

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 473**

21 Número de solicitud: 202031034

51 Int. Cl.:

A61K 36/81 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

13.10.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.04.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

13.07.2022

Fecha de concesión:

06.10.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.10.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (25.0%)
Hospital Real, Avda. del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES y
CELLBITEC, S.L. (75.0%)**

72 Inventor/es:

**BERMÚDEZ PÉREZ, Francisco;
PRADOS SALAZAR, José Carlos;
MELGUIZO ALONSO, Consolación;
PORRES FOULQUIE, Jesús M^a;
MESAS HERNÁNDEZ, Cristina;
MARTÍNEZ MARTÍNEZ, Rosario;
GALISTEO MOYA, Milagros;
ORTIZ QUESADA, Raúl;
CABEZA MONTILLA, Laura y
LÓPEZ-JURADO ROMERO DE LA CRUZ, María**

74 Agente/Representante:

CAMPOS GARCÍA, Vanessa

54 Título: **Extracto etanólico de semillas de *Solanum melongena*, método para obtenerlo, composición farmacéutica que lo contiene y su uso como agente antitumoral**

57 Resumen:

Extracto etanólico de semillas de *Solanum melongena*, método para obtenerlo, composición farmacéutica que lo contiene y su uso como agente antitumoral.

La presente invención proporciona un método para la obtención de un extracto etanólico de semillas maduras de *Solanum melongena*, preferiblemente desengrasadas, caracterizado por extracción con una solución hidroalcohólica con etanol al 50%, a pH ácido, preferiblemente bajo atmósfera de nitrógeno y durante tiempos cortos, no superiores a 1 — 2 h. Los extractos obtenidos de diferentes variedades de *Solanum melongena* poseen alto contenido fenólico y muestran una potente actividad antitumoral frente a líneas celulares de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de páncreas y glioblastoma multiforme, incluso frente a líneas resistente a quimioterapia, pero con baja toxicidad para hepatocitos humanos. Por ello, se proponen los extractos de la invención para uso en el tratamiento de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de páncreas y glioblastoma multiforme, incluso resistentes a las quimioterapias actualmente utilizadas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 906 473 B2

DESCRIPCIÓN

Extracto etanólico de semillas de *Solanum melongena*, método para obtenerlo, composición farmacéutica que lo contiene y su uso como agente antitumoral

5

Sector de la técnica

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología, botánica, nutrición y biomedicina. En concreto, se refiere a la obtención de un extracto etanólico de origen
10 vegetal para ser usado como agente antitumoral, procedente de harina de semilla madura de *Solanum melongena*, opcionalmente desengrasada.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer se define como un conjunto de enfermedades relacionadas en las que ciertas alteraciones celulares provocan la pérdida del control del proceso de proliferación que conlleva a una excesiva división celular y a la capacidad de estas células malignas para diseminarse a otros tejidos. El cáncer, en general, posee una elevada incidencia en la población mundial y requiere del desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos,
20 especialmente en estadios avanzados de la enfermedad en los que los pacientes presentan un muy pobre pronóstico. Dentro del campo de la oncología, el cáncer colorrectal (CCR), es considerado, por su actual prevalencia y por las previsiones de incidencia en los próximos años, un auténtico problema de salud pública.

25 Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (2018), el CCR representa el tercer cáncer con más incidencia en ambos sexos y a nivel mundial. En España, el CCR es el cáncer tumoral más frecuentemente diagnosticado (año 2019) en ambos sexos, siendo el segundo en frecuencia tanto en varones como en mujeres. En relación a su mortalidad y de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, a fecha de
30 diciembre de 2019, el CCR representaba el segundo cáncer en importancia en cuanto al número de muertes en ambos sexos. Esta mortalidad posee una clara tendencia de crecimiento, tendencia que se ha demostrado que está relacionada con el estilo de vida y en la dieta.

35 Entre los factores de riesgo para el desarrollo de un CCR se encuentran i) la edad, ya que se diagnostica con mayor frecuencia en pacientes mayores de 50 años (90% de los casos)

sin otras patologías ni enfermedades predisponentes; ii) los factores dietéticos, que juegan un papel esencial y se encuentran en continua investigación; de hecho, el consumo excesivo de alcohol, el sobrepeso y obesidad y ciertos tipos de alimentos (carne procesada) han sido vinculados a esta patología; iii) enfermedades predisponentes, especialmente la presencia de pólipos intestinales o de enfermedad intestinal inflamatoria, que hacen que estos pacientes deban ser consideradas de alto riesgo para el desarrollo de CCR; iv) la presencia de un CCR previo; v) los denominados factores genéticos o familiares, dado que en 25% de los casos existe un antecedente familiar y en el 10% un componente hereditario y vi) por último, el estilo de vida, en el que se debe destacar la inactividad física, también se han relacionado con el CCR.

A pesar de que el tratamiento y la prevención del CCR han sufrido grandes avances en los últimos años, los resultados, en términos de curación o de reducción de la incidencia, están muy lejos de ser satisfactorios. Debemos destacar que, en la fase más avanzada de la enfermedad en las que los pacientes desarrollan metástasis a distancia (especialmente hepáticas), los resultados de las diferentes terapias aplicadas ensayadas son especialmente pobres. Estos resultados se reflejan de una forma drástica en el pronóstico de los pacientes que poseen una muy baja tasa de supervivencia. El tratamiento actualmente aprobado para el CCR abarca desde la cirugía, cuando el tumor es resecable, hasta el uso de la quimioterapia basada en diferentes citotóxicos como oxaliplatino, irinotecan, 5-fluorouracilo, capecitabina, utefos, TAS-102, raltitrexed (ya sea de forma aislada o en combinación) o la radioterapia. En los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos biológicos activos contra el CCR entre los que se encuentran los anticuerpos monoclonales Cetuximab, panitumumab, bevacizumab y una proteína de fusión recombinante (aflibercept) que posee indicaciones terapéuticas muy precisas (Loree y col., 2017; Nappi y col., 2018; Bregni y col., 2020.). A pesar de ello, y como claramente indica la supervivencia media de estos pacientes (15 a 20,5 meses), los resultados son muy limitados. Por tanto, la mejora del pronóstico de estos pacientes y la mejora de su supervivencia, precisa del desarrollo de nuevas estrategias que sumen a la actividad terapéutica a la acción preventiva (Idrees y col., 2019; Reglero y col., 2019).

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de prevención abarca una gran cantidad de campos de investigación que se extienden desde la nanotecnología, la terapia génica, la inmunoterapia usando de estrategias que activan el sistema inmune o el uso de nuevos compuestos o extractos origen vegetal o animal, que puedan ser activos en el tratamiento del CCR o adyuvantes de las terapias actuales para la mejora de la respuesta al tratamiento.

En este contexto, el estudio del efecto de los extractos o derivados vegetales sobre la viabilidad, la proliferación y la supervivencia de células tumorales ha cobrado un gran interés en los últimos años (Goyal y col., 2017). En realidad, esta línea de investigación ya viene avalada y apoyada por el National Cancer Institute (USA) desde el año 1960, año en la que se comenzó a evaluar la actividad antitumoral y preventiva de diferentes extractos vegetales frente a ciertos carcinomas (Huang y col., 2013). Los vegetales en general y sus extractos en particular poseen grandes aplicaciones en medicina como son los de ser i) una fuente directa de agentes terapéuticos, ii) una materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, iii) aportar las estructuras químicas de sus principios activos, que puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y iv) utilizar dichos principios como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos. Estas posibles aplicaciones, son debidas a los fitoquímicos que presentan las plantas y sus extractos, de los que se han identificado más de 5.000 en semillas, frutas, raíces, tubérculos, hojas, etc., entre los cuales se encuentran compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas, alcaloides, terpenos y terpenoides, compuestos nitrogenados y compuestos organosulfurados (Thapliyal y col., 2018).

Aunque se hayan extraído de plantas o partes de las mismas, la posible actividad de muchos compuestos fitoquímicos ha sido estudiada de forma individual, tras su aislamiento o, como mucho, analizando la actividad de fracciones obtenidas en procesos cromatográficos en las que se ha demostrado su presencia. Así, por ejemplo, Akihisa T y col. (2011) aislaron salannina a partir de las semillas del árbol *Azadirachhta indica* y demostraron que la salannina y algunos otros limonoides, exhiben un potente efecto inhibitorio en el proceso de melanogénesis. Para aislar dichos compuestos, llevaron a cabo una extracción por reflujo durante 3 horas con n-hexano para posteriormente aislar los limonoides presentes por cromatografía. La salannina también posee actividad antitumoral en líneas celulares de neuroblastoma y osteosarcoma (Cohen y col., 1996) con una IC_{50} de $133 \pm 6 \mu M$ en la línea de neuroblastoma NIE.115 y de $89 \pm 12 \mu M$ en la línea celular de osteosarcoma 143B.TK.

Por otra parte, el Kaempferol 3-soforotriósido se relaciona con actividad antioxidante y hepatoprotectora (Toshiyuki y col., 2001).

Ting y col. (2017) desarrollaron extractos que contenían ~~myricomplanósido~~. Para ello, realizaron un extracto etanólico (95%) a partir de las semillas de *Astragalus chinensis* para posteriormente realizar fracciones y obtener algunos compuestos aislados por

cromatografía. Estas fracciones, alguna de las cuales contenía myricomplanósido, presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa.

El grupo de los capsianósidos, por su parte, se caracteriza por interferir en la función del citoesqueleto al modular la reorganización de los filamentos de actina (Hashimoto y col. 1997).

Los compuestos fenólicos en general han atraído el interés de la comunidad científica debido a su gran diversidad estructural así como a su amplia bioactividad. Dichos compuestos fenólicos presentan funciones esenciales en la reproducción y crecimiento de las plantas, actúan como mecanismos de defensa contra patógenos, parásitos y depredadores, además de ser el responsable de proveer el color de las plantas. No solo son beneficiosos para las plantas, sino que también juegan un papel importante en la salud humana, como antioxidantes, anticancerígenos, antibacterianos y antiinflamatorios (Huang y col., 2013; Bonta y col., 2019). Debido a la bioactividad que presentan, existen numerosos medicamentos y patentes cuyos principales componentes son compuestos fenólicos, es decir, compuestos que presentan más de un grupo fenólico por molécula. Es el caso de Neumentix™, (<https://www.kemin.com/na/en-us/products/neumentix>), un suplemento patentado (patente de EEUU US 9839661), obtenido por Kemin, (representada en España por Univar) y obtenido a partir de la menta verde recolectada (gamas KI110 y KI42) tras un proceso de secado. Este suplemento rico en compuestos fenólicos del tipo ácido rosmarínico, salvianólico y caftárico, ha demostrado mediante estudios clínicos, grandes beneficios en el rendimiento cognitivo. Además, los compuestos fenólicos que caracterizan este suplemento, actúan como agentes antioxidantes reduciendo el estrés oxidativo, promoviendo el crecimiento neuronal y protegiendo las células nerviosas del cerebro. Del mismo modo, compuestos fenólicos encontrados en la uva, arándanos y otras frutas y verduras se han estudiado para determinar su capacidad de disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas. Además, se han utilizado como suplemento para minimizar los efectos de la edad, especialmente la pérdida de memoria, como es el caso de la Curcumina Optimizada con Neurophenol™ (mezcla de extractos de arándanos y uva), de Douglas Laboratories® (Valencia, España: <https://www.douglaslabs.es/>). También existen comercializados extractos fenólicos patentados a partir de la pepita de la uva (Vitaflavan®, producto de DRT- Les Derivés Résiniques et Terpéniques, Dax, Francia: <https://www.vitaflavan.com/es/>), del orujo de la uva tinta (Eminol®) y del vino tinto (Provinols®, de Sucren/Vitimed, distribuido por Seppic, La Garenne Colombes, Francia: <https://www.seppic.com/provinolstm-0>) que presentan propiedades antioxidantes.

En los últimos 20 años, más del 25% de los fármacos proceden de plantas, mientras que otro 25%, son derivados de productos naturales modificados (Amin y col., 2009). Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% al 15% de las plantas de uso medicinal, han sido investigadas para la obtención de sus compuestos bioactivos. Esto destaca la importancia de la búsqueda de nuevos medicamentos a partir de especies vegetales (Rivas-Morales y col., 2016; Wong y col., 2018).

El género *Solanum* (Solanaceae), es el más rico en especies (más de 1500 especies censadas) de la familia *Solanaceae*, de las cuales, por su importancia económica y cultural, merecen destacarse la patata (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*). Debido a que las especies del género *Solanum* presentan diversos fitoquímicos como los alcaloides, este género ha sido usado desde la antigüedad con fines medicinales. Los alcaloides que presentan han sido de gran interés debido a su amplia actividad biológica, como antimicrobiano, antirreumáticos, antioxidantes, así como anticancerígenos (Jayakumar y col., 2016).

Las plantas de la especie *Solanum melongena* (berenjena) parecen tener su origen en el sudeste asiático, estando posiblemente en la India su centro principal de origen, país donde se cultivan desde tiempos muy antiguos (al menos desde el 2000 a.C.). También se conoce su cultivo ancestral en África y China; este último país posiblemente haya sido un centro de origen secundario en el que se desarrollaron variedades con pequeños frutos. El cultivo de la berenjena se fue extendiendo por el norte de África, desde donde parece haberse extendido su cultivo a la España musulmana y a otros países cálidos del Mediterráneo, tales como Francia, Italia y Grecia. Existen en la actualidad muchas variedades que se han ido desarrollando, que conviven con variedades ancestrales de origen asiático y con variedades de otras especies, cuyo fruto también se denomina berenjena, y con las que están estrechamente emparentadas, como *Solanum aethiopicum*, especie a la que pertenecen variedades de domesticación ancestral en el África subsahariana.

Solanum melongena es una de las especies de plantas de las que se conocen aplicaciones terapéuticas y en las que se han buscado e identificado distintos compuestos bioactivos, partiendo de distintas partes de la planta.

Así, por ejemplo, el documento JP2002226387A tiene por objeto una composición farmacéutica que contiene polvo seco de berenjena para tratar de forma tópica heridas, quemaduras, acné, pie de atleta, estomatitis, inflamación, tumores...

Algunos otros estudios, como los de Zhao Dong-Yin y col. (2020), describen el aislamiento e identificación de varios sesquiterpenoides y otros compuestos de los sépalos de *Solanum melongena* mediante extracción etanólica (70%) por reflujo, seguida del aislamiento de los compuestos bioactivos por éter de petróleo. Estos compuestos fueron ensayados *in vitro* frente a líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, adenocarcinoma y cáncer gástrico.

También se han realizado estudios a partir de las raíces en los que se han aislado distintos compuestos que fueron ensayados *in vitro* en líneas de cáncer de mama. En este caso el procedimiento llevado a cabo para el desarrollo del extracto es mediante un proceso de reflujo con etanol al 70% y fraccionamiento. En los estudios de Yin Xin y col. del 2019, se aislaron varios sesquiterpenoides y ninguno de los que se sometió a ensayo mostró citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), cáncer de hígado (HepG2) o cáncer cérvico-uterino (HeLa). En los estudios de Yang Bing-You de 2020 se describe el aislamiento de terpenos, lignanos y otros compuestos también de las raíces, algunos de los cuales mostraron citotoxicidad moderada frente a las mismas líneas celulares.

Al igual que en los sépalos y las raíces, también se han encontrado compuestos bioactivos (glicoalcaloides, y en particular la solamargina) en la piel de la fruta que han sido ensayados, y han mostrado efectividad, contra el carcinoma hepático (Fekry y col., 2019) y cáncer de pulmón (Shen y col., 2017) y que fueron obtenidos mediante extracción metanólica y etanólicas (70%) y usando HPLC (70%). Por último, antocianinas y derivados de delfinidina de la piel de la berenjena, que fueron aislados mediante una extracción llevada a cabo mediante inmersión en metanol, han demostrado tener actividad antioxidante en líneas celulares de cáncer de colon (Jing y col., 2015).

La actividad anticancerígena de glicoalcaloides ya había sido observada por Lee y col en 2004, quienes realizaron un estudio sobre diferentes glicoalcaloides de patatas, berenjenas y tomates y su actividad en células de cáncer de colon HT-29 y cáncer de hígado HepG2. Los glicoalcaloides mayoritarios identificados en *Solanum melongena* fueron la solamargina y la solanina. En general, los glicoalcaloides demostraron tener cierta actividad anticancerígena, aunque su efectividad fue mayor en los ensayos con la línea celular de cáncer de hígado que contra las células de cáncer de colon.

Así, aunque algunos estudios analizan la presencia de compuestos bioactivos en distintas partes de la planta de la especie *Solanum melongena* y analizan, de forma individual para cada compuesto, su actividad en diferentes tipos de tumores, son escasas las investigaciones en relación con los mecanismos moleculares por los que actúan estos compuestos, estudios que serían fundamentales para dilucidar las vías por las que los extractos funcionales o compuestos aislados podrían actuar frente a las células tumorales. Entre los pocos trabajos que abordan los aspectos de la actividad molecular de los extractos, se encuentra el estudio realizado por Nishina y col. (2015), en el que a partir de un extracto metanólico de *Solanum melongena* L. aislaron un compuesto bioactivo, la dioscina, el cual actúa como un agente inhibidor de la melanogénesis mediante la desregulación de la proteína fosfo-CREB, que se une y activa a MITF (Factor de transcripción asociado con microftalmia implicado en el desarrollo de melanocitos y osteoclastos).

Por otra parte, aunque hay estudios centrados en otras partes de la planta, las semillas parecen haber sido objeto de menor atención: no hay artículos publicados recientemente en los que se estudien la actividad antitumoral de extractos funcionales a partir de semillas de *Solanum melongena* o se aislen compuestos bioactivos de los mismos. Sólo un estudio publicado en 1985 describe el aislamiento de 3 saponinas a partir de semillas de *Solanum melongena* mediante reflujo con metanol durante 4 horas a 65°C y concentración del extracto a presión reducida. Sin embargo, este estudio no reportó actividad antiproliferativa de estos compuestos (Kintia y Shvets. 1985).

Dada la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas alternativas frente al CCR, sería interesante si se pudieran encontrar nuevos anticancerígenos que actuaran sobre el mismo, preferiblemente con actividad antitumoral selectiva. Para simplicidad, sería interesante si dicha actividad se pudieran encontrar en un extracto vegetal, preferiblemente de una planta con partes comestibles, como es el caso de la planta de la berenjena, que tuviera actividad como tal extracto, sin necesidad de aislar los compuestos bioactivos presentes en el mismo (aun siendo posible dicho aislamiento), y que el extracto pudiera obtenerse mediante una metodología que facilitara su uso como anticancerígeno a concentraciones en las que dicho extracto mostrara toxicidad reducida contra células no cancerígenas. También sería una característica adicional preferible que dicho extracto contuviera más de un componente que presentara actividad anticancerígena (o terapéutica en general) de por sí, lo que permitiría la preparación de composiciones farmacéuticas combinadas con dos o más de dichos compuestos bioactivos. Además, sería conveniente conocer, preferiblemente con cierta

profundidad, los mecanismos moleculares y celulares por los que dichos extractos provocan la muerte celular tumoral.

La presente invención proporciona una solución a dicho problema, que presenta también
5 varias de las ventajas adicionales deseables arriba indicadas.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto
10 vegetal etanólico procedente de semillas maduras de *Solanum melongena*, que comprende las etapas de:

- a) moler la semilla para obtener harina;
- b) extraer la harina de la etapa a) mediante una solución hidroalcohólica de extracción en frío y a pH ácido; y
- 15 c) opcionalmente, desengrasar la semilla madura mediante prensado mecánico en frío antes de realizar las etapas a) y b).

Preferiblemente, el procedimiento de la invención se lleva a cabo en las siguientes condiciones:

- 20 a) la semilla se muele hasta obtener harina con un tamaño de partícula de entre 100 μm y 150 μm ; y/o
- b) la harina obtenida en la etapa a) se extrae con la solución hidroalcohólica de extracción en las siguientes condiciones:
 - i. temperatura igual a 4 °C,
 - 25 ii. en atmósfera reductora de nitrógeno,
 - iii. la solución de extracción se compone de etanol, agua bidestilada y ácido clorhídrico 12N en proporciones 50 : 50 : 0,2 en volumen,
 - iv. pH igual a 2,
 - v. la mezcla de la harina y la solución de extracción se mantiene en agitación
 - 30 durante 30 minutos tras haber alcanzado las condiciones i a iv, y donde el extracto etanólico se obtiene centrifugando la mezcla de la solución de extracción y la harina y recogiendo el sobrenadante.

Se prefiere muy especialmente que se lleve a cabo el desengrasado previo a la obtención
35 de la harina, a una temperatura de entre 40 a 50°C y con una velocidad de extracción de 2 a 3 kg de semilla/hora.

En otra realización preferida, se efectúa una nueva extracción sobre el residuo resultante de la primera extracción, concretamente sobre el precipitado resultante de obtener un extracto inicial tras centrifugación, aplicando las siguientes subetapas:

- 5 i) el precipitado resultante de centrifugar la mezcla de la harina y la solución de extracción se resuspende en solución de extracción,
- ii) la suspensión obtenida se mantiene de nuevo en agitación durante 30 minutos en las condiciones de la etapa b) definidas en la reivindicación 2,
- iii) la suspensión se somete a centrifugación, recogándose el sobrenadante, y
- 10 iv) el extracto etanólico resulta de mezclar el sobrenadante obtenido en iii) con el primer sobrenadante obtenido.

El procedimiento de la invención puede contener una etapa final adicional en la que se evapora parcial o totalmente el etanol del extracto etanólico obtenido.

15

En otro aspecto, la invención se refiere a un extracto etanólico de semillas maduras de *Solanum melongena*, particularmente con alto contenido fenólico. Preferiblemente, dicho extracto será un extracto obtenible por el método de la presente invención.

- 20 El extracto etanólico, según los ensayos del Ejemplo 1, presenta un contenido fenólico total que oscila entre 11,16 y 27,59 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto. Preferiblemente, el contenido fenólico total oscila entre 12,06 y 27,59 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto (que son los valores extremos determinados a partir de extractos procedentes de harina desengrasada). También es de interés el caso en el que el contenido
- 25 fenólico total oscila entre 11,16 y 18,41 y/o la capacidad reductora oscila entre 5,33 y 6,31 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto (valores obtenidos en los extractos de la variedad S0506).

- En otra posible realización, compatible con las anteriores, el extracto etanólico comprende
- 30 al menos salannina y/o capsianósido II. Preferiblemente, adicionalmente a los dos compuestos anteriores, el extracto etanólico comprende al menos un compuesto bioactivo más seleccionado del grupo de kaempferol 3-soforotriósido, myricomplanósido y arillatosa B, o combinaciones de ellos tres, con particular preferencia por que el extracto etanólico comprenda, adicionalmente a salannina y capsianósido, myricomplanósido y/o arillatosa B,
- 35 o arillatosa B y kaempferol 3-soforotriósido. Más preferiblemente, el extracto etanólico

comprende, al menos, los cinco compuestos anteriores: salannina, capsianósido II, myricomplanósido, arillatosa B y kaempferol 3-soforotriósido.

Como en el caso del procedimiento de la invención, y en los otros aspectos de la invención que se describen más adelante, se prefieren las realizaciones que corresponden a extractos obtenidos de harina de semillas maduras de variedades de *Solanum melongena*, preferiblemente desengrasadas. Así, en el caso del extracto etanólico de la invención, se prefiere que cumpla la definición en función de los parámetros bioquímicos obtenibles de semillas maduras de variedades de *Solanum melongena*, es decir, el extracto donde

i) el contenido fenólico total varía desde 12,06 a 27,59 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto, y/o

ii) el extracto comprende al menos salannina, capsianósido II y myricomplanósido.

También se prefieren los extractos de la invención obtenidos de semillas maduras de la muestra S0506, tanto de harina desengrasada como sin desengrasar, por lo que son también extractos preferidos de la invención aquellos donde

i) el contenido fenólico total varía de 11,16 a 18,41 y/o la capacidad reductora oscila entre 5,33 y 6,31 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto, y/o

ii) el extracto comprende salannina, capsianósido II, myricomplanósido, arillatosa B y kaempferol 3-soforotriósido.

En cualquiera de las definiciones, se prefiere que el extracto se haya obtenido por el procedimiento de la presente invención, en su definición más general o en alguna de sus posibles realizaciones; se incluye dentro de ellas la posibilidad de que se lleve a cabo la etapa adicional final opcional en la que se lleva a cabo la evaporación final, parcial o total, del etanol. Se prefiere, de nuevo, que se haya llevado a cabo la etapa de desengrasar la semilla madura mediante prensado mecánico en frío antes de realizar la etapa a) de moler la semilla y la etapa b) de extraer la harina obtenida y, especialmente, que cada una de las posibles etapas (desengrasado, molienda y extracción propiamente dicha) se lleven a cabo con las características definitorias expresadas al describir las posibles realizaciones del método de la invención, incluyendo la realización de una segunda extracción sobre el precipitado resultante de la centrifugación que da lugar al extracto inicial.

Es también un aspecto de la presente invención una composición farmacéutica, que será considerada una composición farmacéutica de la presente invención, que comprende en su formulación un extracto de la presente invención, en cualquiera de las posibles

realizaciones que se han descrito más arriba, como por ejemplo la de los extractos obtenidos por el método de la presente invención en los que se ha llevado a cabo la evaporación final, parcial o total, del etanol. La composición puede ser una composición farmacéutica combinada que adicionalmente comprende al menos un agente anticancerígeno adicional a los presentes en el extracto. En otra posible realización, también compatible con cualquier otra, la composición puede comprender, además, uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Puede considerarse también que el anterior aspecto de la invención implica también que está comprendido dentro de la presente invención el uso de un extracto de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica, particularmente si la misma está destinada al tratamiento del cáncer, especialmente si el mismo se selecciona del grupo de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.

También son aspectos de la invención un extracto de la presente invención, o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en el tratamiento de un tipo de cáncer que se selecciona del grupo de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma. Más concretamente, el cáncer puede seleccionarse del grupo de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pancreático y glioblastoma multiforme. En estos aspectos de la invención, tanto el referido al extracto como a la composición farmacéutica, se prefieren los extractos obtenidos de semillas maduras, especialmente desengrasadas pero también sin desengrasar, y las composiciones farmacéuticas preparadas a partir de los mismos.

Los aspectos referidos al uso terapéutico de un extracto de la invención o de una composición farmacéutica de la invención puede también definirse, o están relacionados con, un método de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer que se selecciona entre cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma, que comprende la administración de una composición farmacéutica de la invención o de una cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto de la invención. El sujeto, al igual que en la definición del extracto de la invención o la composición farmacéutica de la invención para uso terapéutico, puede ser cualquier mamífero, con preferencia por un ser humano.

Descripción de los dibujos

La figura 1.- Muestra un esquema de la metodología para la obtención de un extracto etanólico a partir de harina de semilla.

La figura 2.- Muestra una imagen representativa de la diferencia macroscópica entre extractos etanólicos de la harina de la semilla madura de *Solanum melongena* muestra S0506 sin desengrasar (a), y de la semilla madura de *Solanum melongena* muestra S0506 previamente desengrasada (b) en base a la diferente presencia de compuestos lipídicos.

La figura 3.- Muestra una gráfica de la cromatografía de los extractos etanólicos a partir de la harina de semilla a) sin desengrasar y b) previamente desengrasada de *Solanum melongena* muestra S0506.

La figura 4.- Muestra una gráfica de la cromatografía de los extractos etanólicos a partir de harina desengrasada de las muestras de *Solanum melongena*: a) S0504, b) S0505, c) S0503.

La figura 5.- Muestra el revelado de membranas de Western Blot para expresión de Caspasa 3, 8 y 9 en células de la línea tumoral de colon T84 tratadas con una IC₅₀ del extracto etanólico a partir de harina de semilla madura desengrasada de *Solanum melongena* S0506, así como en células control (células de la línea tumoral de colon T84 sin tratamiento).

La figura 6.- Muestra una representación del nivel de expresión de las Caspasas 3, 8 y 9 en células tumorales de colon T84 tratadas con una IC₅₀ del extracto etanólico a partir de harina de semilla madura desengrasada de *Solanum melongena* S0506.

La figura 7.- Muestra imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia del efecto que tiene el extracto etanólico de harina desengrasada de *Solanum melongena* S0506 sobre la polimerización/despolimerización de los microtúbulos en las células T84, empleando inmunofluorescencia con el anticuerpo para α -tubulina.

La figura 8.- Muestra imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de las células T84 tratadas con extracto etanólico de harina desengrasada de *Solanum melongena* S0506 en la que se observan la formación de vesículas autofágicas empleando el ensayo del LysoTracker^(R) (sonda altamente selectiva para orgánulos ácidos que consiste en un fluoróforo vinculado a una base débil).

La figura 9.- Muestra imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de la formación de vasos sanguíneos por las células HUVEC en presencia de varios medios condicionados.

- 5 La figura 10.- Muestra la representación gráfica de los segmentos, tamaño de los segmentos, nodos formados, uniones y mallas (meses) formados durante la angiogénesis por parte de las células HUVEC tras la exposición de las mismas a diferentes medios condicionados.
- 10 La figura 11.- Muestra la representación de los valores relativos de expresión de siete marcadores celulares de células madre tumorales (CD133, CD24, CD44, SOC2, OCT4 y NANOG) cuantificados mediante qPCR.

Descripción detallada de la invención

- 15 La presente invención se basa en la obtención y en un análisis profundo de extractos etanólicos de una especie vegetal del género *Solanum* (Solanaceae), más concretamente, obtenidos de la harina de la semilla madura de *Solanum melongena* (berenjena).

- 20 Hasta el momento, en la bibliografía existente, aparecen extractos obtenidos de diferentes partes (sépalos, raíces, frutos, piel de los frutos...) de *Solanum melongena*, en general realizados con el uso de disolventes orgánicos altamente tóxicos y/o procesos de extracción de gran complejidad y duración tras los que se obtienen una gran variedad de componentes (flavonoides, cumarinas y terpenoides) que pueden aumentar su toxicidad. Ese es el caso,
- 25 por ejemplo, del estudio de Kintia y Shvets de 1985 comentado en la sección anterior de “Antecedentes de la invención”, en el que se obtuvo un extracto de semillas de dicha planta, pero en el que se utilizó metanol a reflujo, compuesto conocido por tener una toxicidad superior a la del etanol a menores concentraciones, pudiendo causar mareos, náuseas, vómitos, daños al sistema nervioso y hasta la muerte. En dicho estudio, se aislaron y
- 30 caracterizaron varias nuevas saponinas, pero no se reportó que las mismas tuvieran actividad frente a cáncer de colon, páncreas, o glioblastoma. De hecho, no existen en la actualidad estudios de compuestos bioactivos con actividad antitumoral frente a cáncer de colon obtenidos a partir de las semillas de *Solanum melongena*.

- 35 Por otra parte, los estudios de extractos de otras partes de la planta (sépalos, raíces...) obtenidos con etanol a reflujo se han centrado en el aislamiento de determinados

compuestos presentes en los extractos y, en el caso de haberse realizado ensayos antiproliferativos, en probar la posible citotoxicidad de dichos compuestos, de forma individual, frente a determinadas líneas de cáncer, entre las cuales, en general, no se incluían líneas de cáncer de colon, páncreas o glioblastoma.

5

En respuesta a los posibles inconvenientes presentados por los extractos de distintas partes de la planta descritos en el estado de la técnica, los presentes inventores han desarrollado un extracto que presenta bioactividad favorable y puede obtenerse a partir de semillas maduras de la planta, utilizando procesos de extracción sencillos, de corta duración y
10 utilizando solventes no tóxicos, al tiempo que permite unos rendimientos de extracción adecuados. Este nuevo extracto presenta además una composición más específica de sustancias activas y de baja toxicidad como son los compuestos fenólicos de *Solanum melongena*.

15 La presente invención se basa en:

1) El desarrollo de un extracto etanólico a partir de harina de semilla madura de *Solanum melongena* que, una vez analizada, posee un elevado contenido fenólico. El extracto se ha obtenido a partir de la harina de las semillas maduras, sin desengrasar y, de la harina de
20 semillas madura, previamente desengrasadas, tras un proceso de extracción etanólica en frío (a temperatura entre 0°C y 8°C, preferiblemente a 4°C) de corta duración (preferiblemente, con un máximo de 1 – 2 horas totales de tiempo de contacto del etanol con la harina y el posible pellet resultante de un primer proceso de extracción), bajo atmósfera de Nitrógeno y en medio ácido, el cual se compone en su gran mayoría de
25 compuestos fenólicos disueltos en un solvente de baja toxicidad.

2) La potente actividad antitumoral de los extractos de semilla de *Solanum melongena* cuando son testados en cultivos celulares de cáncer de colon humanos y murinos (T84 de cáncer colorrectal humano metastásico, HCT15 de cáncer colorrectal con mecanismos de
30 resistencia multidrogas (MDR) y MC38 de cáncer colorrectal murino desarrollado en ratones C57BL6) utilizando como control la línea de hepatocitos humanos HepG2 y así poder determinar también el rango terapéutico. Así mismo, se han estudiado los mecanismos de acción por los que los extractos actúan sobre las células tumorales para dilucidar las rutas moleculares que activan la muerte celular.

35

Los resultados obtenidos por la investigación que se divulga en la presente solicitud demuestran que:

- 5 1) La metodología empleada para la obtención del extracto etanólico (extracción hidroalcohólica) a partir de la harina procedente de semillas maduras, sin desengrasar y desengrasadas, de *Solanum melongena*, da como resultado un producto con alto contenido fenólico.
- 10 2) El procesamiento metodológico de desengrasado, que se corresponde con realizaciones preferidas de la presente invención, supone una alternativa con algunas ventajas adicionales para el desarrollo posterior del extracto etanólico de la presente invención. El proceso de desengrasado va a permitir, por una parte, la concentración en la harina desengrasada de compuestos fenólicos de alta capacidad bioactiva que asegure un rendimiento de extracción elevado, y, por otra, la
15 eliminación de compuestos diterpenoides que pueden resultar tóxicos. Aun así, como puede verse en el Ejemplo 2 más adelante, en los ensayos realizados con distintas líneas celulares derivadas de cáncer de colon, tanto el extracto de la harina de semilla madura sin desengrasar como de la semilla madura desengrasada, poseen una gran actividad antiproliferativa, presentando unas IC₅₀ muy reducidas en ambos
20 casos, lo que permite plantearse el uso de ambos extractos para la preparación de composiciones farmacéuticas. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que ambos extractos muestran también capacidad antiproliferativa frente a otros tipos de cáncer, como el glioblastoma multiforme o el adenocarcinoma de páncreas, por lo que ambos extractos, o composiciones farmacéuticas preparadas a partir de los mismos, podrían
25 usarse también para el tratamiento de esos otros dos tipos de cáncer.
- 30 3) El extracto etanólico de la harina (tanto sin desengrasar como desengrasada) de la semilla madura de distintas variedades de *Solanum melongena* posee una elevada actividad antitumoral, específicamente en células derivadas de cáncer de colon tanto
35 resistentes como no resistentes a quimioterapia así como murinas, induciendo un potente efecto antiproliferativo, que no se observó en las células de hepatocitos humanos, por lo que existe un amplio rango terapéutico.
- 4) Los valores de IC₅₀ (concentración de un agente que inhibe al 50% un proceso
biológico celular, proceso que en los ensayos de la presente solicitud es la
proliferación celular) observados en líneas de adenocarcinoma humano al ser

ensayadas frente a extractos etanólicos obtenidos de semillas maduras de *Solanum melongena* son muy bajos y por tanto son idóneos para ser ensayados en un uso potencial frente a cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y/o glioblastoma.

- 5 5) El efecto antiproliferativo del extracto etanólico procedente de harina de semilla, tanto desengrasada como sin desengrasar, de *Solanum melongena*, también posee una elevada actividad antitumoral frente a líneas celulares de glioblastoma multiforme, incluso en líneas celulares resistentes a quimioterapia; teniendo en cuenta que este es uno de los cánceres más agresivos, que presentan mayor resistencia a los
10 citotóxicos de uso habitual en clínica y con menor arsenal terapéutico en la actualidad, esta propiedad del extracto etanólico puede considerarse de especial interés clínico. También se observan efectos antiproliferativos frente a líneas celulares de cáncer de páncreas, lo que posibilita plantearse que los extractos etanólicos obtenidos de estas semillas se usen para esta aplicación terapéutica.
15
- 6) La actividad antitumoral que presenta el extracto etanólico funcional a partir de semilla desengrasada de *Solanum melongena*, concretamente el obtenido de la muestra S0506, implica la activación de la ruta de las caspasas, tanto la vía intrínseca como extrínseca, produciéndose muerte celular por apoptosis. Además, este extracto
20 induce muerte celular a partir de un trastorno en la polimerización/despolimerización de los microtúbulos celulares.
- 7) La actividad antitumoral que presenta el mismo extracto etanólico del punto 6), obtenido a partir de semilla desengrasada de *Solanum melongena*, implica también,
25 aunque en una menor proporción, la activación de las rutas autofágicas para inducir muerte celular.
- 8) El extracto etanólico de semillas maduras desengrasadas de *Solanum melongena*, de acuerdo con los ensayos realizados con el extracto obtenido de la muestra S0506,
30 impide una correcta comunicación de las células tumorales con las células endoteliales, disminuyendo así el proceso de angiogénesis, y por tanto, la formación de vasos sanguíneos.
- 9) El extracto etanólico de semillas maduras desengrasadas de *Solanum melongena*, los ensayos realizados con el extracto obtenido de la muestra S0506, disminuye
35 selectivamente la población de células madre tumorales (CSCs) presente en el

cáncer de colon, células que son responsables de las recidivas del tumor y de los fenómenos de resistencia a los tratamientos.

10) El análisis cromatográfico, acoplado a espectrometría de masas, realizado en los extractos obtenidos de cada una de las muestras (Ejemplo 1), evidencia que hay compuestos que aparecen en la mayoría de los extractos, entre los que destacan algunos compuestos previamente aislados de diversas plantas para los que ya se había descrito actividad biológica, tales como la salannina, capsianósido II, myricomplanósido, arillatosa B y kaempferol 3-soforotriósido. Así, como se comentó anteriormente, en ensayos realizados de forma individual, la salannina había mostrado actividad inhibitoria de la melanogénesis y actividad antiproliferativa frente a líneas de osteosarcoma y neuroblastoma. El myricomplanósido se ha relacionado con actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa, mientras que los capsianósidos se caracterizan por interferir en la función del citoesqueleto y el kaempferol 3-soforotriósido se relaciona con actividad antioxidante y hepatoprotectora.

Así, la metodología de extracción etanólica proporcionada por la presente invención permite la obtención de un extracto no tóxico para su empleo en biomedicina, particularmente como antitumoral. Dicha metodología representa una enorme ventaja para la finalidad de su aplicación en pacientes, pues se basa en la utilización de etanol, un solvente que es usado de forma habitual y a bajas concentraciones para la administración de principios activos.

Ejemplos

Dado el interés científico que subyace en la especie *Solanum melongena*, en los ensayos expuestos a continuación se han estudiado extractos etanólicos a partir de semillas maduras de diferentes variedades de esta especie, cedidos por la empresa de fitomejoramiento Agrotec Solutions SL, perteneciente al Grupo Empresarial Cellbitech (www.cellbitech.com).

Se han utilizado semillas de cuatro variedades de diferentes tipologías de la especie *Solanum melongena*, que cubren el más amplio espectro de caracterización de esta especie, siguiendo las recomendaciones de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, www.upov.int) definidas en el documento TG/117/4

(<https://www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg117.pdf>), siendo las muestras las que a continuación se relacionan:

1. Variedad S0503, Berenjena (*Solanum melongena*): Esta variedad ha sido mejorada y desarrollada por la empresa cedente siendo su caracterización tipológica de fruto semilargo, de tamaño uniforme, pocas semillas, cáliz pequeño y sin pinchos, con un peso medio de 300 a 400 gr., color de piel brillante con listado violeta sobre blanco; planta de vigor medio-alto equilibrado, con buena producción en condiciones de frío y resistencia al Virus del Mosaico del Tabaco o TMV. La muestra de semilla analizada pertenece al lote producción nº L1-S0503.
2. Variedad S0504, Berenjena (*Solanum melongena*): Esta variedad ha sido mejorada y desarrollada por la empresa cedente siendo su caracterización tipológica de fruto semilargo, de gran uniformidad, puede presentar pinchos en el cáliz con condiciones de frío, peso medio de 350 a 500 gr., color de piel negro, manteniendo la calidad hasta la salida de invierno; con planta de vigor medio, es abierta y con escasa emisión de flores secundarias, cuaja con facilidad a lo largo de todo su ciclo y se adapta bien a los ciclos largos. Apta para cultivo en invernadero, túnel y al aire libre. La muestra de semilla analizada pertenece al lote producción nº L170504.
3. Variedad S0505, Berenjena (*Solanum melongena*): Esta variedad ha sido mejorada y desarrollada por la empresa cedente siendo su caracterización tipológica de fruto cilíndrico y sin pinchos, con un peso medio de 40 a 60 gr., crecimiento en forma de ramo con entre 5 y 7 frutos, color de piel blanco y brillante; planta de vigor alto, con buena tolerancia a situaciones de estrés de altas y bajas temperaturas, buena tolerancia a enfermedades e insectos. La muestra de semilla analizada pertenece al lote producción nº L170505
4. Variedad S0506, Berenjena (*Solanum melongena*): Esta variedad ha sido mejorada y desarrollada por la empresa cedente siendo su caracterización tipológica de fruto semilargo, de tamaño uniforme, con pocas semillas, cáliz pequeño y con pinchos, con un peso medio de 300 a 450 gr., color de piel negro brillante; planta de vigor medio muy equilibrado, con fácil acceso para cosecha de fruto, recomendada para cultivo en invernadero por su carácter partenocárpico. La muestra de semilla analizada pertenece al lote producción nº L1-S0506.

- Ejemplo 1. Metodología de obtención del extracto etanólico y análisis

El método de obtención del extracto etanólico que se desarrolló a partir de la harina de la semilla madura tanto sin desengrasar como desengrasada de *Solanum melongena*, se esquematiza en la Figura 1 y fue el siguiente:

1. Según el caso:

a) Para el caso de harina sin desengrasar: Moler las semillas maduras obteniendo harina, la cual se conserva a -20°C.

b) Para el caso de la harina desengrasada: Se realiza la separación de la parte oleaginosa de la semilla madura de la parte sólida o pellet, para lo que se emplea una prensa de extracción de aceite de semillas, serie KOMET que se caracteriza por su proceso especial de prensado en frío en el que, en lugar de tornillos de compresión individuales, se utilizan transportadores de tornillo para exprimir el aceite. En esta máquina las semillas oleaginosas se presionan suavemente sin superar los 50 grados centígrados. Con una velocidad de trabajo media de 2-3 kg de semilla a la hora y un rendimiento de conversión de aceite a semilla entre el 15-25%. Como resultado, se obtiene una torta seca de forma compacta y desengrasada. A continuación, esa torta se muele a 28.000 rpm para obtener una harina desengrasada con un tamaño de partícula de entre 100 y 150 micras, la cual se conserva posteriormente a -20°C.

2. Pesar 5 g. de 1.a) o 1.b) en un vaso de precipitado e inmediatamente poner el vaso en hielo para trabajar a una temperatura de 4°C.

3. Añadir 15 ml de solución de extracción (etanol (EtOH) al 50% = 50 ml EtOH + 50 ml agua bidestilada + 0,2 ml ácido clorhídrico (HCl 12N).

4. Agitar en un agitador magnético a 300 rpm.

5. Llevar a pH 2 (añadiendo HCl 6N).

6. Añadir nitrógeno gaseoso para que no haya un ambiente oxidante y se preserven correctamente los compuestos fenólicos.

7. Dejar 30' en agitación a 4°C.

8. Centrifugar a 3000 rpm durante 5' a 4°C.

9. Recoger el sobrenadante y preservarlo a -20°C.

5

10. El precipitado se resuspende en 10 ml de solución de extracción y se realiza una segunda extracción siguiendo los pasos indicados anteriormente.

11. Finalmente, tras realizar las extracciones pertinentes, se juntan los sobrenadantes de cada extracción y se conserva a -20°C hasta su utilización.

10

12. El pellet originado en la última centrífuga se descarta.

Siguiendo el protocolo de extracción descrito, se obtuvieron extractos etanólicos de la harina de la semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, de *Solanum melongena*. El objetivo de este doble proceso fue comparar la actividad de los extractos retirando el alto porcentaje de compuestos lipídicos de la semilla madura sin desengrasar (ver Figura 2), donde puede apreciarse la diferencia macroscópica entre ambos extractos etanólicos en base a la diferente presencia de compuestos lipídicos) y comparar su actividad funcional frente a los extractos obtenidos de harina de semilla madura previamente desengrasada.

15

20

Para determinar el rendimiento, el extracto etanólico se dividió en alícuotas de 1 mL para la evaporación del etanol y posterior liofilización del agua restante en el extracto. Para la eliminación del etanol de los extractos etanólicos, este se evaporó a vacío utilizando un sistema de evaporación Savant DNA 120 (Thermo Scientific) durante 60 minutos. Tras la evaporación del etanol se congelaron en Nitrógeno líquido las alícuotas con el extracto restante y se procedió a su liofilización utilizando un liofilizador TELSTAR Cryodos-50 donde se mantuvieron 24 horas. Tras la liofilización se calculó el peso seco del extracto por diferencia con el recipiente que contenía cada alícuota y dicho peso seco se refirió a un volumen de 1 mL de extracto inicial, posteriormente al volumen total de extracto obtenido, y finalmente a los gramos de harina de semilla de partida para la preparación del extracto.

25

30

Los compuestos fenólicos totales se determinaron mediante la técnica de Dewanto y col. (2002) según lo descrito por Kapravelou y col. (2015) utilizando en la determinación una recta patrón de ácido gálico con concentraciones comprendidas entre 0 y 500 µg/mL. Por otra parte, la capacidad reductora de Fe³⁺ a Fe²⁺ por los diferentes extractos se determinó

35

espectrofotométricamente mediante la técnica de Duh y col. (1999) según lo descrito por Kapravelou y col. (2015) utilizando en la determinación una recta patrón de ácido gálico con concentraciones comprendidas entre 0 y 500 µg/mL.

- 5 La Tabla 1 muestra el rendimiento y los compuestos fenólicos totales del extracto a partir de la harina de semilla madura, sin desengrasar y previamente desengrasada, de las variedades de *Solanum melongena* S0503, S0504, S0505 y S0506. Como se puede observar en la citada Tabla, el rendimiento obtenido, en todas las variedades de *Solanum melongena*, mostró una gran variabilidad, siendo los rendimientos de los extractos a partir de semillas maduras desengrasadas, en los casos analizados, significativamente mayores que los de los extractos de las semillas maduras no desengrasadas.

15 Tabla1. Valores de rendimiento (mg/g harina) y compuestos fenólicos totales (µg equivalente ác. Gálico/mg extracto) de los extractos etanólicos de diferentes variedades a partir de semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, de *Solanum melongena* (S0503, S0504, S0505 y, S0506)

Variedades de <i>Solanum melongena</i>	Rendimiento (mg/g harina)	Compuestos fenólicos totales (µg equivalente ác. Gálico/mg extracto)
S0503 GRASA	30,90	19,95
S0503 DESENGRASADA	86,79	27,59
S0504 GRASA	35,48	15,23
S0504 DESENGRASADA	45,60	15,71
S0505 GRASA	39,68	14,44
S0505 DESENGRASADA	64,80	12,06
S0506 GRASA	42,60	11,16
S0506 DESENGRASADA	71,12	18,41

- 20 Por otra parte, la capacidad antioxidante fue analizada incluyendo estudios bioquímicos de compuestos fenólicos totales y capacidad reductora. En cuanto a compuestos fenólicos totales, los extractos etanólicos a partir de harina desengrasada y sin desengrasar, de todas las variedades testadas, presentan unos valores muy homogéneos, siendo, en general, y con excepción de la muestra S0505, mayor en los extractos etanólicos a partir de semilla

madura desengrasada (con valores que oscilan entre 12,06 y 27,59 μg equivalente ác. gálico/mg extracto para el extracto etanólico de berenjena común a partir de semilla madura desengrasada) que en los extractos etanólicos a partir de harina con grasa (11,16 μg equivalente ác. gálico/mg extracto en la S0506). De esta manera se pudo corroborar que el

5 proceso de eliminación de compuestos lipídicos, además de aumentar el rendimiento de los extractos funcionales, no altera ni elimina los compuestos bioactivos de interés; es más, se pudo confirmar que mediante este proceso previo se consigue purificar el extracto funcional.

Merecen destacarse (y así se hace a lo largo de la presente memoria descriptiva) los

10 resultados obtenidos de la muestra S0506, al ser una de las que presenta mayor rendimiento (42,6 mg/g harina en el extracto etanólico a partir de semilla madura con grasa y 71,12 mg/g harina en el extracto etanólico de semilla desengrasada). El valor de los compuestos fenólicos totales determinado en el extracto etanólico de harina de semillas madura desengrasadas (18,41 μg equivalente ác. gálico/mg extracto), es uno de los más

15 altos de entre los extractos ensayados. Además, como puede verse más adelante en el Ejemplo 2, es una de las que presenta mayor actividad antitumoral (véase Tabla 10). Por todo ello, como se mencionará más adelante, ha sido seleccionada para llevar a cabo estudios específicos para dilucidar los mecanismos moleculares de acción celular.

20 Las pruebas de capacidad reductora para la determinación bioquímica de la capacidad antioxidante se realizaron con los extractos seleccionados de la muestra S0506, obteniendo unos valores de 5,3 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto para el extracto a partir de harina de semilla madura sin desengrasar, y de 6,31 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto para el extracto etanólico a partir de harina desengrasada (Tabla 2). Por tanto, la

25 capacidad antioxidante de los extractos preparados con harina de semilla madura desengrasada fue mayor en base a que los compuestos fenólicos se obtienen en mayor cantidad.

Tabla 2. Valores de capacidad reductora (μg equivalente ác. Gálico/mg extracto) del

30 extracto etanólico a partir de semilla madura, con grasa y desengrasada previamente, de S0506

Variedad de <i>Solanum melongena</i>	Capacidad Reductora (μg equivalente ác. Gálico/mg extracto)
S0506 grasa	5,33

S0506 desengrasada	6,31
--------------------	------

Los estudios cromatográficos realizados han permitido determinar los compuestos presentes en el extracto etanólico de las harinas de semillas maduras de *Solanum melongena*. La técnica utilizada ha consistido en una Cromatografía Líquida de Resolución Ultraelevada (*Ultra Performance Liquid Chromatography*: UPLC) (ACQUITYH CLASSWATERS) acoplada a un espectrómetro de masas QTOF (SYNAP G2. WATERS). En las Figuras 3 y 4 pueden observarse las gráficas de la cromatografía de los extractos etanólicos obtenidas, bien a partir de la harina de semilla madura desengrasada y sin desengrasar de S0506 (Figura 3), o la harina de semilla madura desengrasada de las otras muestras de *Solanum melongena* (S0503, S0504, S0505) (Figura 4).

Las Tablas 3, 4, 5, 6 y 7 incluidas a continuación indican los principales compuestos identificados en cada uno de los extractos de las variedades de *Solanum melongena* y los datos cromatográficos de cada uno de ellos (para los compuestos con más de un pico cromatográfico, se indican sólo los datos de uno de los picos). Dichos compuestos, y su número en el registro del CAS (Chemical Abstract Service) son: Trimelitato de triglicidilo (No. CAS: 7237-83-4), myricomplanósido (No. CAS: 123442-26-2), Kaempferol 3-soforotriósido (No. CAS: 80714-53-0), Arillatosa B (No. CAS: 137941-45-8), Quercetin 3-rhamninósido (No. CAS: 522-12-3), Swertiajaponin 3'-O-gentiobiósido (No. CAS: 76166-51-3), Quercetin 3,7-diglucósido (No. CAS: 6892-74-6), Quercitrina (No. CAS: 522-12-3), Ramontósido (No. CAS: 133882-75-4), Macrostemonósido J (No. CAS: 159935-09-8), Salannina (No. CAS: 992-20-1), Mudanpiósido J (No. CAS: 262350-52-7), Cudranian 1, Capsianósido III (No. CAS: 121961-81-7), Protodioscina (No. CAS: 55056-80-9), Capsianósido II (No. CAS: 121924-04-7), Macrantósido I (No. CAS: 90850-94-5), Dioscina (No. CAS: 19057-60-4), Asparanina D (No. CAS: 83931-89-9), Kalambrósido A (No. CAS: 160472-99-1), Citrusina B (No. CAS: 105279-10-5), Ácido clorogénico (No. CAS: 327-97-9), Quercetin-3,4'-O-di- β -glucopiranosido (No. CAS: 29125-80-2), Myricitrina (No. CAS: 17912-87-7), Macrostemonósido J (No. CAS: 159935-09-8), Blumeósido C (No. CAS: 94657-28-8), Pikurósido (No. CAS: 231280-24-3), Kaempferol 3-(2G-xilosilrutinosido)-7-glucósido (No. CAS: 131559-51-8), Gypenósido LVI (No. CAS: 109145-67-7), Vismione D (No. CAS: 87605-72-9), Volubilósido B (No. CAS: 485807-79-2), Ácido Nonadecanoico (No. CAS: 646-30-0).

Tabla 3. Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura sin desengrasar de *Solanum melongena*, variedad S0506

Nombre	MF	PPM	TR	[M-H]-	%Conf
Trimelitato de triglicidilo	C18H18O9	-6,1	0,58	377,085	87,78
Myricomplanósido	C22H22O13	7,9	2,46	493,1021	99,74
Kaempferol 3-soforotriósido	C33H40O21	1,6	2,46	771,1996	100
Quercetin 3-rhamnínósido	C33H40O20	2,9	2,76	755,2057	99,96
Swertiajaponin 3'-O-gentiobiósido	C34H42O21	2,7	2,76	785,2161	97,22
Arillatosa B	C22H30O14	-8	2,98	517,1553	98,87
Quercetin 3,7-diglucósido	C27H30O17	4	2,98	625,143	99,55
Quercitrina	C21H20O11	6,5	4,01	447,0956	97,68
Ramontósido	C34H38O16	1,4	4,01	701,2092	99,84
Macrostemonósido J	C45H76O20	-1,2	4,48	935,4841	90,22
Capsianósido II	C50H84O25	-7,9	5,2	1083,5137	85,84
Salannina	C34H44O9	-1,2	11,6	595,29	98,45

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; %Conf: porcentaje de confiabilidad.

Tabla 4. Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada de *Solanum melongena*, variedad S0506.

Nombre	MF	PPM	TR	[M-H]-	%Conf
Mudanpiósido J	C31H34O14	-3	1,34	359,1851	99,71
Kaempferol 3-soforotriósido	C33H40O21	3,9	2,46	771,2014	99,58
Myricomplanósido	C22H22O13	7,5	2,46	493,1019	91,22
Arillatosa B	C22H30O14	0,8	2,75	517,1561	99,95
Cudranian 1	C28H26O12	-3,3	2,75	553,1328	99,36
Quercetin 3,7-diglucósido	C27H30O17	1,9	2,99	625,1417	99,95
Ramontósido	C34H38O16	5,1	3,62	701,2118	99,56
Capsianósido III	C50H84O26	-7,6	5,2	1099,5089	99,98
Protodioscina	C51H84O22	3,2	5,2	1047,514	78,86
Capsianósido II	C50H84O25	-8,1	6,5	1083,5135	99,54
Macrantósido I	C45H74O19	-2	6,5	917,4728	99,86
Asparanina D	C50H82O21	-1,1	7,11	1017,5259	99,9
Dioscina	C45H72O16	0,9	9,5	867,475	99,07
Protodioscina	C51H84O22	0,4	10,17	1047,538	97,27
Salannina	C34H44O9	-3,2	11,48	595,2888	95,17

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; %Conf: porcentaje de confiabilidad.

Tabla 5. Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada de *Solanum melongena*, variedad "S0503"

Nombre	MF	PPM	TR	[M-H]-	%Conf
Trimelitato de triglicidilo	C18H18O9	8,8	0,99	377,0906	94,2
Mudanpiósido J	C31H34O14	-4,6	1,1	629,1841	98,48
Mudanpiósido J	C31H34O14	0,8	2,57	629,1875	99,98
Myricomplanósido	C22H22O13	9,3	3,23	493,1028	99,94
Capsianósido II	C50H84O25	-1,7	5,82	1083,5205	95,55
Kalambrósido A	C32H36O18	6,1	3,93	707,1866	99,82
Citrusina B	C27H36O13	0,8	4,32	567,2105	93,89
Ramontósido	C34H38O16	1	5,16	701,2089	99,67
Capsianósido II	C50H84O25	-0,2	5,75	1083,5221	99,69
Salannina	C34H44O9	-3,4	10,78	595,2880	94,29

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; %Conf: porcentaje de confiabilidad.

Tabla 6. Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada de *Solanum melongena*, variedad "S0504".

Nombre	MF	PPM	TR	[M-H]-	%Conf
Blumeósido C	C24H28O14	8,3	0,93	539,1446	99,8
Pikurósido	C23H30O14	0,9	3,13	529,1562	99,81
Myricomplanósido	C22H22O13	4,7	3,13	493,1005	90,01
Kaempferol 3-(2G-xilosilrutínósido)-7-glucósido	C38H48O24	4,5	3,97	887,2497	98,06
Capsianósido II	C50H84O25	-1,1	5,71	1083,5211	98,03
Gynostemma PE.	C53H90O23	1,3	6,24	1093,5809	94,47
Salannina	C34H44O9	-5,9	11,24	595,2872	96,35

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; %Conf: porcentaje de confiabilidad.

Tabla 7. Compuestos bioactivos del extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada de *Solanum melongena*, variedad "S0505".

Nombre	MF	PPM	TR	[M-H]-	%Conf
Myricomplanósido	C22H22O13	5,9	3,09	493,1011	97,86
Arillatosa B	C22H30O14	-1,2	3,58	517,1551	98,84
Kaempferol 3-(2G-xilosilrutínósido)-7-glucósido	C38H48O24	0,9	3,9	887,2465	97,8
Capsianósido II	C50H84O25	-2,2	5,71	1093,5199	97,36
Vismione D	C25H30O5	-5,6	6,2	409,1992	94,56
Volubilósido B	C47H78O20	6,3	8,44	961,5069	89,45

Ácido Nonadecanoico	C36H68O10	-1,5	8,72	659,4724	99,39
Salannina	C34H44O9	-4,9	11,1	595,2878	95,61

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; %Conf: porcentaje de confiabilidad.

Entre los compuestos presentes en la gran mayoría de los extractos, tanto a partir de la harina de semillas maduras sin desengrasar como desengrasada, destacan la Salannina (C34H44O9), Kaempferol 3-soforotriósido (C33H40O21), Myricomplanósido (C22H22O13), Arillatosa B (C22H30O14) y Capsianósido II (C50H84O25) (Figuras 3,4,5,6,7). La actividad biológica de estos compuestos ha sido estudiada de forma aislada.

Como se ha podido observar, los extractos etanólicos de las variedades a partir de semillas maduras, tanto con grasa como desengrasadas, de *Solanum melongena* comparten, en su gran mayoría, varios compuestos bioactivos descritos anteriormente. Esto es lógico, ya que las diferentes muestras utilizadas pertenecen genéticamente a la misma especie vegetal y los compuestos activos forman parte de importantes rutas metabólicas, aunque hay que destacar que morfológicamente, los frutos, como se indica en el protocolo UPOV TG/117/4 pueden ser muy variados perteneciendo todas las variedades fenotípicas a la misma especie, es decir *Solanum melongena*.

Debido a la carencia de estudios sobre compuestos bioactivos presentes en las semillas maduras de la especie *Solanum melongena* con actividad antitumoral en cáncer de colon, y del escaso conocimiento sobre la actividad que pueden presentar los principales compuestos que lo integran de forma independiente, en la investigación divulgada en la presente solicitud, no sólo se estudiaron las propiedades antitumorales que tienen los extractos etanólicos de la invención en cáncer de colon, sino que se profundizó en la actuación de estos compuestos y su acción combinada.

- Ejemplo 2. Determinación de la capacidad antitumoral de los extractos

Para determinar la capacidad antitumoral de los extractos, se cultivaron las líneas celulares T84 (línea celular humana de adenocarcinoma de colon), HCT15 (línea celular humana de adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia) y MC38 (línea celular murina de adenocarcinoma de colon). Como control, fue seleccionada la línea HepG2 (línea celular

de hepatocitos humanos cuya gran diferenciación las hace adecuadas como modelo para el estudio de los hepatocitos humanos en diversos tipos de ensayos, incluidos los ensayos de actividad de fármacos o compuestos activos, en los que se utilizan a menudo como controles).

5

Los extractos etanólicos fueron evaporados previamente para evitar la toxicidad que provoca el etanol sobre las líneas celulares. Además, una vez evaporados, una parte fue liofilizada para conocer la cantidad de extracto obtenida y cuantificar su concentración (mg/ml), con la cual se calcularán las diferentes concentraciones que se van a testar. Los

10 cultivos celulares fueron expuestos a concentraciones crecientes del extracto etanólico evaporado de harina de semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, de todos los tipos de *Solanum melongena*, lo que permitió determinar la dosis inhibitoria 50 (IC₅₀) (concentración del extracto a la cual inhibe al 50% de la población celular) mediante la técnica de Sulforodamina B. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

15

Tabla 8. Capacidad antitumoral de los extractos a partir de harina de semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, de distintas variedades de *Solanum melongena* (S0503, S0504, S0505 y S0506) *in vitro* a 72 horas en diferentes líneas de cáncer de colon.

Variedades	IC ₅₀ (µg/ml) en cada línea celular indicada		
	T84	HCT15	MC38
S0503 SIN DESENGRASAR	25,71	29,68	27,58
S0503 DESENGRASADA	29,96	30,71	29,99
S0504 SIN DESENGRASAR	25,45	39,30	32,06
S0504 DESENGRASADA	30,10	38,60	43,78
S0505 SIN DESENGRASAR	22,10	32,16	20,92
S0505 DESENGRASADA	25,09	36,88	28,74
S0506 SIN DESENGRASAR	23,88	37,07	48,58
S0506 DESENGRASADA	35,07	29,63	39,3

20 T84: línea celular humana de adenocarcinoma de colon; HCT15: línea celular humana de adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia; MC38: línea celular murina de adenocarcinoma de colon. IC₅₀: concentración que inhibe al 50% de las células.

Como puede verse en la Tabla anterior, para el extracto etanólico de semillas maduras no desengrasada de la variedad S0506, las IC₅₀ fueron las siguientes: 23,88 µg/ml en T84, 37,07 µg/ml en HCT15 y 48,58 µg/ml en MC38. Para los extractos a partir de harina de semilla madura desengrasada S0506, las IC₅₀ fueron: 35,07 µg/ml en T84, 29,63 µg/ml en HCT15 y 39,3 µg/ml en MC38. Cabe destacar que la IC₅₀ del extracto etanólico de harina desengrasada de S0506 en la línea de hepatocitos humanos HepG2 fue de 99,87 µg/ml, lo que deja un rango terapéutico aceptable para poder realizar investigación posterior *in vivo*. Asimismo, en el resto de variedades de *Solanum melongena*, se observaron IC₅₀ muy similares.

A la vista de los resultados, se observa que los extractos etanólicos de las harinas de semillas maduras, tanto sin desengrasar como desengrasada, de *Solanum melongena* poseen una elevada actividad antiproliferativa, siendo las IC₅₀ muy bajas y homogéneas entre las diferentes muestras ensayadas. Este hecho es de destacar, ya que indica que el proceso de desengrasado no altera excesivamente la capacidad antitumoral del extracto obtenido y, en algunos casos (como el de la actividad sobre células HCT15 del extracto obtenido de harina de semillas maduras de la muestra S0506), incluso la incrementa. Por otra parte, es relevante la diferencia existente entre las IC₅₀ de las líneas tumorales (T84, HCT15 y MC38) y la línea no tumoral (HepG2), siendo en esta significativamente mayor.

Debido a que los extractos de la harina de semilla madura, tanto sin desengrasar como desengrasada, poseen una actividad antitumoral similar y que los extractos de harina semilla madura desengrasada tienen mayor rendimiento y mayor concentración de compuestos fenólicos, se decidió usar el extracto etanólico de harina de semilla madura desengrasada para llevar a cabo el resto de pruebas moleculares que se detallan a continuación. Además, se seleccionó para dichas pruebas, como representante de los demás extractos, el extracto etanólico de harina desengrasada de la muestra S0506, por su menor valor de IC₅₀ para la línea HCT15 y su elevado rendimiento.

Por último, y en base a los resultados previos en las líneas celulares de cáncer de colon, los extractos etanólicos de todas las variedades, tanto de harina desengrasada como sin desengrasar, fueron testados en las líneas celulares de glioblastoma multiforme y de adenocarcinoma pancreático. Para ello, se cultivaron las líneas celulares A-172 y LN-229 (línea celular humana de glioblastoma), SF-268 y SK-N-SH (líneas celulares humana de glioblastoma resistente a quimioterapia), así como la línea celular Panc-1 (línea celular humana de adenocarcinoma pancreático). Utilizando el mismo procedimiento descrito

anteriormente, se determinaron las IC₅₀ de las líneas celulares objeto de estudio. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados del empleo de extracto etanólico de harina de semilla madura, sin desengrasar y desengrasada, de distintas variedades de *Solanum melongena*, testado en líneas celulares de glioblastoma multiforme y de adenocarcinoma pancreático.

Variedades	IC ₅₀ (µg/ml) en cada línea celular indicada				
	SF-268	SK-N-SH	A-172	LN-229	Panc-1
S0503 GRASA	35,41	36,48	37,43	34,84	50,24
S0503 DESENGRASADA	26,19	26,47	24,6	29,71	49,39
S0504 GRASA	44,06	48,56	49,23	45,96	41,43
S0504 DESENGRASADA	35,60	36,12	32,78	35,15	65,67
S0505 GRASA	44,99	43,63	33,59	44,22	47,08
S0505 DESENGRASADA	28,67	29,39	26,3	27,67	44,02
S0506 GRASA	23,89	25,70	24,15	21,22	45,29
S0506 DESENGRASADA	35,36	37,75	36,11	37,96	49,02

Para el extracto etanólico de harina sin desengrasar S0506, la IC₅₀ fue de 23,89 µg/ml en SF-268, 25,70 µg/ml en SK-N-SH, 24,15 µg/ml en A-172 y 21,22 en LN-229, mientras que en la línea derivada de adenocarcinoma pancreático Panc-1, la IC₅₀ fue de 45,29 µg/ml. Para el extracto etanólico de harina desengrasada de la variedad S0506, las IC₅₀ fueron superiores: 35,36 µg/ml en SF-268, 37,75 µg/ml en SK, 36,11 en A-172, 37,96 en LN-229 y 49,02 en Panc-1. En las restantes muestras, en cambio, los extractos obtenidos de harina desengrasada dieron lugar, en general, a valores inferiores de IC₅₀ que los de harina sin desengrasar.

Estos resultados permitieron concluir que los extractos etanólicos de todas las variedades de *Solanum melongena*, tanto a partir de harina desengrasada como sin desengrasar, además de presentar una gran capacidad antitumoral frente al cáncer de colon, también poseen una elevada actividad antitumoral frente a las líneas celulares de glioblastoma y de adenocarcinoma pancreático.

- Ejemplo 3.- Estudio molecular de proteínas relacionadas con muerte celular

Para dilucidar los mecanismos por los que actúan los extractos de la presente invención, se ha estudiado por Western Blot la vía de muerte celular (apoptosis) mediada por caspasas, principalmente, la caspasa 8 (vía extrínseca), caspasa 9 (vía intrínseca) y caspasa 3, usando como control endógeno β -actina.

Para ello, células de la línea tumoral de colon (T84) fueron cultivadas con una IC_{50} del extracto etanólico obtenido a partir de harina de semilla madura desengrasada de S0506 y una vez pasadas 72 horas, las células fueron recogidas para proceder a la extracción proteica.

Para llevar a cabo el ensayo de Western Blot, 40 μ g de proteína de las células tratadas con el extracto etanólico, así como de las células control (T84 sin tratamiento) fueron cargadas en un gel de poliacrilamida de electroforesis SDS-PAGE en una Mini Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA). Una vez separadas las proteínas por electroforesis, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a la que se le suministró 20 V a temperatura ambiente durante 1 h. Estas membranas fueron tratados con solución de bloqueo (PBS-Tween + 5% leche en polvo) durante 1 hora para posteriormente, tras 2 lavados con PBS-Tween, incubarlos con el anticuerpo primario [IgGs policlonales de conejo anti-caspasa-3 (dilución 1:500), anti-caspasa-8 (dilución 1:1000) y anti-caspasa-9 (Dilución 1:1000); Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA]. Se dejaron en incubación toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados y se incubó durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario peroxidasa conjugada. Finalmente, las proteínas fueron detectadas mediante ECL (enhanced chemiluminescence) (Bonnus, Amersham, Little Chalfont, UK) (Ortíz y col. 2009)

Una vez realizado el Western Blot (ver Figura 5), se analizaron las bandas obtenidas en los geles, mediante un software analítico llamado Quantity One Bio-Rad, confirmándose que el extracto etanólico de la harina de semilla madura desengrasada de *Solanum melongena* produce apoptosis celular mediada por la vía de las caspasas, siendo sobreexpresadas 4, 6,5 y 7,4 veces las Caspasas 9, 3 y 8, respectivamente y en relación al control (Figura 6). Estos datos sugieren que el extracto etanólico induce muerte celular por apoptosis, tanto por vía intrínseca como extrínseca.

Para determinar la activación de otros posibles mecanismos de muerte celular, se llevaron a cabo, mediante inmunofluorescencia, estudios de posibles alteraciones en la polimerización/despolimerización de los microtúbulos celulares. Para ello, cultivos de células T84 fueron expuestos al extracto etanólico (IC₅₀) evaporado a partir de harina desengrasada de S0506. Tras 24 h, las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo anti-tubulina. Como puede observarse en la Figura 7, la presencia de condensaciones alrededor del núcleo celular indica una alteración de la polimerización/despolimerización de los microtúbulos celulares. Algunos agentes quimioterápicos como el Taxol (procedente de la corteza del Tejo) (Yu y col., 2017) y la Vincristina (procedente de la flor de la Vinca) (Wu y col., 2012) actúan bloqueando la polimerización/despolimerización de la tubulina provocando la muerte de las células tumorales. Estos fármacos se usan en diferentes tipos de tumores (leucemias, linfomas, cáncer de pulmón, de próstata...). Sin embargo, para el cáncer de colon no existen, actualmente, quimioterápicos que actúen a este nivel. No obstante, cabe destacar, la similitud existente entre el extracto de la presente invención y la acción de la Vincristina y del Taxol.

Por último, a pesar de que la mayor parte de la muerte celular inducida por el extracto etanólico de harina desengrasada de S0506 se produce por rutas apoptóticas, un cierto porcentaje de la misma aconteció por rutas autofágicas. Cultivos de células T-84 expuestas al extracto etanólico (24 h) fueron teñidas mediante una sonda fluorescente roja (Lysotracker™ Red DND-99, ThermoFisher Scientific) y observadas al microscopio de fluorescencia. La aparición de las clásicas vesículas autofágicas en la línea T84 indicó la activación de este mecanismo (Figura 8).

25 - Ejemplo 4.- Estudio para determinar el efecto sobre la angiogénesis

La angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales es esencial para el crecimiento de los tumores y para su expansión y la producción de metástasis. En el presente estudio se analizó el efecto del extracto etanólico sobre las células tumorales en relación a su comunicación con las células endoteliales y, por tanto, con la formación de neovasos sanguíneos (angiogénesis). Células T84 fueron incubadas con el extracto etanólico a partir de harina desengrasada de S0506 a dosis de IC₂₅ (20 ug/ml) e IC₅₀ (30 ug/ml) durante 24h. Tras el lavado de los pocillos (PBS) y la adición de nuevo DMEM (+10%FBS y 1%Ab) libre de extracto etanólico, el cultivo se mantuvo durante 48 horas con el objeto de obtener un medio condicionado. A continuación, células HUVEC (línea celular endotelial del cordón umbilical) fueron sembradas en placas de 96 pocillos

con matrigel. Estas células se pusieron en contacto con los medios condicionados obtenidos para observar la formación de vasos sanguíneos.

Como puede observarse en la Figura 9, los medios condicionados procedentes de células T84 en contacto con el extracto, inhibieron la formación de vasos sanguíneos por parte de las células HUVEC en relación al control (células HUVEC sin exposición). La cuantificación de la formación de vasos (número de segmentos, uniones, nodos formados y longitud de los segmentos) demostró una reducción significativa en relación al control (Figura 10). Estos resultados sugieren que el extracto etanólico funcional ejerce un efecto sobre las células tumorales, modificando los factores con los que interactúan con las células epiteliales y provocando una disminución en el proceso de angiogénesis. Este resultado es de enorme importancia puesto que implicaría que el extracto etanólico de la invención es capaz de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos que nutren al tumor y por tanto, reducir su crecimiento y su expansión metastásica.

- Ejemplo 5.- Estudios sobre la población de células madre tumorales (CSCs) de cáncer de colon

Los tumores se caracterizan por tener subpoblaciones de células tumorales denominadas células madre tumorales (CSCs,) que poseen como propiedades fundamentales el ser indiferenciadas y pluripotentes, pero que se caracterizan especialmente por tener una gran capacidad tumorigénica y presentar resistencia a los tratamientos (quimioresistencia). Estas CSCs son las responsables, en gran medida, de las recidivas en clínica y de la baja efectividad de los tratamientos con regímenes terapéuticos que se usan actualmente. Gran parte de las líneas de investigación más avanzadas en el campo de la Oncología básica y clínica se basan en el desarrollo de agentes antitumorales que afecten de forma preferente o selectiva a este tipo celular, lo que garantizaría una mejor respuesta del paciente al tratamiento y un mayor beneficio en su pronóstico. Las CSCs son una población muy heterogénea que se identifican por determinados marcadores celulares, como son CD133, CD44, CD24, NANOG, SOX-2 Y OCT-4, entre otros (Munro y col., 2018).

Para determinar la capacidad antitumoral del extracto etanólico de la invención en ciertas subpoblaciones de células madre tumorales, cultivos de células T84 fueron expuestas al extracto etanólico (IC₅₀) de harina desengrasada de S0506 durante 72 h. A partir del ARN total extraído de los cultivos, se llevó a cabo una Real Time PCR para determinar la expresión de los marcadores de CSCs CD24, CD44, CD133, SOX2, OCT4 y NANOG.

Para ello, previamente se extrajo ARN celular con el reactivo Trizol (Invitrogen) y se cuantificó con NanoDrop 2000. 1 µg de ARN fue usado para llevar a cabo el proceso de retrotranscripción y obtener cDNA usando SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) con un cebador de retrotranscripción universal. Real Time PCR fue llevado a cabo empleando SYBR green supermix (iTaQ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los datos de la expresión de los genes fueron normalizados con GADPH. Todos los ensayos cuantitativos de reacción en cadena de RT-polimerasa (RT-PCR) se realizaron en un sistema ABI 7900 (ABI), y se aplicó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para el cálculo de los niveles relativos de expresión.

Como se observa en la Figura 11, los cultivos tratados con el extracto de la harina desengrasada de *Solanum melongena* S0506 mostraron una expresión de los marcadores seleccionados significativamente menor que la obtenida en los controles. Estos resultados sugieren que el extracto no solo tiene una actividad antitumoral, sino que es capaz de reducir la proporción de CSCs en los cultivos. Este resultado puede tener una gran potencialidad clínica, puesto que muchos de los regímenes quimioterápicos actuales no sólo no afectan a CSCs sino que seleccionan esta subpoblación promoviendo la reaparición precoz del tumor y aumentando su agresividad (Yujuan y col., 2018).

Referencias bibliográficas

Akihisa T, Takahashi A, Kikuchi T, Takagi M, Watanabe K, Fukatsu M, et al. The melanogenesis-inhibitory, anti-inflammatory, and chemopreventive effects of limonoids in n-hexane extract of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) seeds. *Journal of oleo Science*. 2011;60(2):53-9.

Amin A, Kucuk O, Khuri F, Shin D. Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(16):2712-2725.

Bonta RK. Dietary Phenolic Acids and Flavonoids as Potential Anti-Cancer Agents: Current State of Art and Future Perspectives. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019 (doi: 10.2174/1871520619666191019112712)

Bregni G, Akin Telli T, Camera S, Deleporte A, Moretti L, Bali AM, Liberale G, Holbrechts S, Hendlisz A, Sciafani F. Adjuvant chemotherapy for rectal cancer: Current evidence and recommendations for clinical practice. *Cancer Treat Rev*. 2020 Feb;83:101948.

Cohen E, Quistad GB, Casida JE. Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide. *Life Sci*. 1996;58(13):1075-1081.

Dewanto V, Wu X, Adom KK and Liu RH, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50:3010–3014 (2002).

Duh PD, Tu YY and Yen GC, Antioxidant activity of the aqueous extract of *harn jyr* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm-Wiss Technol* 32:269–277 (1999).

Fekry MI, Ezzat SM, Salama MM, Alshehri OY, Al-Abd AM. Bioactive glycoalkaloides isolated from *Solanum melongena* fruit peels with potential anticancer properties against hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*. 2019; 11;9(1):1746.

Goyal S, Gupta N, Chatterjee S, Nimesh, S. Natural Plant Extracts as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017; 17(2):96-106.

- Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. J Invest Dermatol. 2017;137(2):e11-e16. doi:10.1016/j.jid.2016.11.020
- 5 Hashimoto K, Kawagishi H, Nakayama T, Shimizu M. Effect of capsianoside, a diterpene glycoside, on tight-junctional permeability. Biochim Biophys Acta. 1997;1323(2):281-290.
- Huang W, Cai Y, Zhang Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary
10 Plants: Potential Use for Cancer Prevention. Nutrition and Cancer. 2013;62(1):1-20.
- Idrees M, Tejani M. Current Treatment Strategies for Elderly Patients with Metastatic Colon Cancer. Cureus. 2019 May 22;11(5):e4713.
- 15 Jayakumar K, Murugan K (2016) Solanum Alkaloids and their Pharmaceutical Roles: A Review. J Anal Pharm Res 3(6): 00075.
- Jing P, Qian B, Zhao S, et al. Effect of glycosylation patterns of Chinese eggplant anthocyanins and other derivatives on antioxidant effectiveness in human colon cell
20 lines. Food Chem. 2015;172:183-189.
- Kapravelou G, Martínez R, Andrade AM, López Chaves C, López-Jurado M, Aranda P, Arrebola F, Cañizares FJ, Galisteo M, Porres JM. Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results
25 of in vitro and in vivo experiments. J Sci Food Agric 95(6):1207-1216 (2015).
- Kintia PK; Shvets SA. Melongosides n o and p steroidal saponins from seeds of Solanum-Melongena. Phytochemistry. 1985; 24(7):1567-1570
- 30 Lee KR, Kozukue N, Han JS, Park JH, Chang EY, Baek EJ, Chang JS, Friedman M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, 52(10):2832-2839.
- 35 Loree J, Kopetz S. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. Therapeutic Advances in Medical Oncology. 2017;9(8):551-564.

- Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology*. 2018;71:110–116.
- 5 Nappi A, Berretta M, Romano C, Tafuto S, Cassata A, Casaretti R, Silvestro L, Divitiis C, Alessandrini L, Fiorica F, Ottaiano A, Nasti G. Metastatic Colorectal Cancer: Role of Target Therapies and Future Perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(5):421-429
- 10 Nishina A, Ebina K, Ukiya M, Fukatsu M, Koketsu M, Ninomiya M, et al,. Dioscin Derived from *Solanum melongena* L. "Usukawamarunasu" Attenuates α -MSH-Induced Melanogenesis in B16 Murine Melanoma Cells via Downregulation of Phospho-CREB and MITF. *Journal of Food Science*. 2015; 80(10):H2354-9.
- 15 Ortiz R, Prados J, Melguizo C, et al. The cytotoxic activity of the phage E protein suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(9):899-911. doi:10.1007/s00109-009-0493-9
- Reglero C, Reglero G. Precision Nutrition and Cancer Relapse Prevention: A Systematic
20 Literature Review. *Nutrients*. 2019 Nov 16;11(11).
- Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación de plantas de importancia médica. Ed. IV. Universidad autónoma de nuevo León, México. 2016; ISBN: 978-84-94673-7-0.
- 25 Shen KH, Hung JH, Chang CW, Weng YT, Wu MJ, Chen PS, et al,. Solasodine inhibits invasion of human lung cancer cell through downregulation of miR-21 and MMPs expression. *Chemico-Biological Interactions*. 2017; 25;268:129-135.
- 30 Thapliyal A, Krishen R, Chandra A. Overview of Cancer and Medicinal Herbs used for Cancer Therapy. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018;12(1).
- Ting H, Qi-Mei L, Xiao-Wei H, Fei H, Ming-Wei Z, Jian-Guo Jiang. Identification of bioactives from *Astragalus chinensis* L.f. and their antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Journal of Food Science and Technology*. 2017; 54(13):4315-4323.
- 35

- Toshiyuki M, Kentarou K, Kiyofumi N, Hisashi M, Masayuki Y. Medicinal Foodstuffs. XXV.1) Hepatoprotective Principle and Structures of Ionone Glucoside, Phenethyl Glycoside, and Flavonol Oligoglycosides from Young Seedpods of Garden Peas, *Pisum sativum* L. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 2001; 49(8):1003-1008.
- Wong F, Chai T, Xiao J. The influences of thermal processing on phytochemicals and possible routes to the discovery of new phytochemical conjugates. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2018;1-6.
- Wu X, Sooman L, Lennartsson J, Bergström S, Bergqvist M, Gullbo J, et al,. Microtubule inhibition causes epidermal growth factor receptor inactivation in oesophageal cancer cells. International Journey of Oncology. 2013; 42(1):297-304.
- Yin X ,Yan L, Juan P, Hong-Liang Y, Yan S, Dong-Ying Z, Hai-Xue K et al,. Melongenaterpenes A– L, Vetispirane-Type Sesquiterpenoids from the Roots of *Solanum melongena*. Journal of Natural Products. 2019; 82:3242-3248.
- Yang BY, Yin X, Liu Y, Sun Y, Guan W, Zhou Y, et al,. Terpenes and lignans from the roots of *Solanum melongena* L. Natural Product Research. 2020; 34(3):359-368.
- Yu R, XUue W, Zhongguan L, Shuaishuai H, Haihui Z. et al,. Induction of cell cycle arrest by increasing GTP-RhoA levels via Taxol-induced microtubule polymerization in renal cell carcinoma. Molecular Medicine Reports. 2017; 15:4273-4279.
- Yujuan Z, Longzheng X, Heran W, Linda O, Min S, Qiang L, et al,. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. Oncotarget. 2018; 9(70):33403-33415.
- Zhao DY, Liu Y, Sun YP, Li XM, Xu ZP, Pan J, et al,. Sesquiterpenoids with diverse carbon skeletons from the sepals of *Solanum melongena* L. Fitoterapia. 2020; 15;142:104517.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de obtención de un extracto vegetal etanólico procedente de harina de semillas maduras de *Solanum melongena*, que comprende las etapas de:
 - 5 a) moler la semilla para obtener harina;
 - b) extraer la harina de la etapa a) mediante una solución de extracción hidroalcohólica en frío y a pH ácido,
 - c) opcionalmente, desengrasar la semilla madura mediante prensado mecánico en frío antes de realizar las etapas a) y b).
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que:
 - a) la semilla se muele hasta obtener harina con un tamaño de partícula de entre 100 μm y 150 μm ; y/o
 - b) la harina obtenida en la etapa a) se extrae con la solución de extracción en las
15 siguientes condiciones de operación:
 - i. temperatura igual a 4 °C,
 - ii. en atmósfera de nitrógeno,
 - iii. la solución de extracción se compone de etanol, agua bidestilada y ácido clorhídrico 12N en proporciones 50 : 50 : 0,2 en volumen,
 - 20 iv. pH igual a 2, y
 - v. la mezcla de la harina y la solución de extracción se mantiene en agitación durante 30 minutos tras haber alcanzado las condiciones i a iv, y donde el extracto se obtiene centrifugando la mezcla de la solución de extracción y la harina y recogiendo el sobrenadante.
- 25 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que se lleva a cabo la etapa c) de desengrasado de la semilla madura, a una temperatura de entre 40 a 50°C y con una velocidad de extracción de 2 a 3 kg de semilla/hora.
- 30 4. El procedimiento según la reivindicación 2 o 3, en el que:
 - i) el precipitado resultante de centrifugar la mezcla de la harina y la solución de extracción se resuspende en solución de extracción,
 - ii) la suspensión obtenida se mantiene de nuevo en agitación durante 30 minutos en las condiciones de la etapa b) definidas en la reivindicación 2,
 - 35 iii) la suspensión se somete a centrifugación, recogándose el sobrenadante, y
 - iv) el extracto etanólico resulta de mezclar el sobrenadante obtenido en iii) con

el primer sobrenadante obtenido.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye una etapa adicional final en la que se evapora parcial o totalmente el etanol del extracto etanólico obtenido.
6. El extracto etanólico obtenible por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. El extracto etanólico según la reivindicación 6, que presenta un contenido fenólico total que oscila entre 11,16 y 27,59 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto.
8. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, donde el contenido fenólico total oscila entre 11,16 y 18,41 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto y/o la capacidad reductora oscila entre 5,33 y 6,31 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto.
9. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el contenido fenólico total oscila entre 12,06 y 27,59 μg equivalentes de ácido gálico/mg extracto.
10. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende al menos salannina y/o capsianósido II.
11. El extracto etanólico según la reivindicación 10, que comprende salannina y capsianósido II y adicionalmente, al menos, myricomplanósido.
12. El extracto etanólico según la reivindicación 10, que comprende salannina y capsianósido II y al menos un compuesto adicional seleccionado del grupo de kaempferol-3-soforotriósido, myricomplanósido y arillatosa B, o combinaciones de los mismos.
13. El extracto etanólico según la reivindicación 12, que comprende salannina y capsianósido II y adicionalmente, al menos, arillatosa B.
14. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende salannina y capsianósido II y adicionalmente, al menos, myricomplanósido y

arillatosa B.

15. El extracto etanólico según la reivindicación 12, que comprende salannina y capsianósido II y adicionalmente, al menos kaempferol 3-soforotriósido y arillatosa B.

5

16. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende salannina, capsianósido II, myricomplanósido, arillatosa B y kaempferol 3-soforotriósido.

10 17. El extracto etanólico según la reivindicación 16, donde el contenido fenólico total oscila entre 11,16 y 18,41 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto y/o la capacidad reductora oscila entre 5,33 y 6,31 µg equivalentes de ácido gálico/mg extracto.

15 18. El extracto etanólico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, que se ha obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

19. El extracto etanólico según la reivindicación 18, en la que se ha llevado a cabo la evaporación final, parcial o total, del etanol según se define en la reivindicación 5.

20 20. El extracto etanólico según la reivindicación 18 o 19, que es un extracto etanólico de semillas maduras desengrasadas en el que se ha llevado a cabo la etapa de desengrasar la semilla madura mediante prensado mecánico en frío antes de realizar la etapa a) de moler la semilla y la etapa b) de extraer la harina obtenida.

25 21. El extracto etanólico según la reivindicación 20, que se ha obtenido por el método de la reivindicación 1 en el que se ha llevado a cabo la etapa de desengrasar la semilla madura mediante prensado mecánico en frío en las condiciones de la reivindicación 3 antes de realizar las etapas a) y b); la etapa a) de moler la semilla y la etapa b) de extraer la harina obtenida se han llevado a cabo según se define en la reivindicación 2, y en el que se ha
30 realizado una segunda extracción del precipitado obtenido tras ejecutar el procedimiento según se define en la reivindicación 2 siguiendo las condiciones definidas en la reivindicación 4.

35 22. Una composición farmacéutica que comprende en su formulación un extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 21.

23. La composición farmacéutica según la reivindicación 22, que es una composición farmacéutica combinada que adicionalmente comprende al menos un agente anticancerígeno adicional a los presentes en el extracto.
- 5 24. La composición farmacéutica según la reivindicación 22 o 23, que adicionalmente comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
25. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, que incluye en su formulación un extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a
10 21.
26. Un extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 21 para su uso en el tratamiento de un tipo de cáncer que se selecciona del grupo de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.
15
27. El extracto para su uso según la reivindicación 26, en el que el tipo de cáncer se selecciona del grupo de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pancreático y glioblastoma multiforme.
- 20 28. El extracto para su uso según la reivindicación 26 o 27, que es un extracto de semillas maduras desengrasadas de la reivindicación 20 o 21.
29. El extracto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, que es un extracto de semillas maduras de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18.
25
30. El extracto para su uso según la reivindicación 29, para uso en el tratamiento del adenocarcinoma de colon.
31. El extracto para uso según la reivindicación 29, para uso en el tratamiento del
30 adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia.
32. El extracto para uso según la reivindicación 29, para uso en el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas.
- 35 33. Una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, para uso en el tratamiento de un tipo de cáncer que se selecciona del grupo de cáncer

colorrectal, cáncer de páncreas y glioblastoma.

34. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 33, en la que el
cáncer se selecciona del grupo de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pancreático
y glioblastoma multiforme.

35. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 33 o 34, que es
una composición de la reivindicación 25.

36. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las
reivindicaciones 34 o 35, en el que el cáncer es adenocarcinoma de colon.

37. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 36, en la que el
cáncer es adenocarcinoma de colon resistente a quimioterapia.

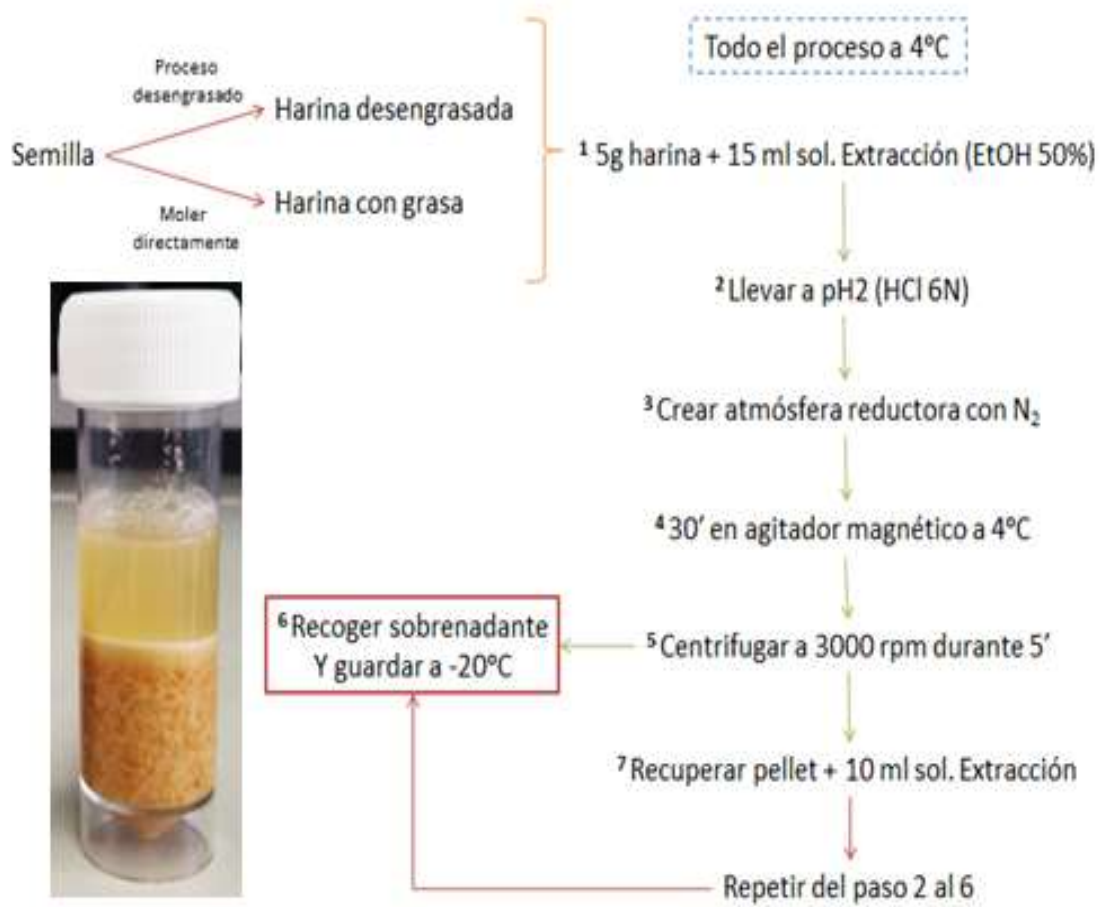


FIGURA 1

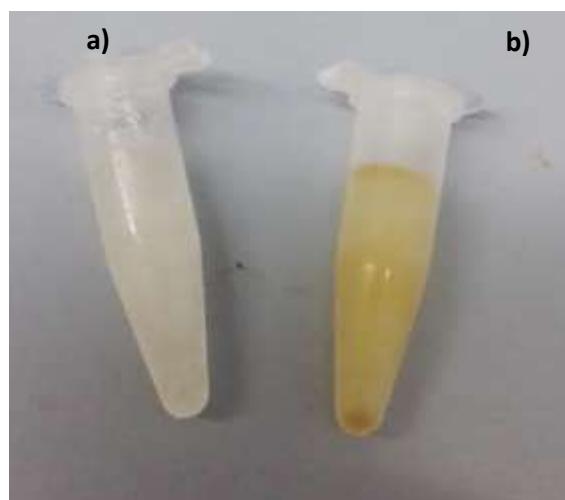
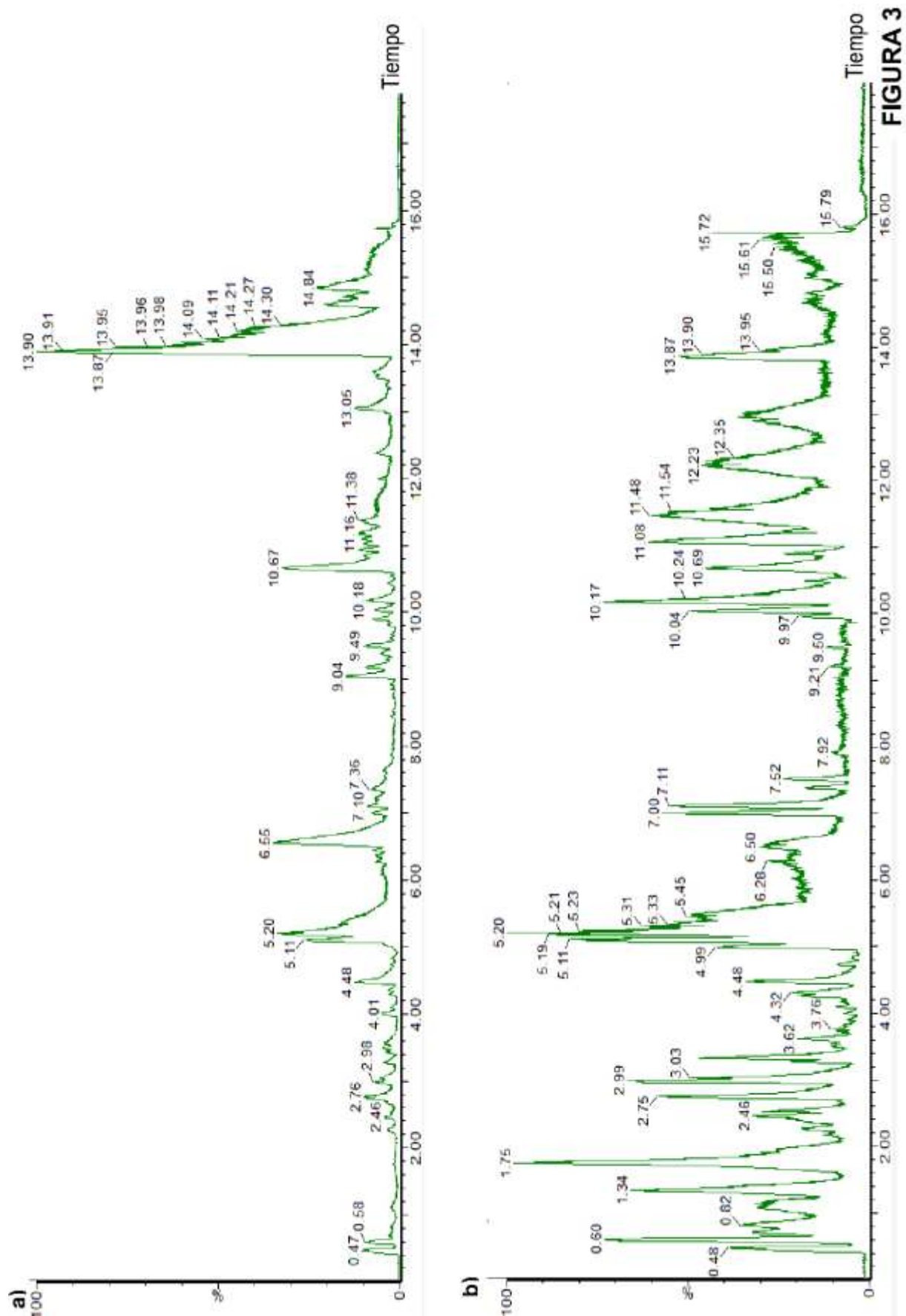


FIGURA 2



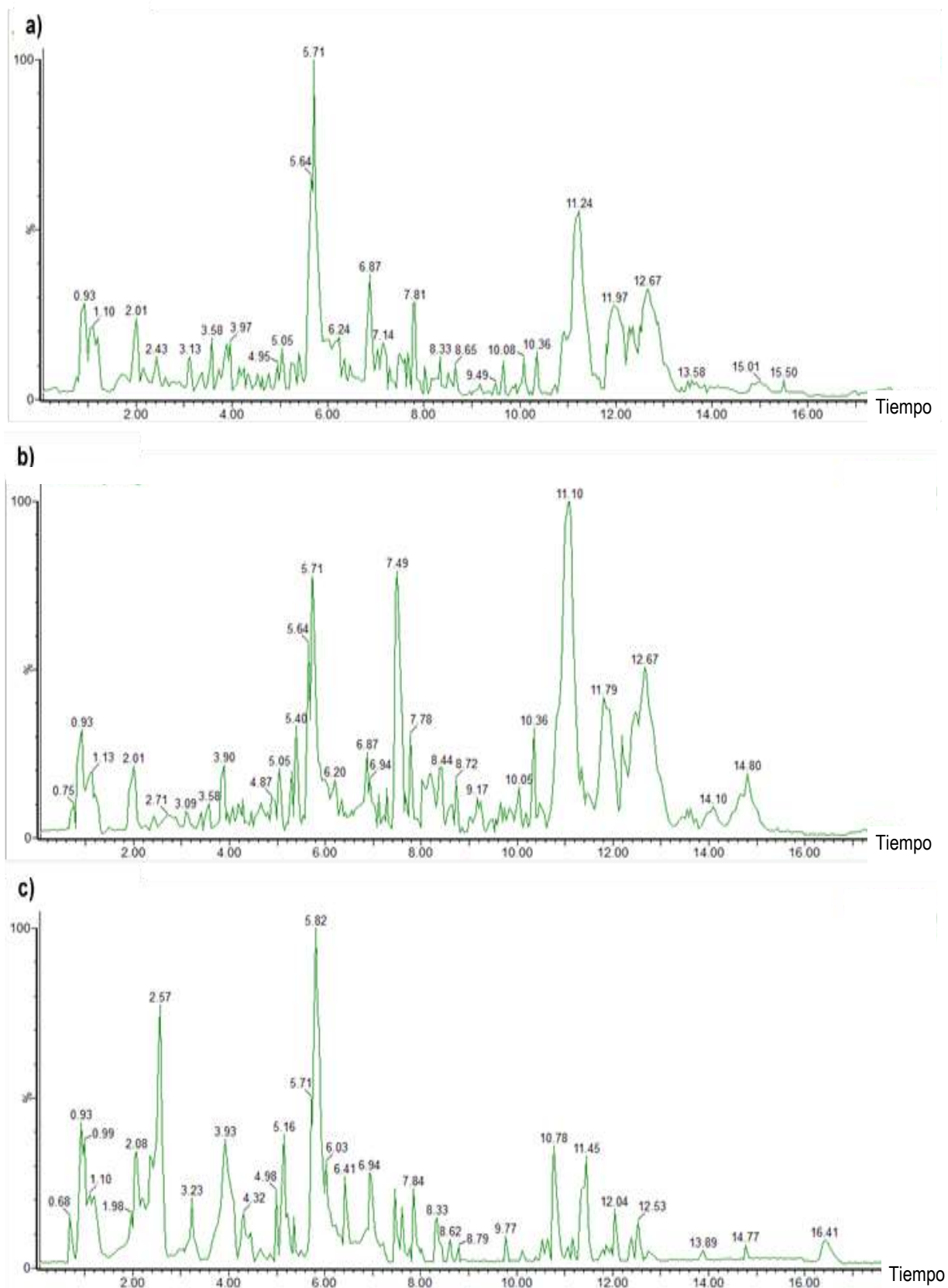


FIGURA 4

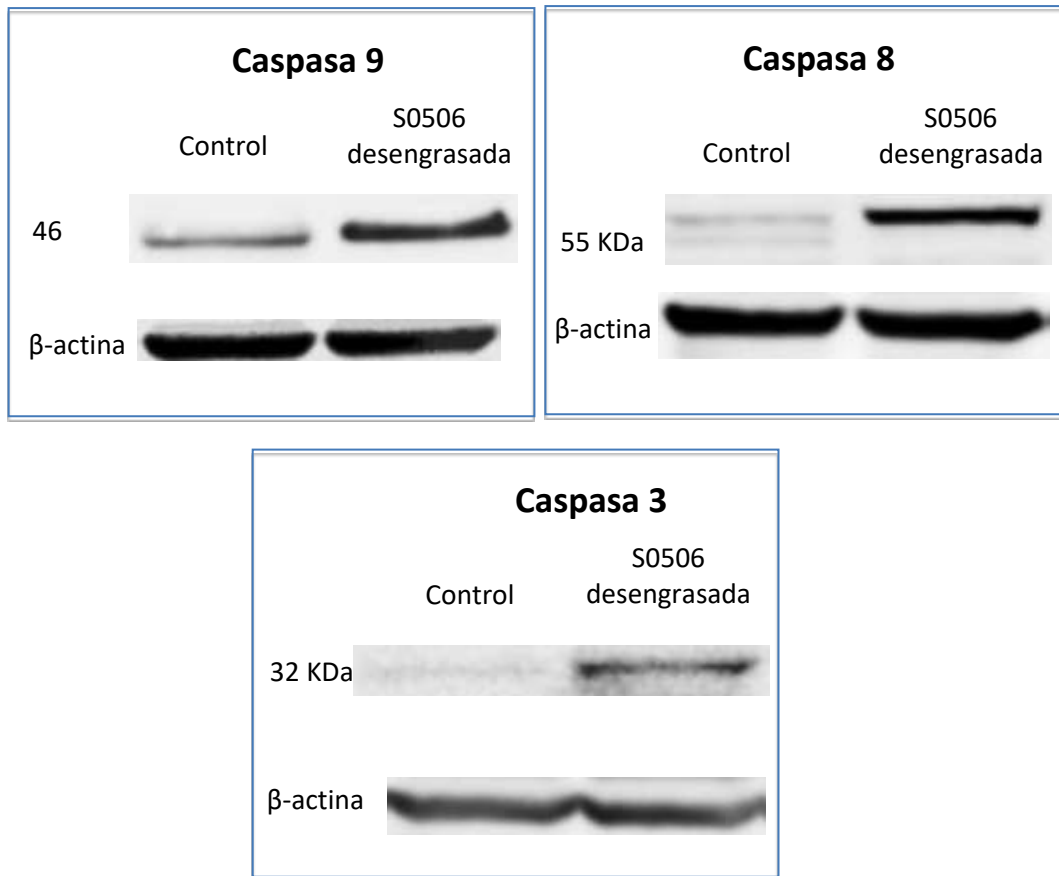


FIGURA 5

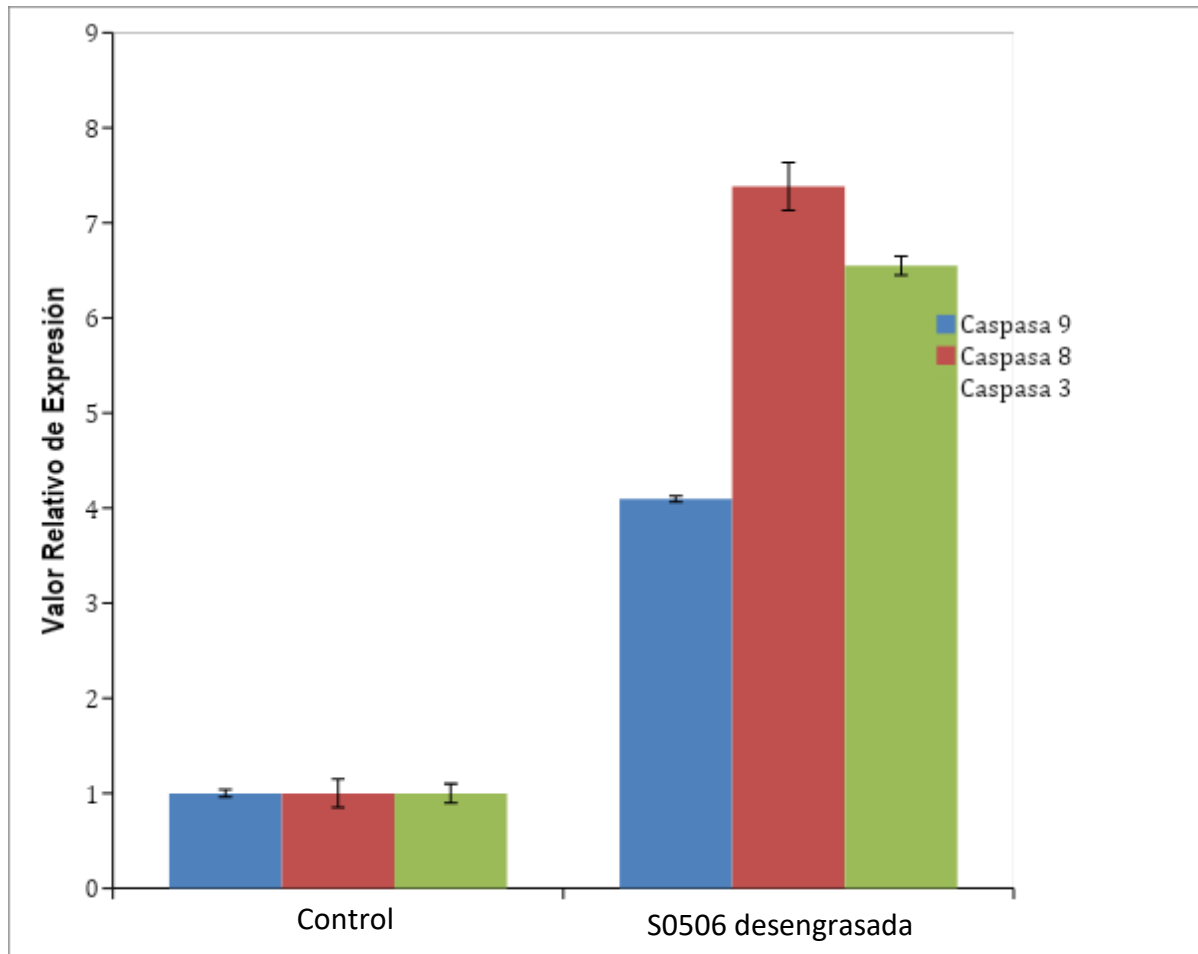
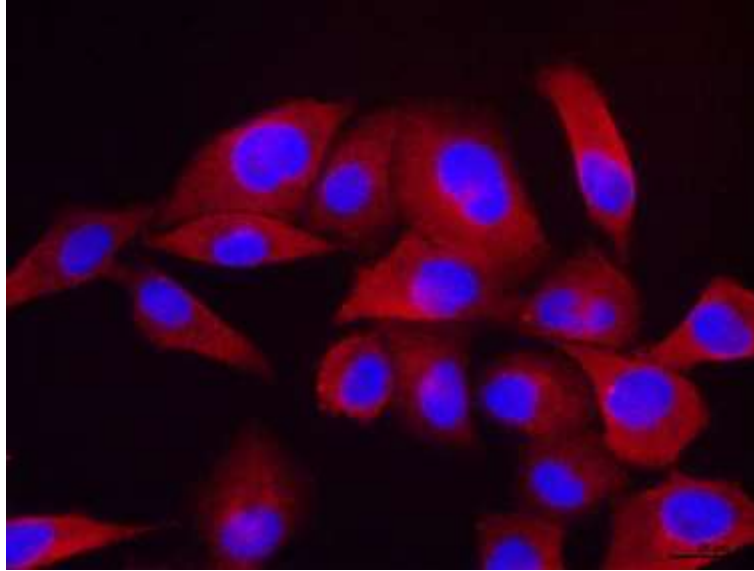


FIGURA 6

CONTROL



S0506 desengrasada

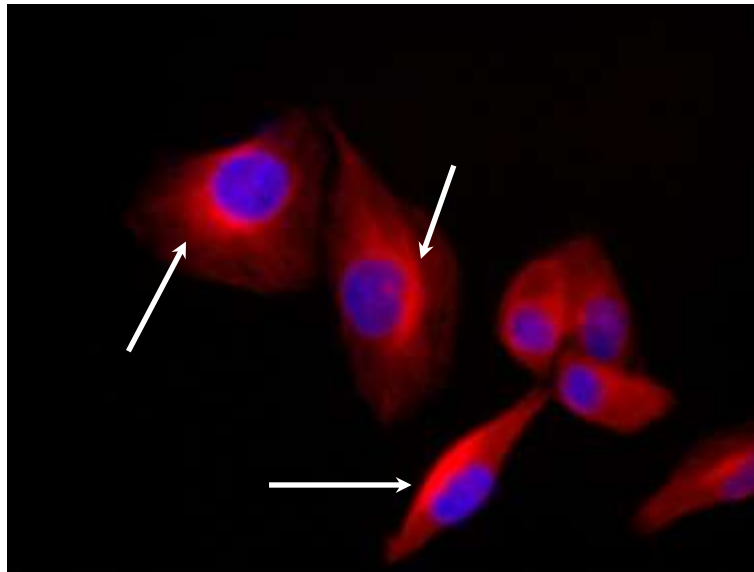


FIGURA 7

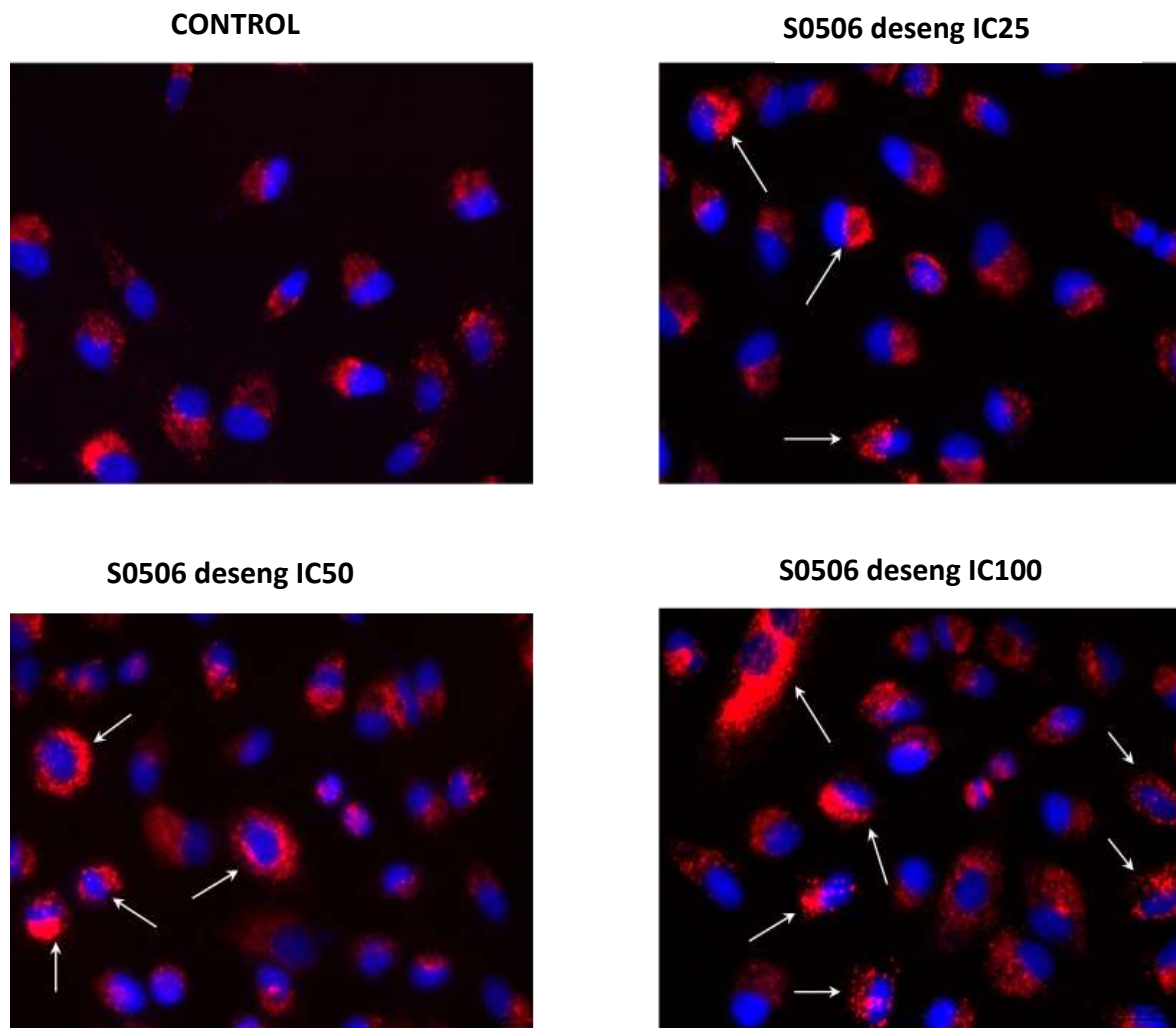


FIGURA 8

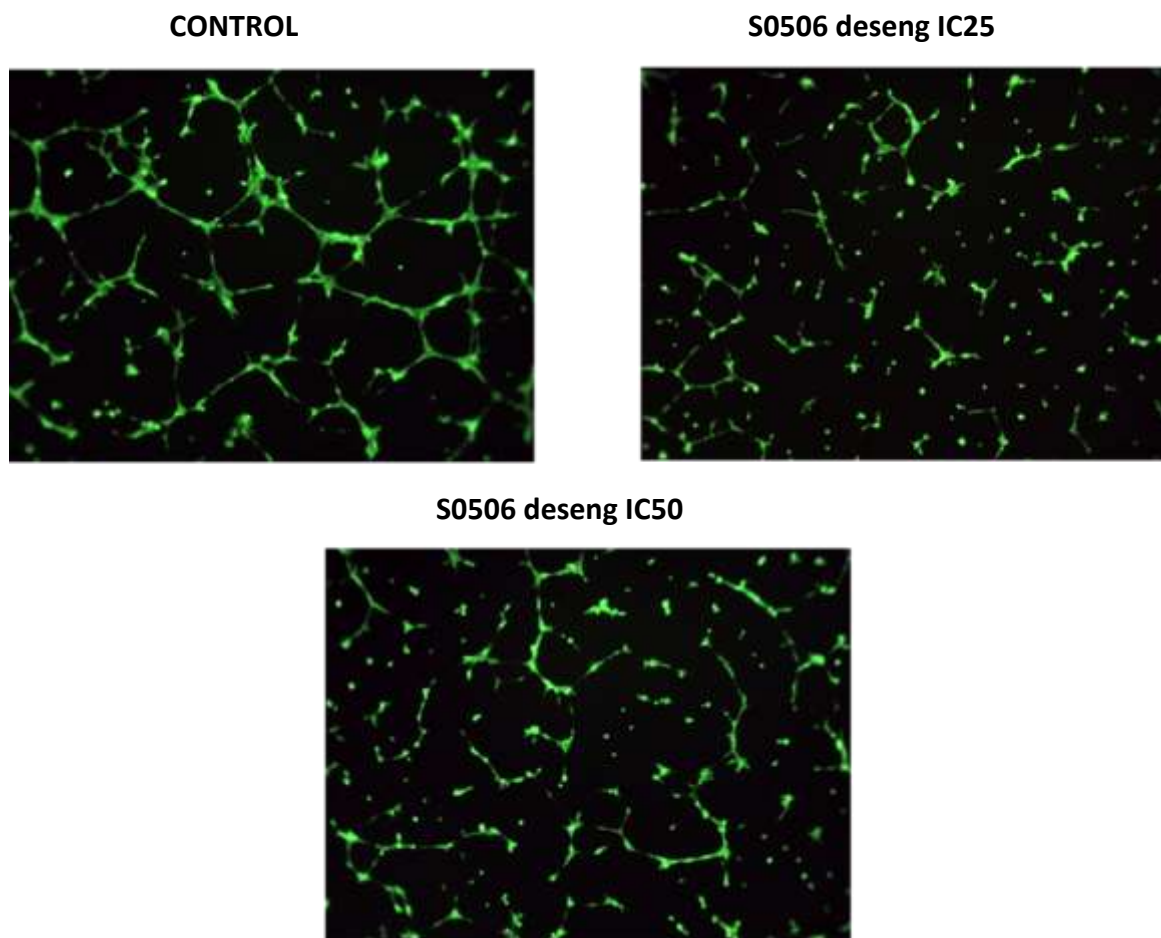


FIGURA 9

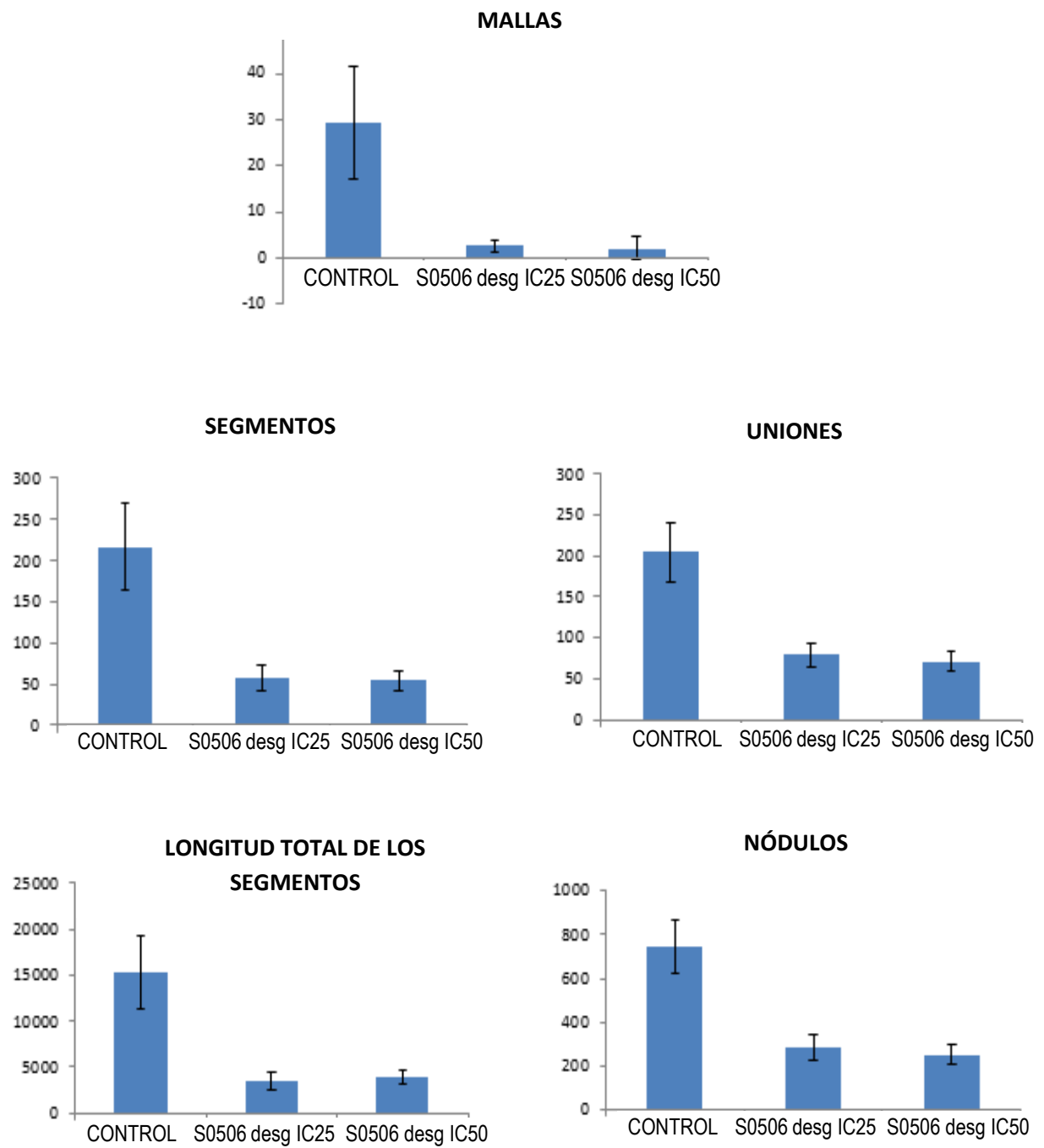


FIGURA 10

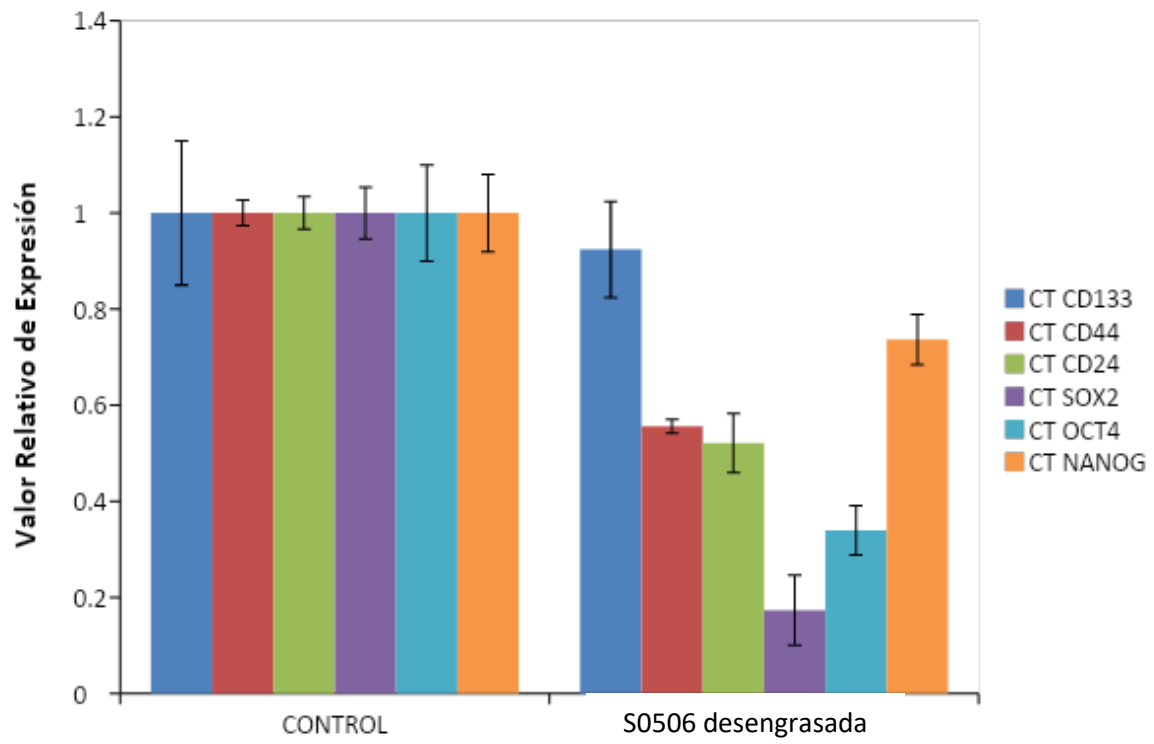


FIGURA 11