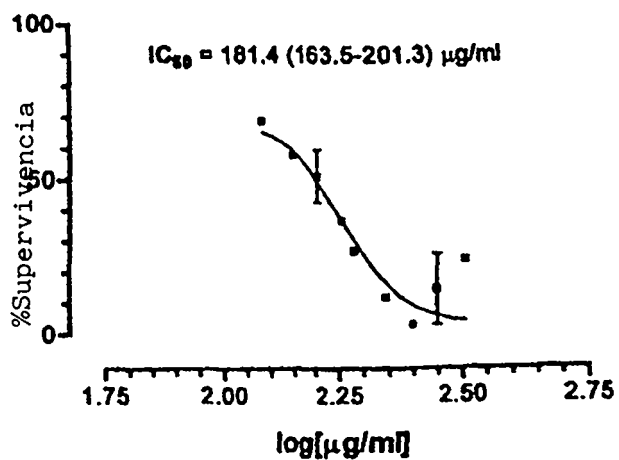
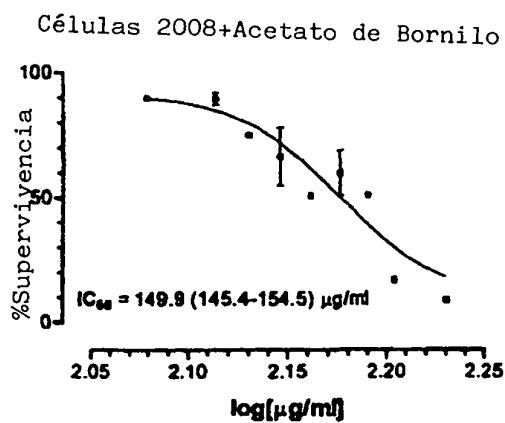
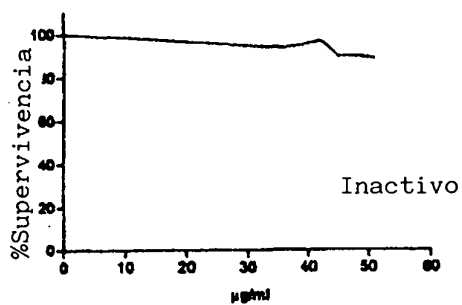


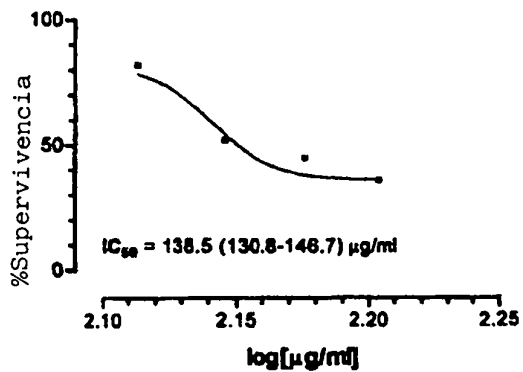
Fig. 1



Células 2008+Acetato de Bornilo
(misma gama de concentraciones que la del aceite)



Células LoVo + Acetato de Bornilo



Células LoVo+Acetato de Bornilo
(misma gama de concentraciones que la del aceite)

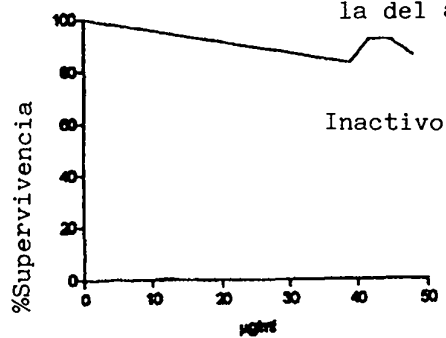


Fig. 2a

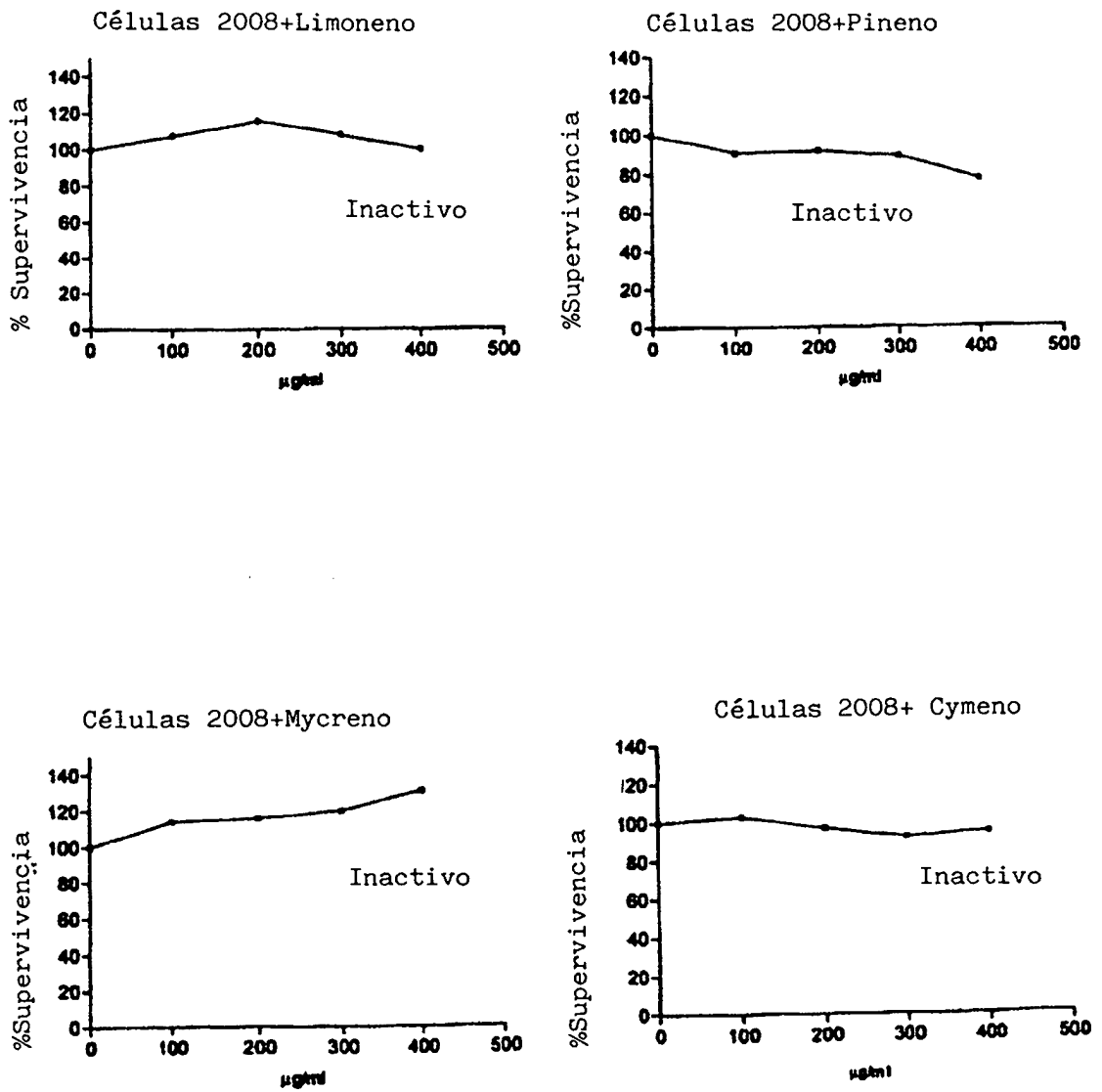


Fig. 2b

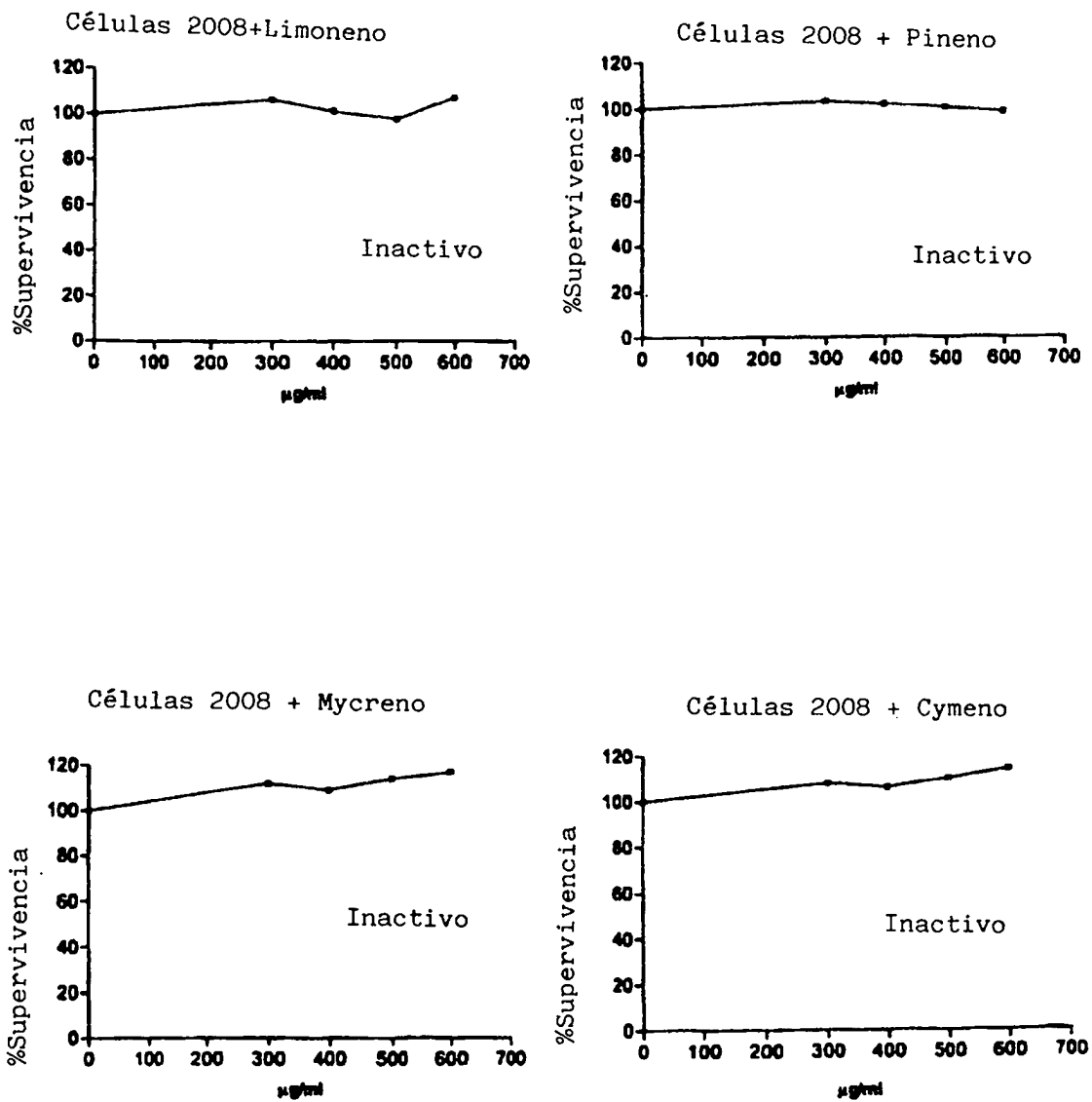


Fig. 2c

DM1C en células MCF-7

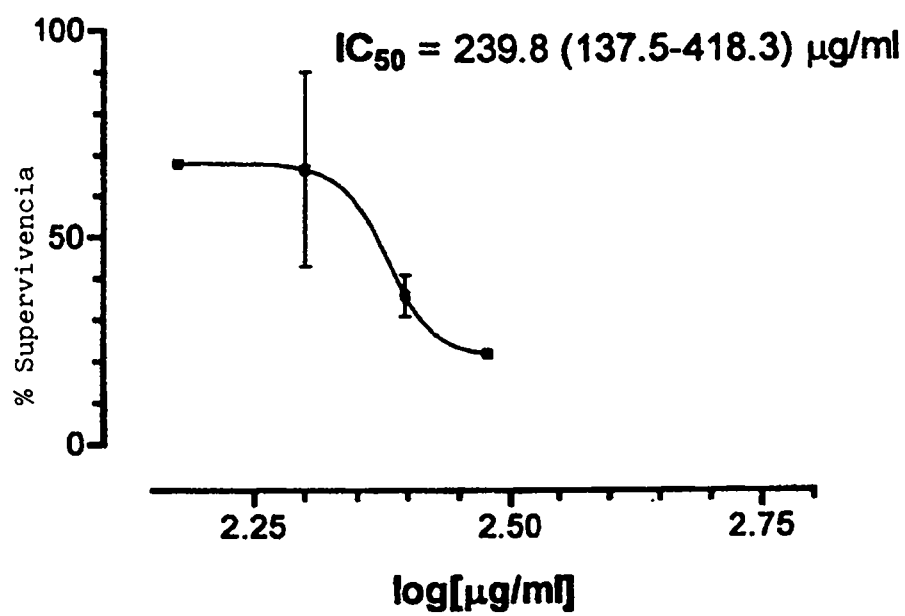


Fig. 3

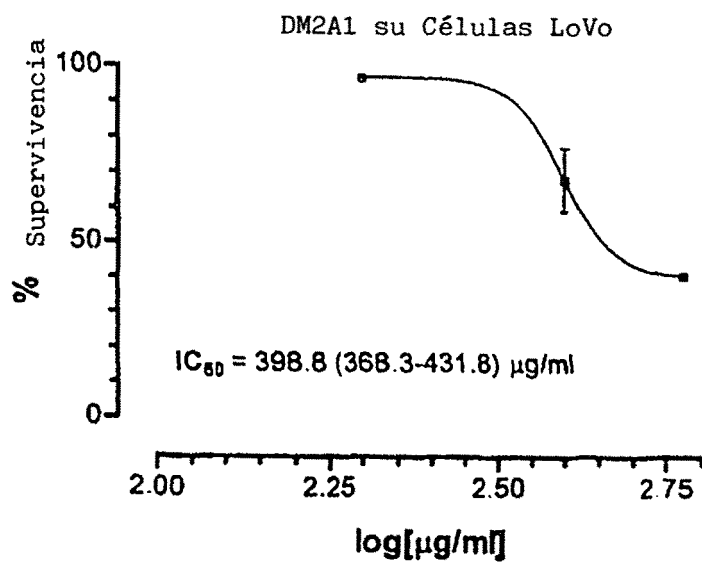
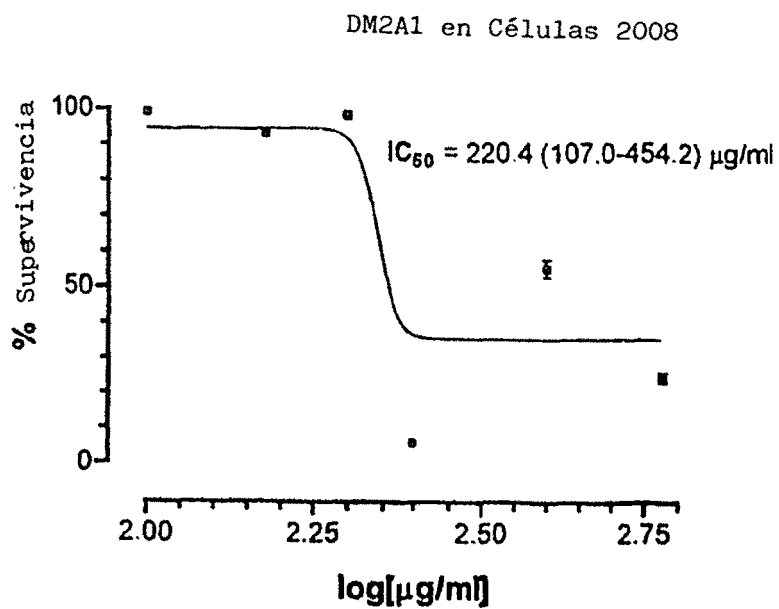


Fig. 4

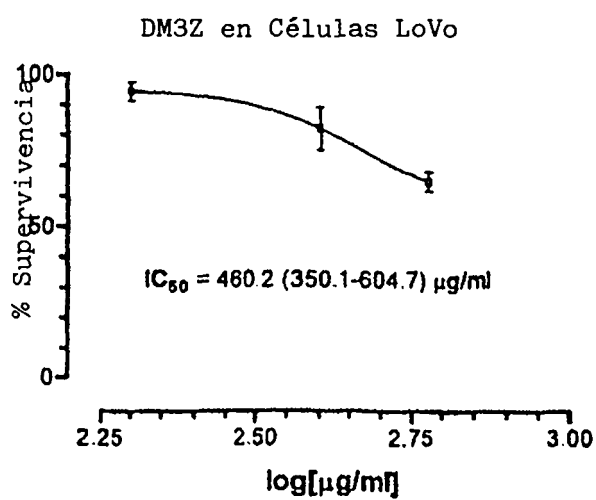
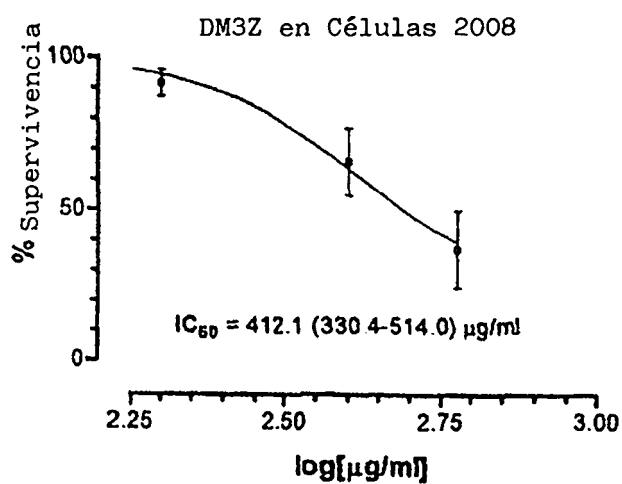
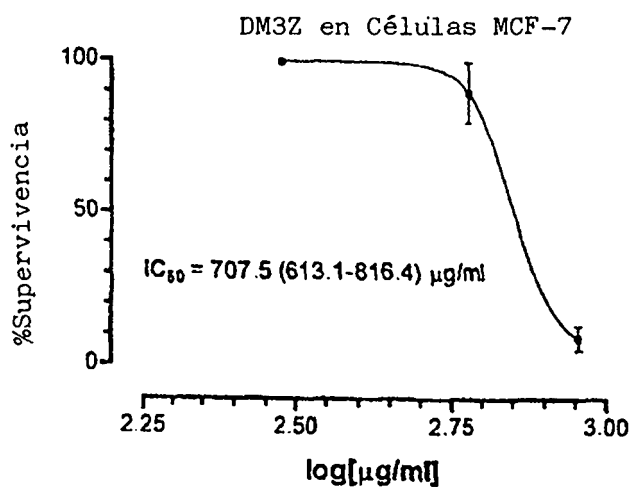


Fig. 5.

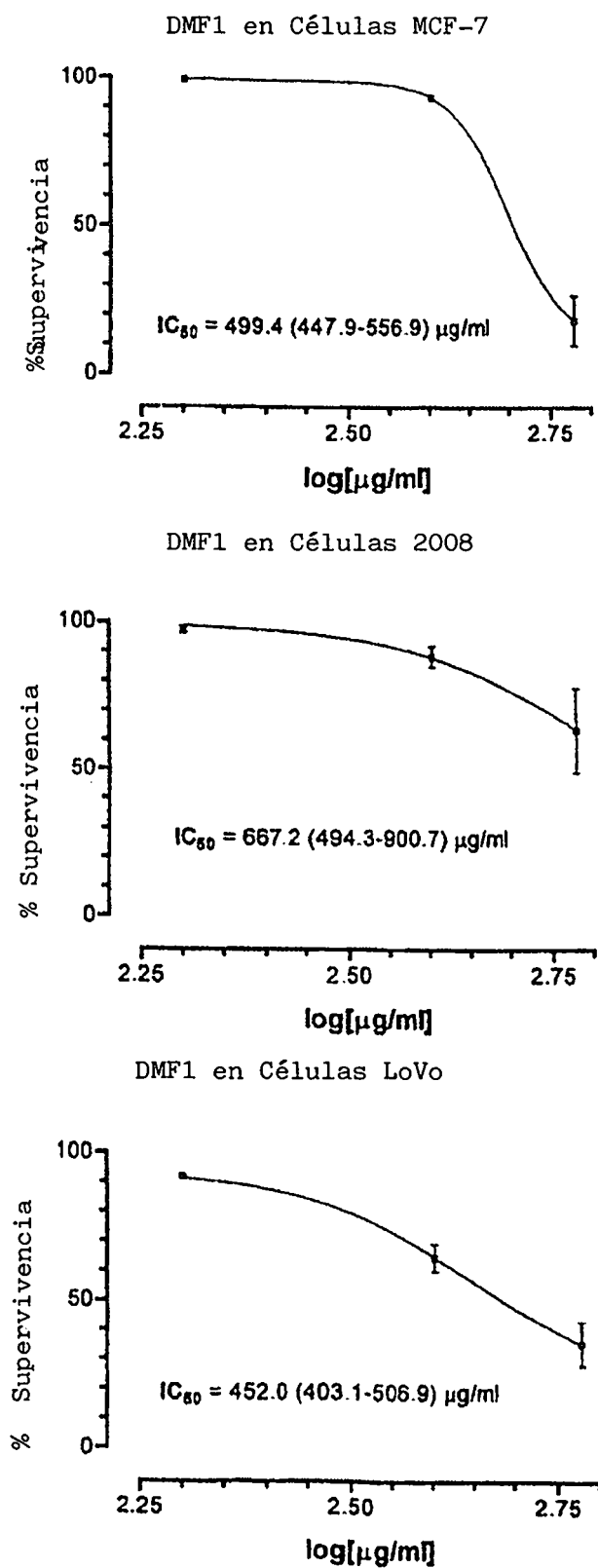


Fig. 6

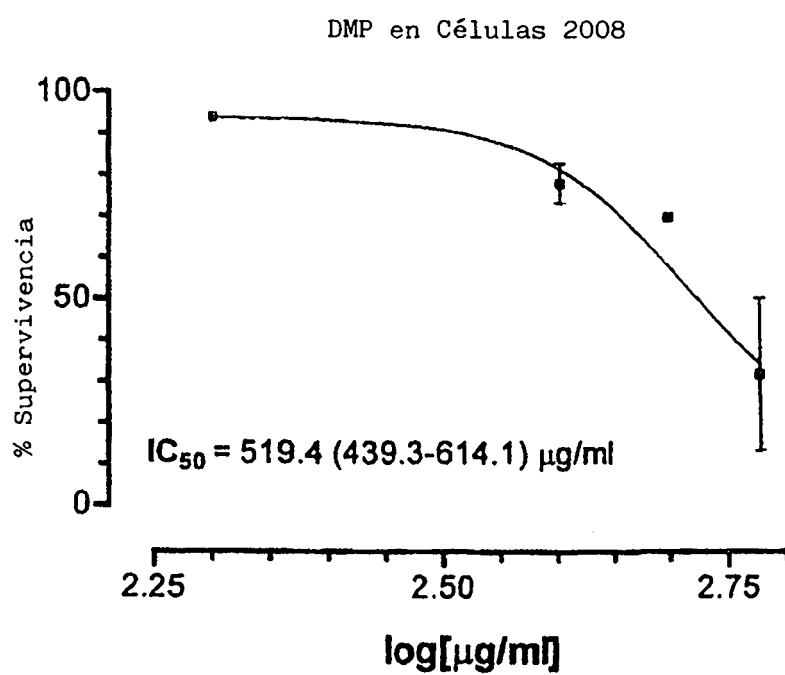


Fig. 7

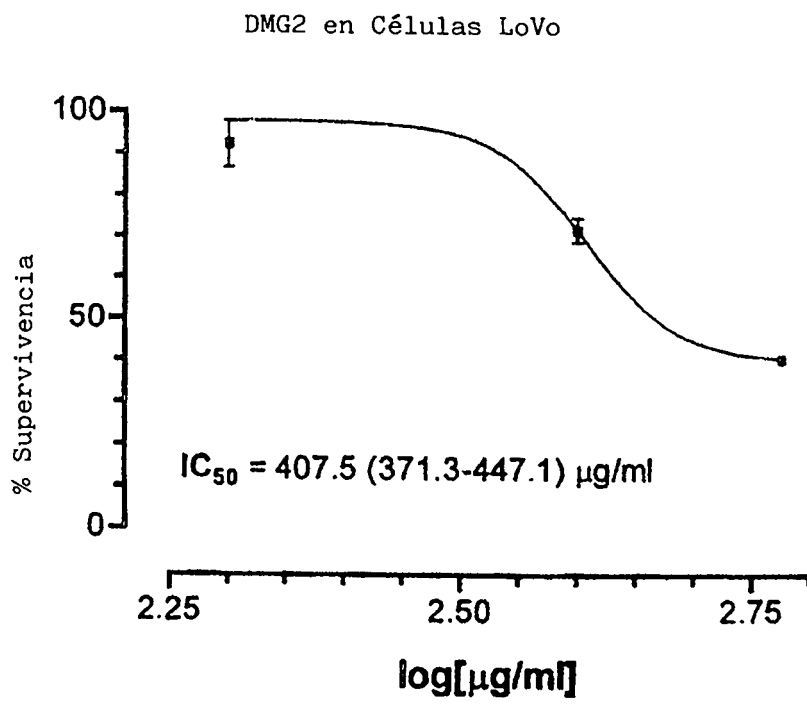


Fig.8

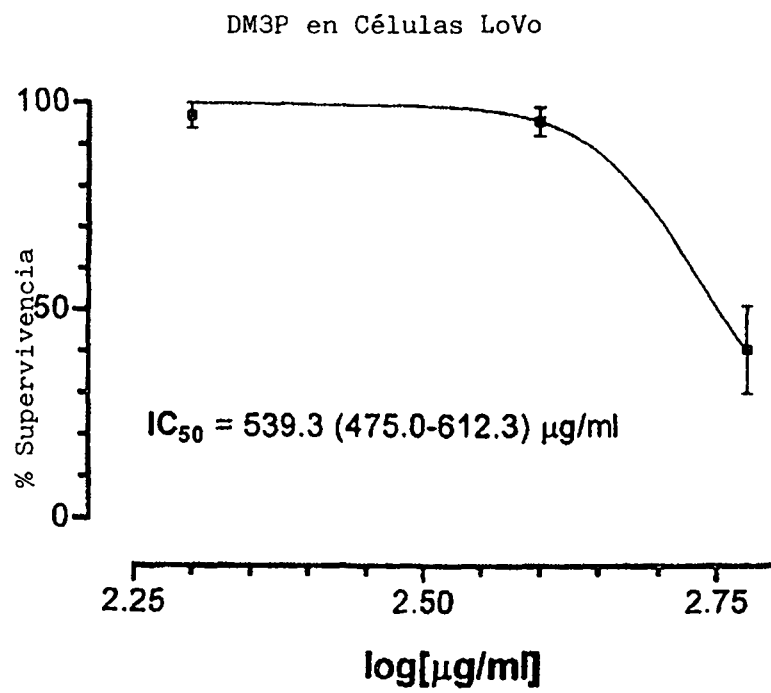


Fig. 9

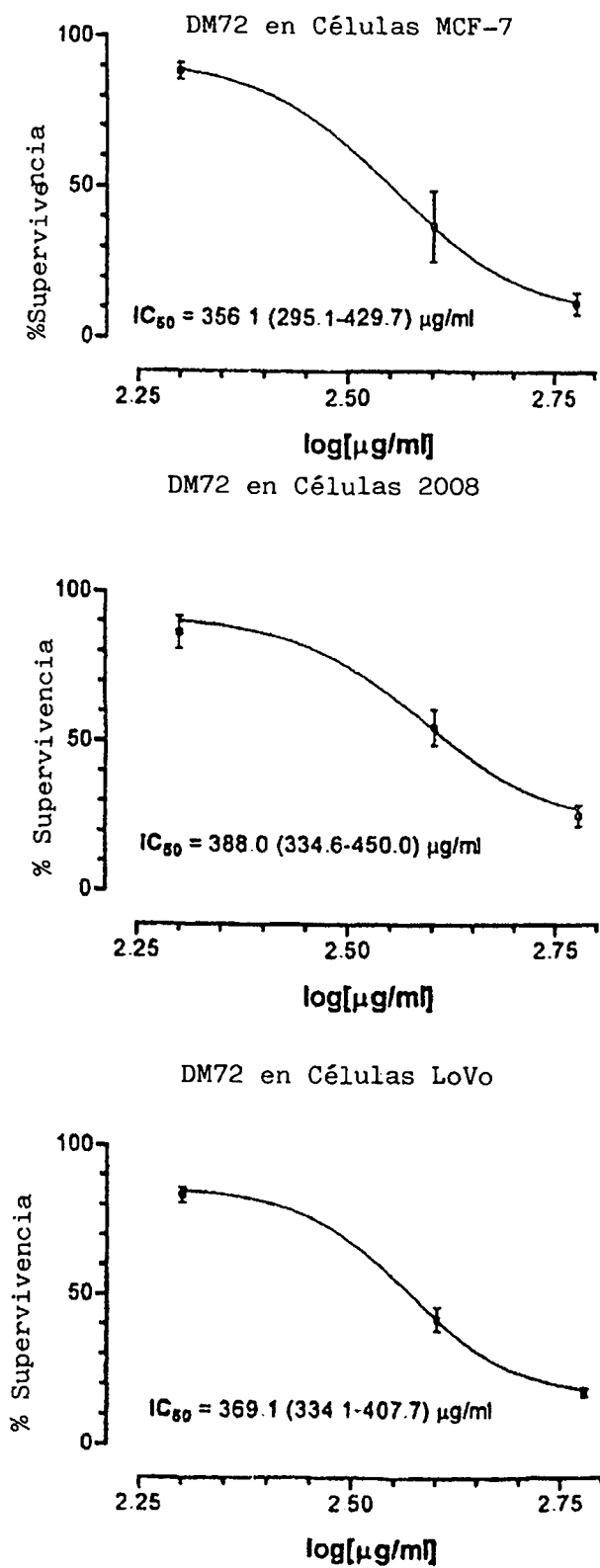


Fig. 10

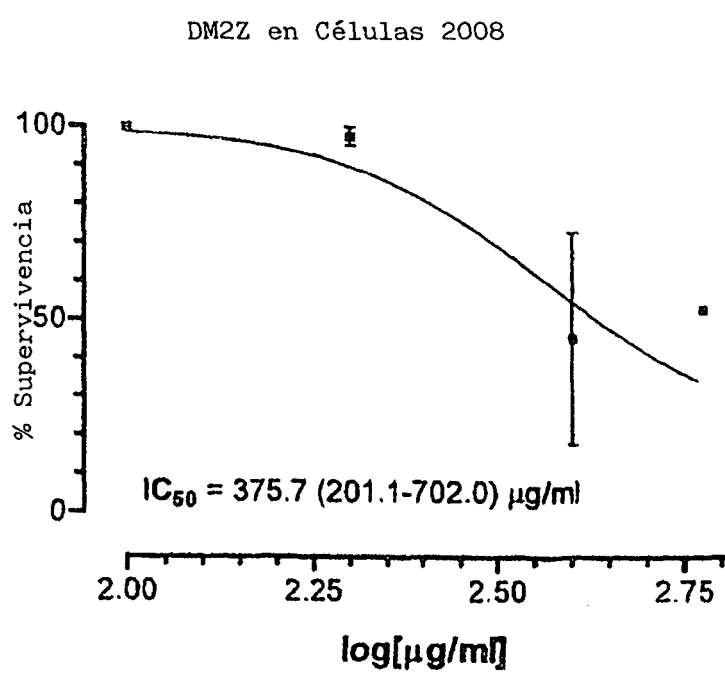


Fig. 11

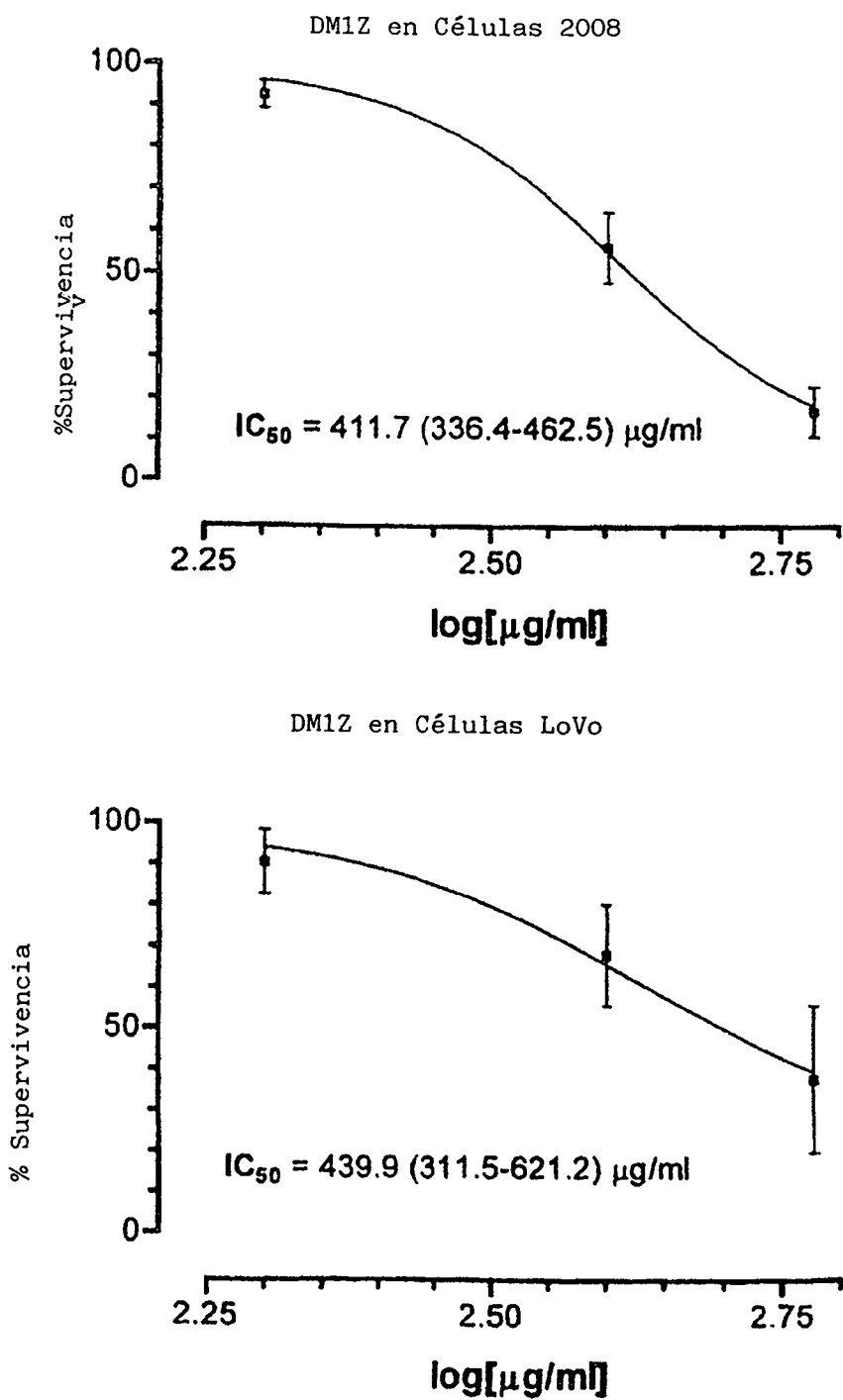


Fig. 12

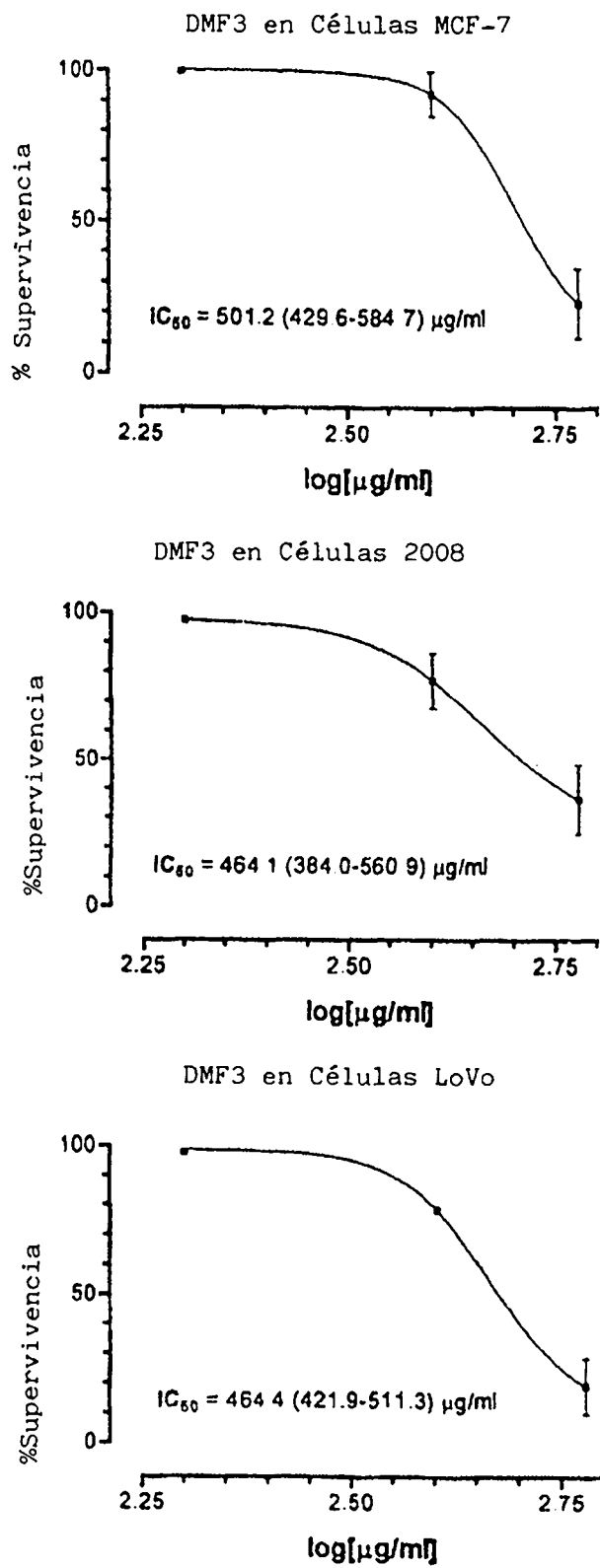


Fig. 13

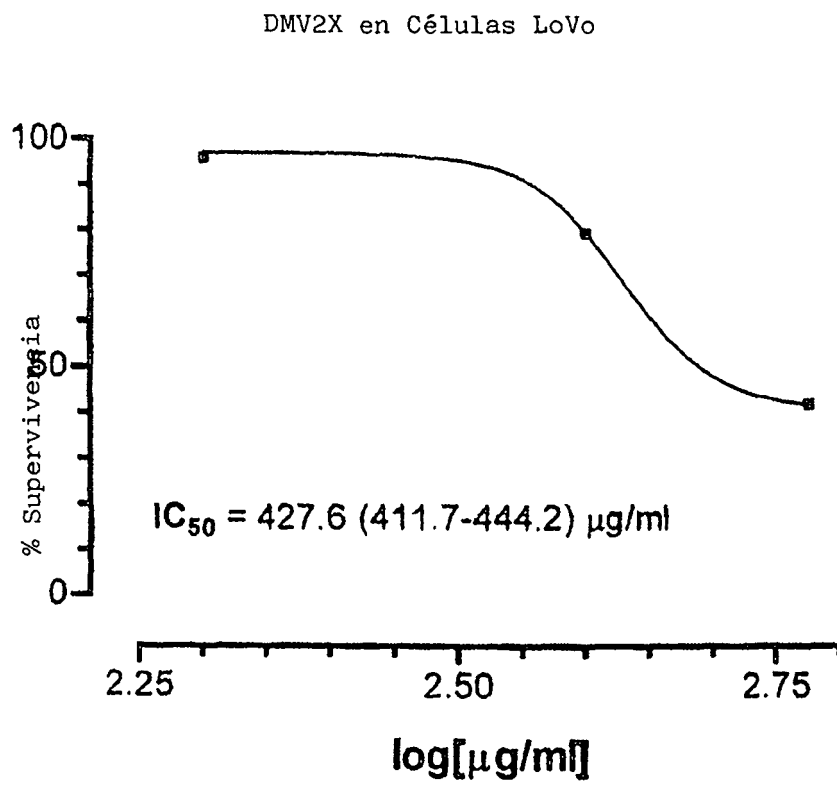


Fig. 14

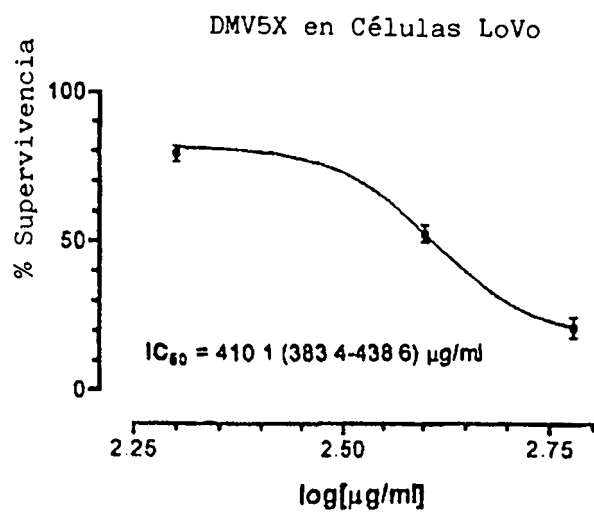
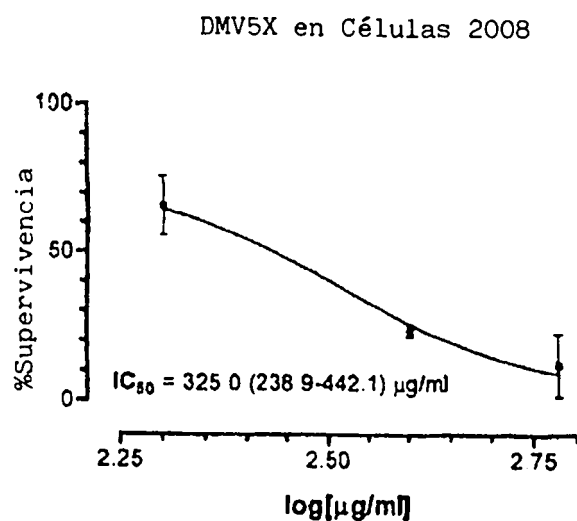
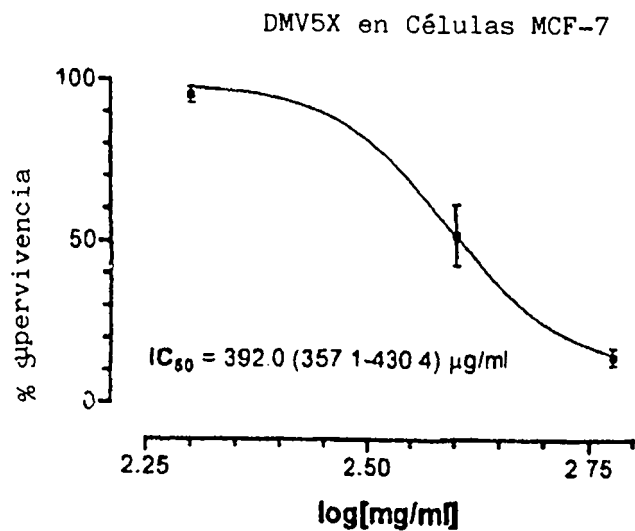


Fig. 15

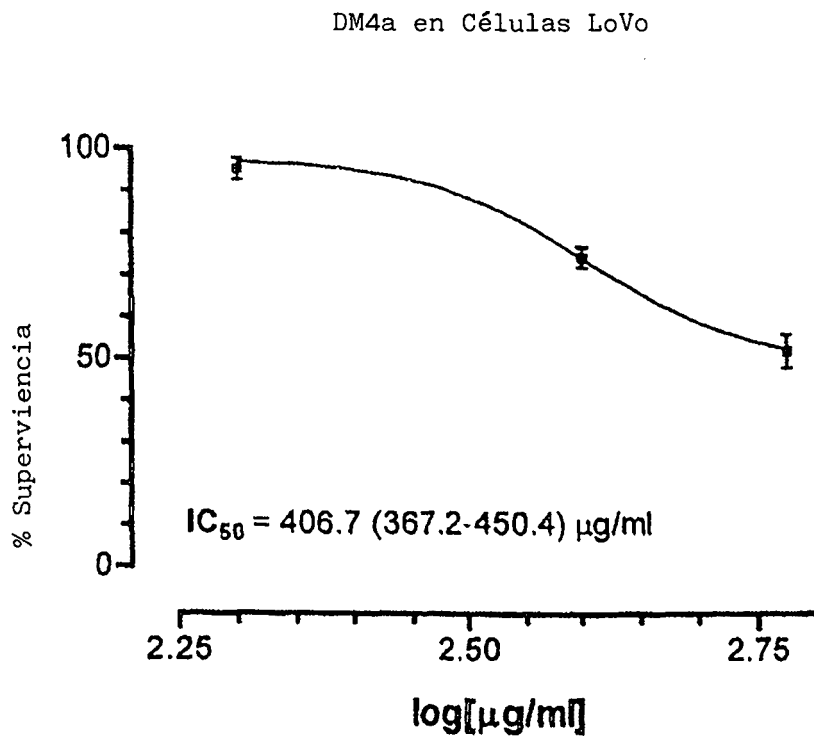


Fig. 16

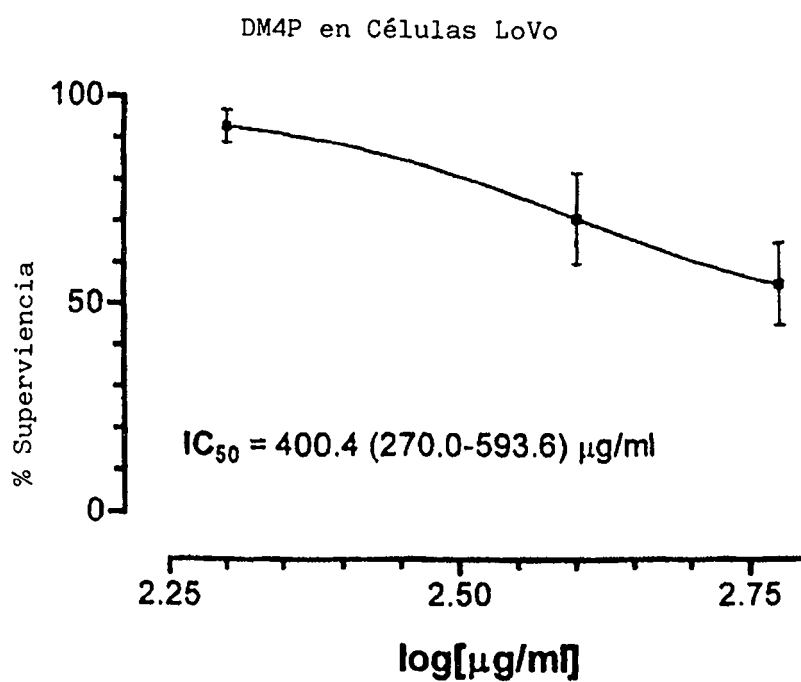
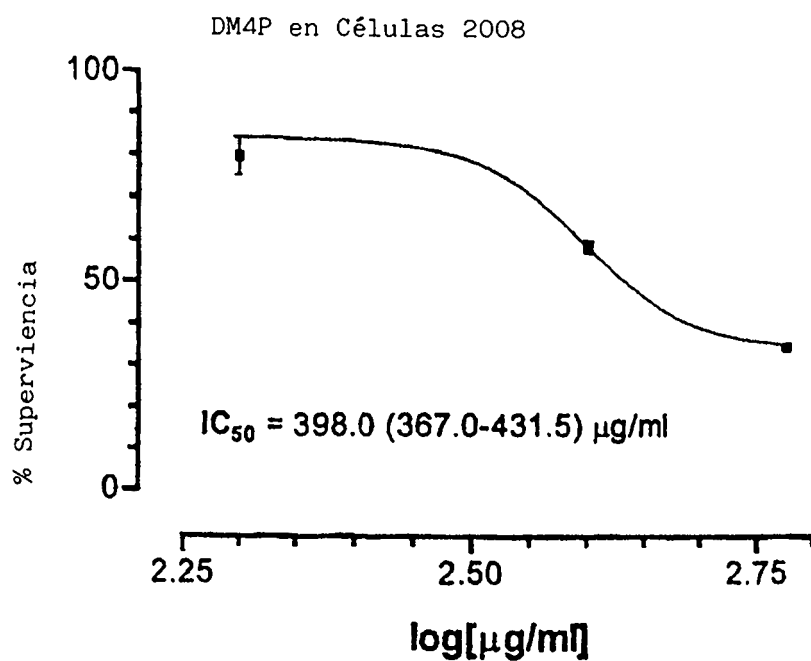


Fig. 17

DM5a en Células 2008

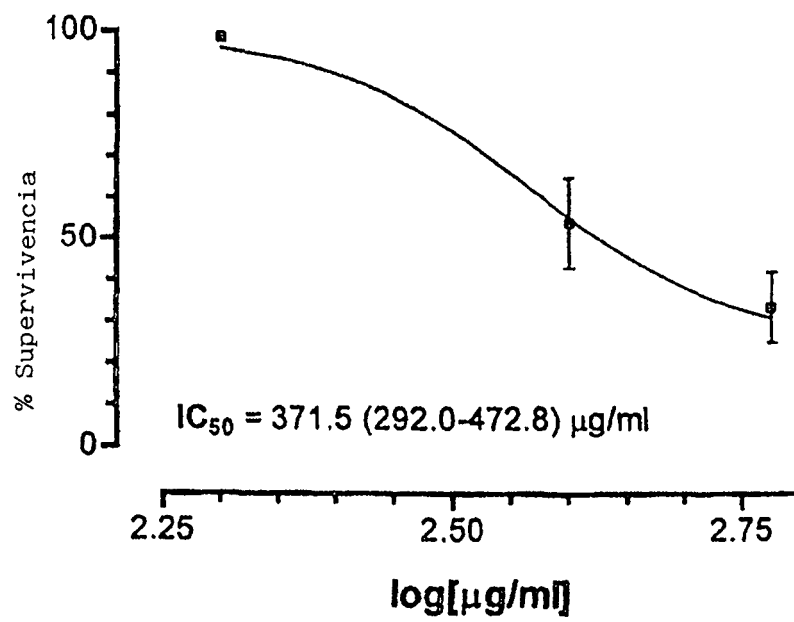


Fig. 18

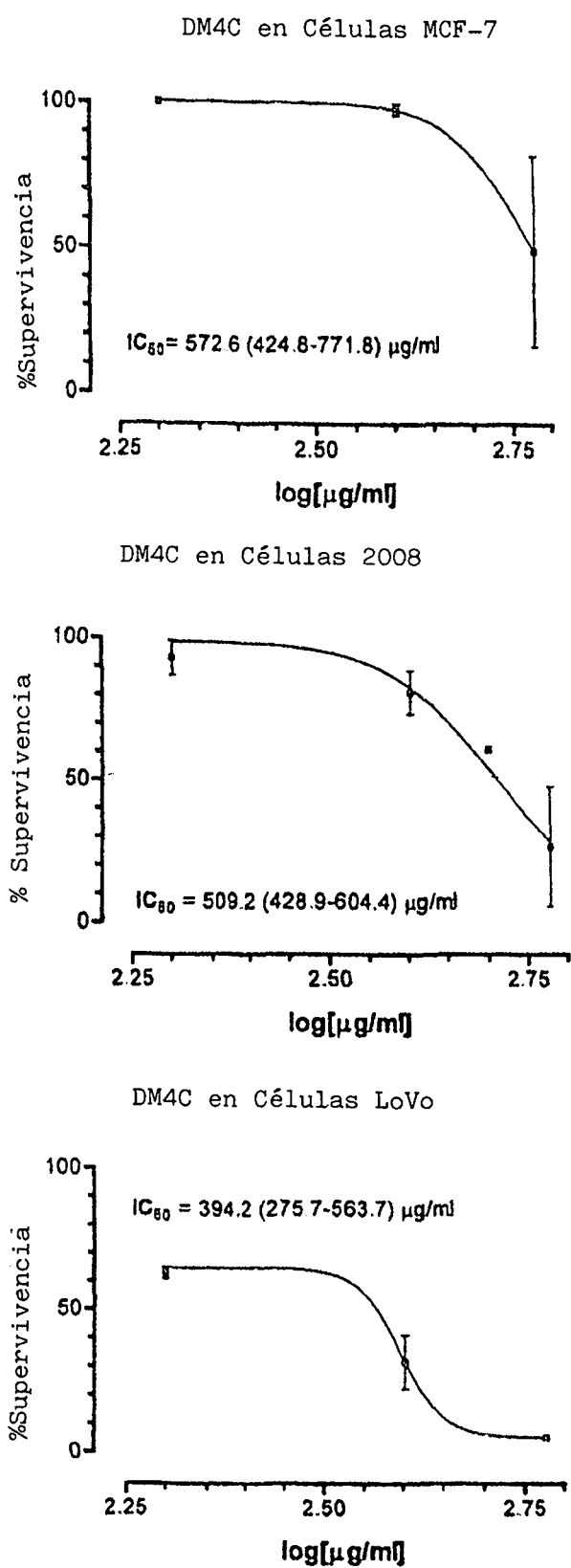


Fig. 19

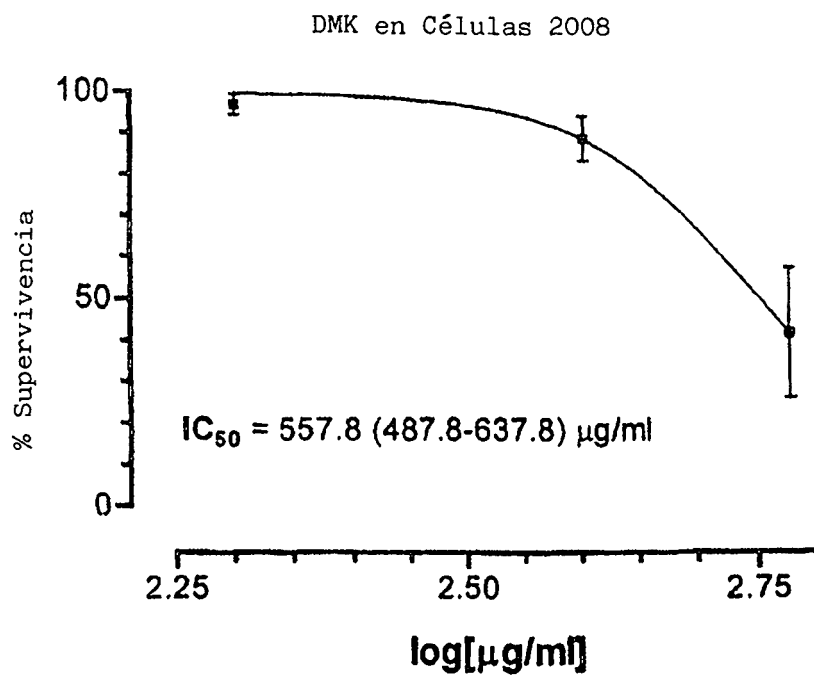


Fig. 20

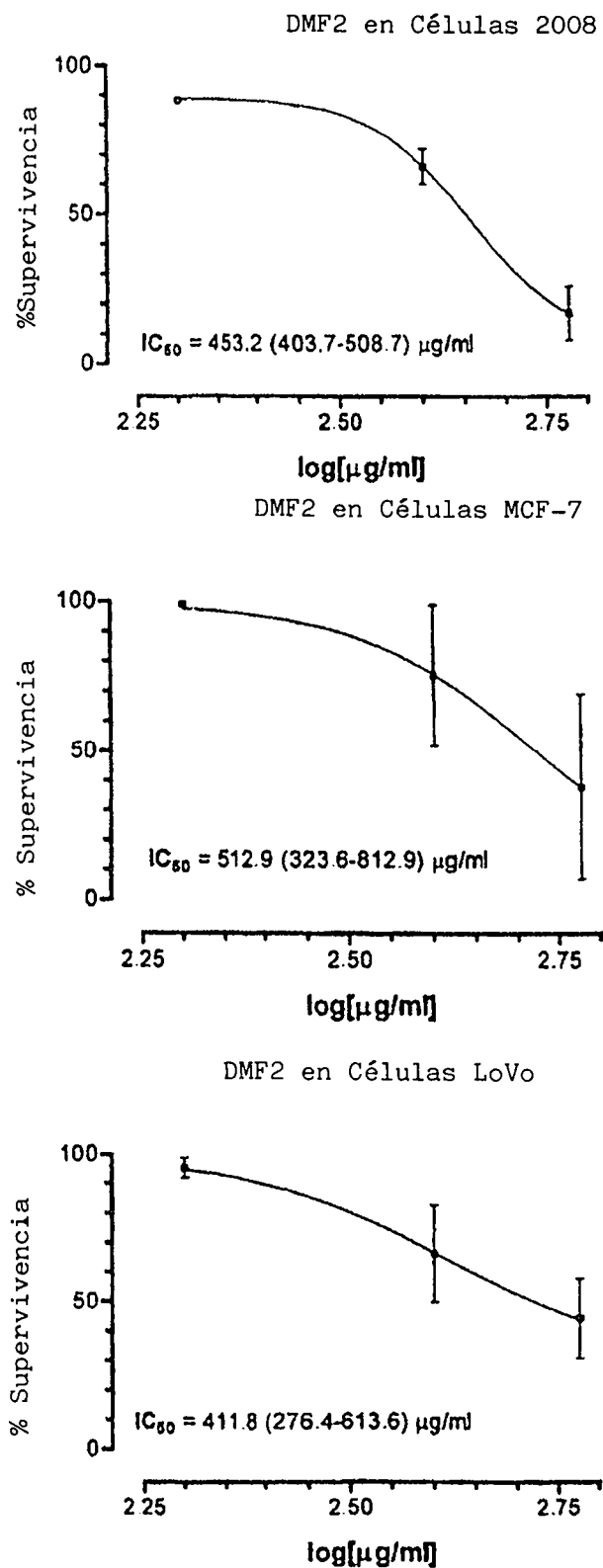


Fig. 21

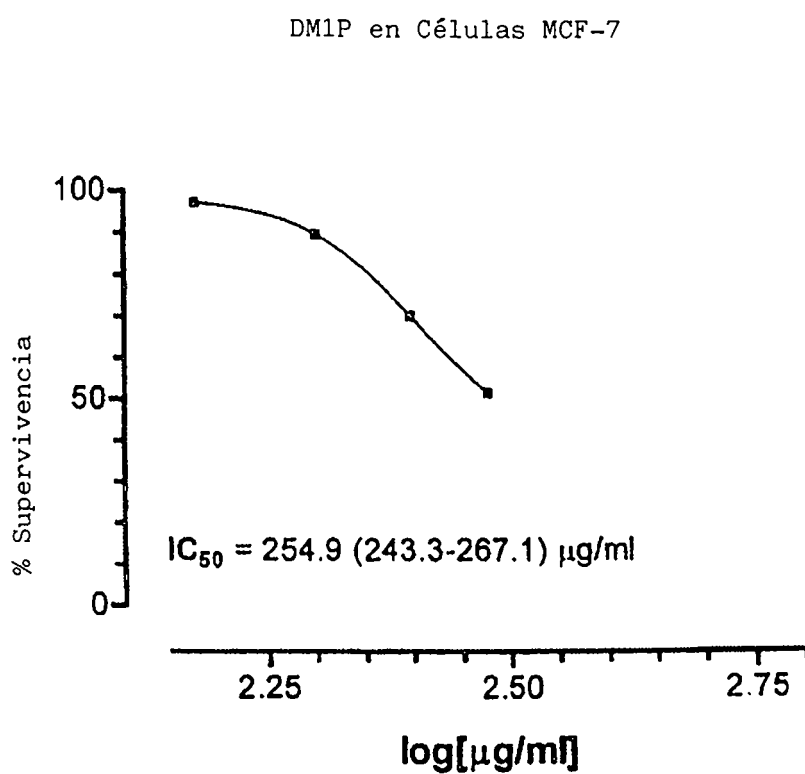


Fig. 22

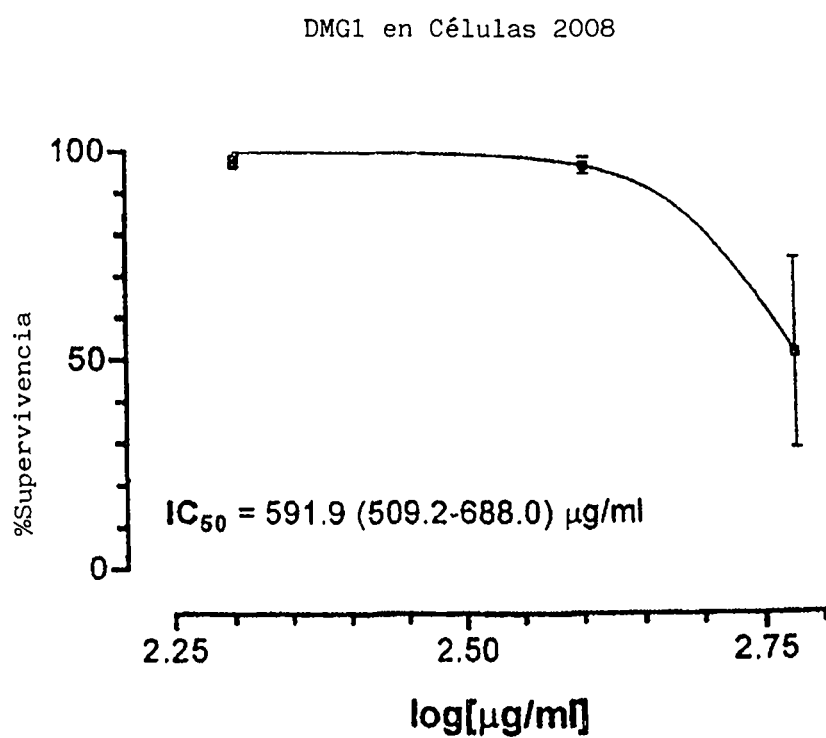
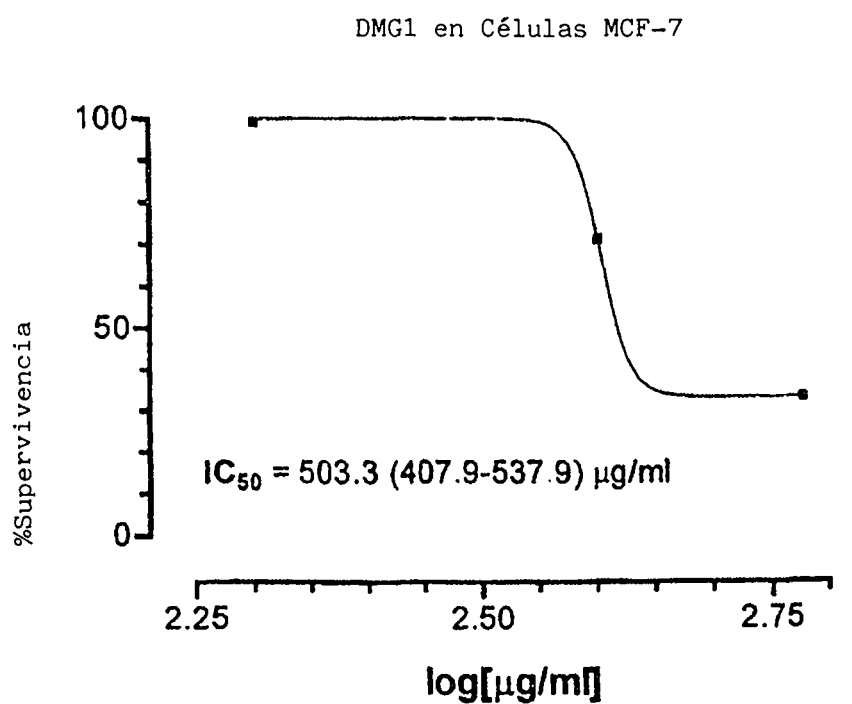


Fig.23

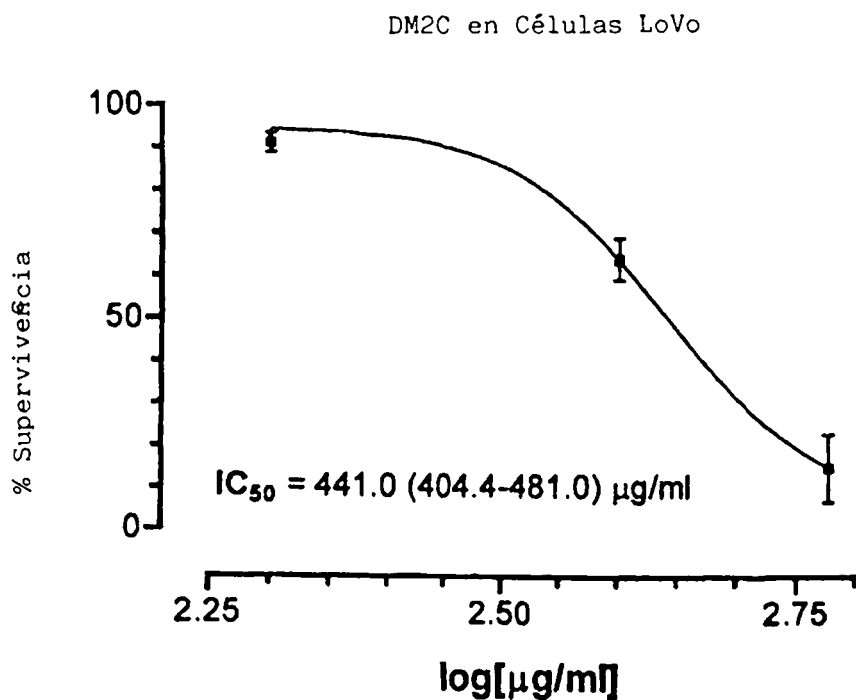


Fig. 24

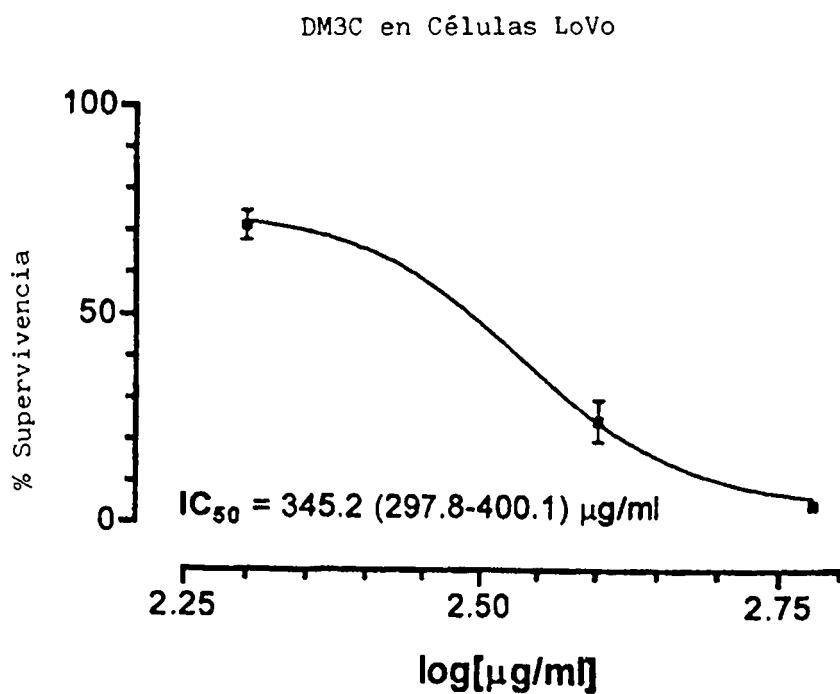


Fig. 25

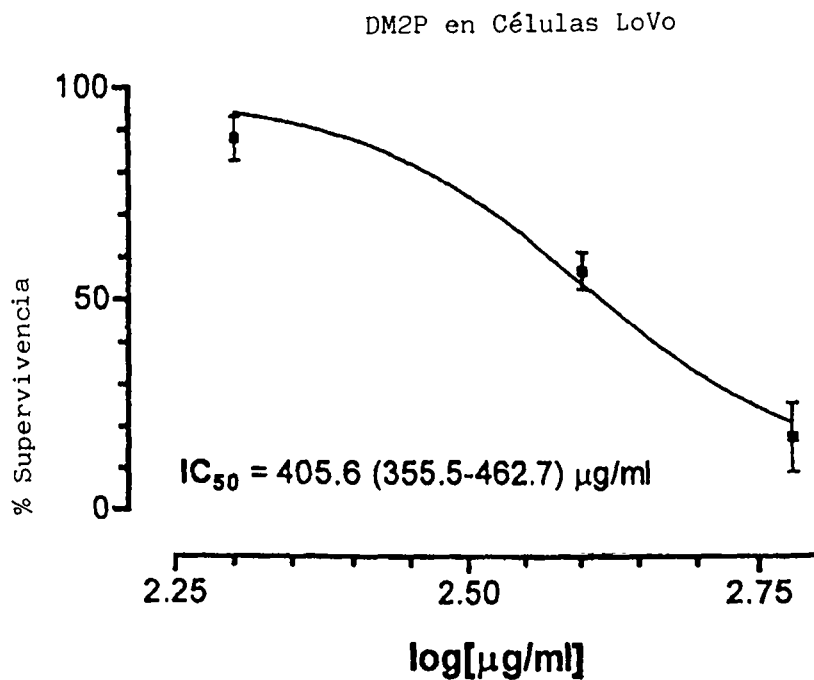


Fig. 26

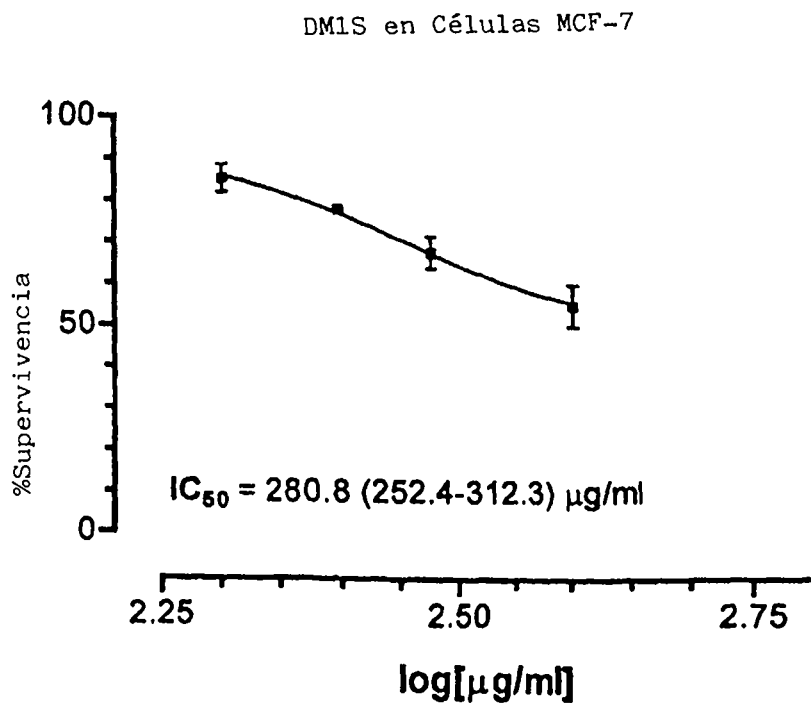


Fig. 27

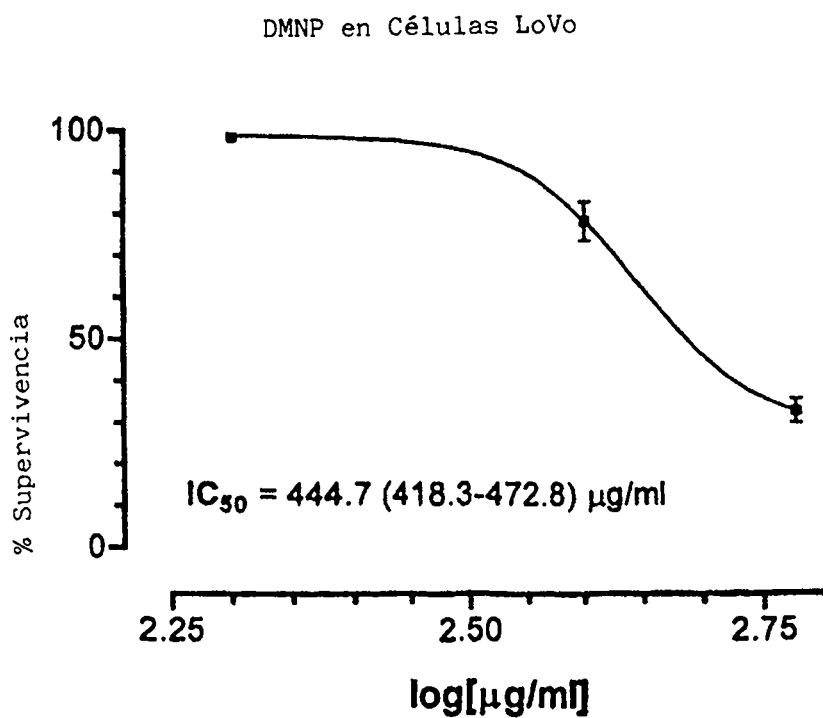
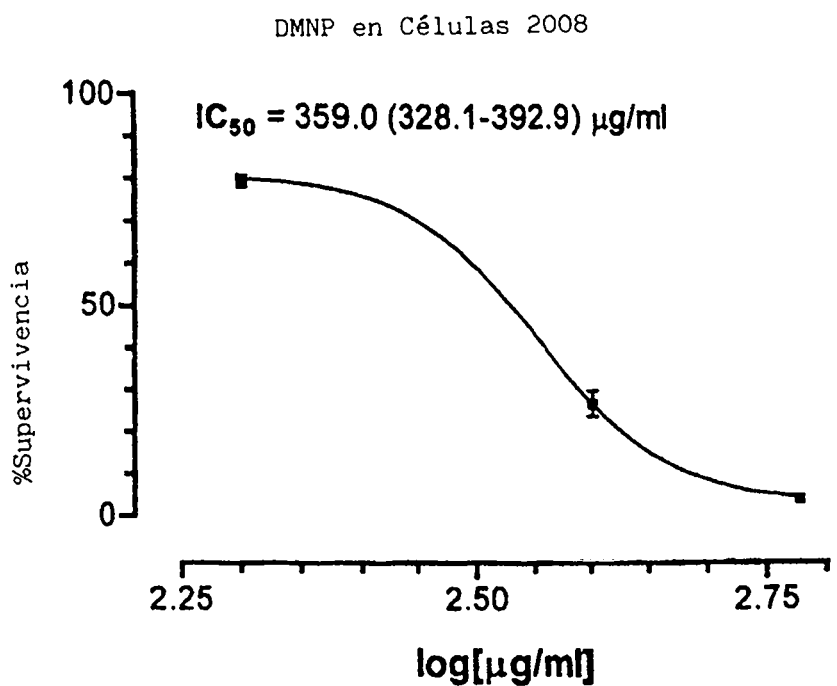


Fig. 28

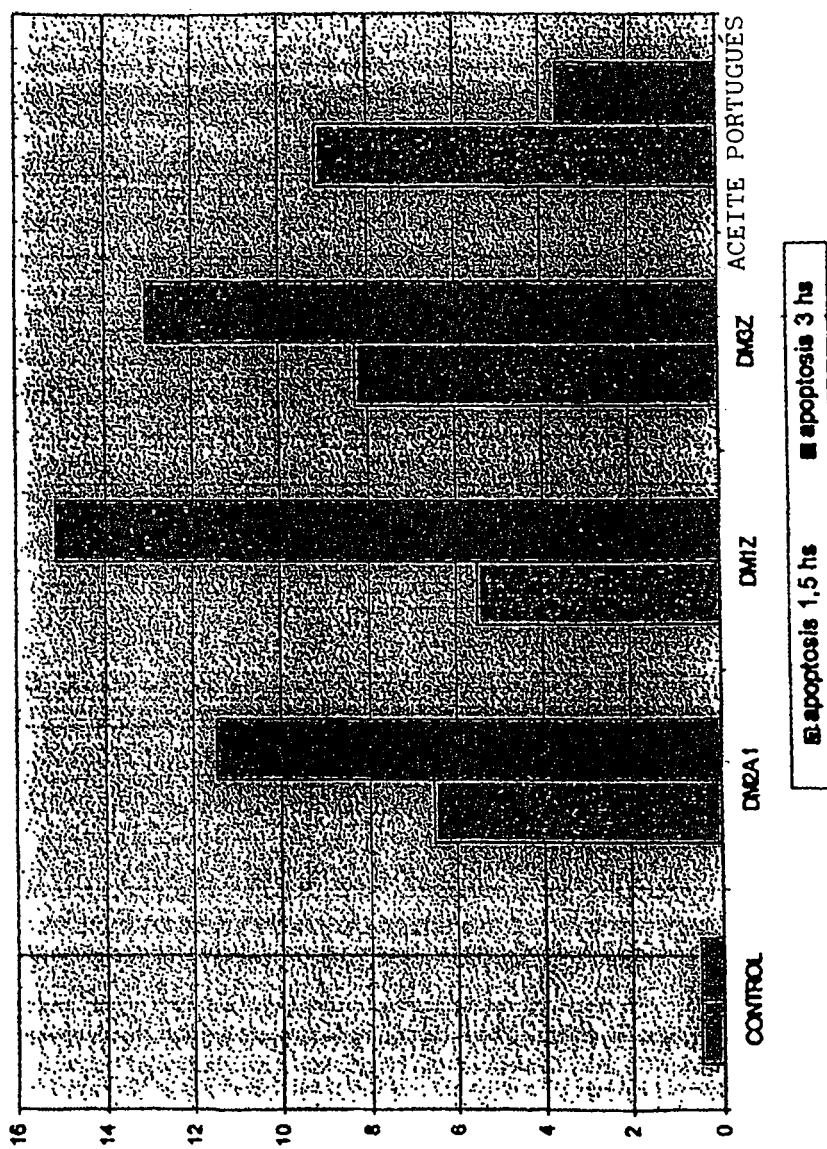


Fig. 29

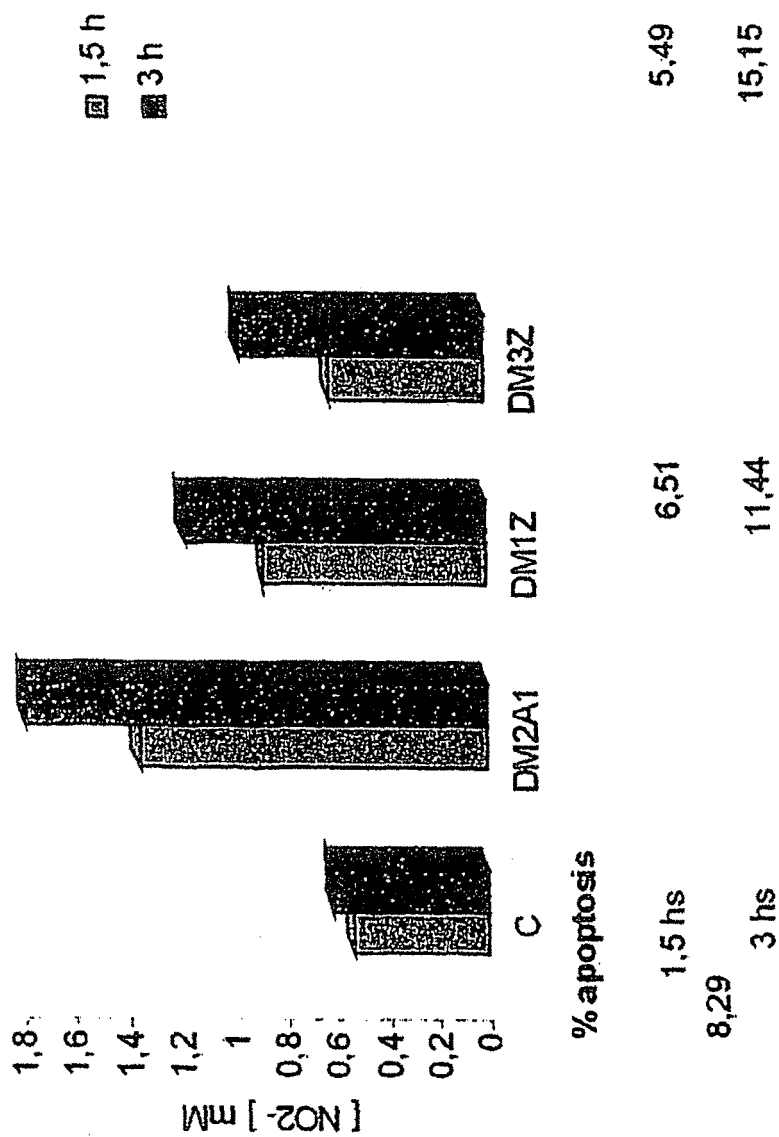


Fig. 30