

67

Tej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE UN PERACETILTAXANO Y OTROS CONSTITUYENTES DEL TEJO MEXICANO *Taxus globosa* SCHLEDL ( TAXACEAE )



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BI O L O G A P R E S E N T A :

BERNICE



GUERRERO

RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA ESCOLAR

1997

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"Aislamiento y Elucidación Estructural de un Peracetil Taxano y Otros Metabolitos  
Secundarios Presentes en la Corteza del Tejo Mexicano Taxus globosa Schlecht  
realizado por (Taxaceae)

Bernice Guerrero Rodríguez  
con número de cuenta 8732822-0, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Guillermo Delgado Lamas.

Propietario

M. en C. Ma. Isabel Aguilar Laurents.

Propietario

Dra. Ma Cristina Pérez-Amador Barrón.

Suplente

Dr. Héctor Barrios López.

Suplente

Biol. Josefina Herrera Santoyo.

Consejo Departamental de Biología

COORDINACIÓN GENERAL  
DE BIOLOGÍA

Esta tesis se llevó a cabo con apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la UNAM, a través del proyecto IN212195 FQ, con la supervisión del Doctor Guillermo Delgado Lamas.

A Dios, porque el creer en el me permite ser cada día mejor.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por su confianza, por el gran esfuerzo que sé, han hecho para que pudiera yo, llegar hasta aquí, y porque "...siempre estaremos en deuda con ellos..." como dijo Hugo Garrido.

A mis hermanos: a Allin por su apoyo y comprensión, por estar siempre conmigo, porque tengo la fortuna de que seas mi amiga; a Abner por su cariño y confianza, a Abdiel por haber compartido conmigo los primeros años de la educación, por cuidarme y preocuparse por mí, a Alfredo Eliezer porque como hermano mayor siempre representaste un ejemplo de superación.

Al Doctor Guillermo Delgado y a la M. en C. Isabel Aguilar Laurents por su apoyo y paciencia en la realización de esta tesis ( y en la Corrección!!)

A la familia Alfaro, a la familia Contreras por su apoyo y amistad.

A cada uno de mis amigos, me siento afortunada por tenerlos, Angélica gracias por tu apoyo me siento orgullosa de poder contar contigo. Bety... eres un regalo, Fabiola tu también!!! Rocío eres un ejemplo de constancia.... amiga Maricarmen!! Quisiera escribir un párrafo especial para cada uno de ustedes, pero por cuestiones de tiempo me es imposible, pero recuerden que les quiero...., Juan José, Francisco, Pamela, Karen, Ruth Sarai, Guillermo, Javier.

Maricruz, Pilar, Minarda, Hugo gracias por compartir con paciencia, su experiencia conmigo.

A mis compañeros de laboratorio, Yolanda, Verónica, Marcela, Carmen, Liliana, Socorro, Fabiola, Alicia, Basilisa, Gustavo, Anibal, Gladis, Leonila, Raquel, Vanessa, Alejandra, Ricardo, Elisa, Claudia, Patricia, Erika y Alberto

A mis profesores de la Facultad de Ciencias: Aída Castillo y todos los demás.

Me es muy complicado recordar todos los nombres y me disculpo de antemano si omito a alguno, finalmente deseo agradecer a todos aquellos que en algún momento de mi vida han sido ejemplo de superación y amistad.

# CONTENIDO

<b>I. Introducción</b>	1
<b>II. Objetivo</b>	3
<b>III. Antecedentes</b>	
Clasificación taxonómica	4
Distribución Geográfica del género <i>Taxus</i>	6
Descripción botánica de <i>Taxus globosa</i>	7
Estudio de las taxaceas	8
Taxol	11
Taxanos	16
<b>IV. Metodología</b>	23
<b>V. Material</b>	30
<b>VI. Discusión de Resultados</b>	32
<b>VII. Conclusiones y Corolario</b>	49
<b>VIII. Espectros</b>	52
<b>IX. Bibliografía</b>	69

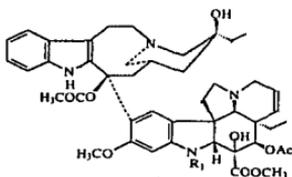
## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un reconocido problema de salud pública a nivel mundial debido a sus altos niveles de incidencia, índice de mortalidad y notable impacto económico y social (Registro Nacional del Cáncer 1991). Mundialmente se encuentra entre las cinco principales causas de mortalidad, sólo precedida por las enfermedades cardiovasculares. En México, según las estadísticas, el cáncer es responsable de aproximadamente 11% de la mortalidad (Fernández 1983). Para combatir este importante problema de salud pública, la ciencia dispone de tres herramientas: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, las cuales frecuentemente se prescriben combinadas.

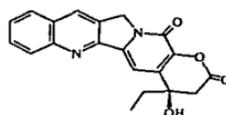
Durante las últimas décadas se ha desarrollado a nivel mundial una intensa investigación tendiente a la búsqueda de agentes anticancerígenos de diverso origen, tanto sintético, como natural. Las sustancias presentes en la naturaleza han constituido tradicionalmente una importante fuente de fármacos, ya que un 25% de los fármacos prescritos provienen de sustancias obtenidas a partir de plantas superiores (Hikino, Wagner y Farnsworth 1989). En particular la búsqueda de agentes antineoplásicos a partir de fuentes naturales ha proporcionado resultados relevantes, ya que numerosos agentes anticancerígenos de origen natural están actualmente en uso (Boyd 1992). Afortunadamente, la quimioterapia favorece la prolongación y aumento de la calidad de vida, e incluso la cura de un 50 a 75% de pacientes que padecen ciertos tipos de cáncer (Boyd 1992).

Actualmente existen cinco productos naturales de origen vegetal que son utilizados como prototipos farmacéuticos anticancerígenos con aplicación clínica, que son los siguientes: los alcaloides vinblastina (1a) y vincristina (1b), aislados a partir de *Catharantus roseus* (Apocinaceae), empleados en el tratamiento de leucemias. Un lignano: la podofilotoxina (2), obtenida a partir de *Podophylum peltatum* y *P. emodii* (Podophyllaceae), empleada en el tratamiento de cáncer pulmonar, testicular, leucemias y linfomas. Otro alcaloide: la camptotecina (3), extraído de *Camptoteca acuminata* (Nyssaceae). Un diterpenoide: el taxol (4), aislado principalmente de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) empleado en tratamientos de cáncer de pulmón, ovario y mama (Cragg 1994).  
Figura 1.

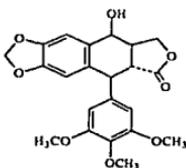
Debido al origen y naturaleza tan diversa del cáncer, y a la acción tan específica de los fármacos, se hace necesaria una constante búsqueda de nuevos agentes. En éste campo, las investigaciones quimiotaxonómicas representan una alternativa muy fructífera, que conduce a plantear el estudio químico-biológico de las plantas presentes en nuestro país relacionadas filogenéticamente con aquellas que han proporcionado los prototipos farmacéuticos. En particular, en el presente trabajo se abordarán las taxáceas, para generar conocimiento acerca de éste grupo de vegetales, específicamente sobre sus constituyentes químicos, en la búsqueda de análogos del taxol (4).



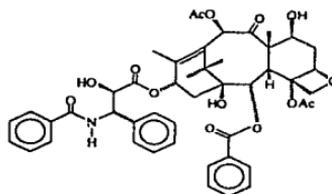
(1a) Vinblastina:  $R_1=CHO$   
 (1b) Vincristina:  $R_1=CH_3$   
*Catharantus roseus*



(3) Camptotecina  
*Camptoteca acuminata*



(2) Podofilotoxina  
*Podophyllum peltatum*,  
*P. Emodii*



(4) Taxol  
*Taxus brevifolia*

Figura 1.- Prototipos farmacéuticos anticancerígenos de origen vegetal con aplicación clínica (Cragg 1994).

## II. OBJETIVO

El presente trabajo se enmarca en una área de investigación multidisciplinaria que tiene como objetivo general la generación de conocimiento en el área químico-biológica referente a las plantas de México, la cual se cultiva desde hace varias décadas (Delgado 1994, Delgado 1996, Mata y Delgado 1991). En este proyecto se estudiará la especie *Taxus globosa*, debido a que representantes de este género, como *T. brevifolia* y *T. baccata* han proporcionado prototipos farmacéuticos anticancerígenos que han tenido notable éxito en su aplicación clínica (Cragg 1994).

De acuerdo con lo anterior, este trabajo de investigación plantea los siguientes objetivos particulares:

- Recopilación y análisis de información botánica existente referente a *Taxus globosa* que nos permita la identificación de las características morfológicas, hábitat y ubicación de las principales poblaciones de esta especie.
- Recopilación de la información referente a los constituyentes químicos de algunas especies de *Taxus* que se han analizado en el mundo.
- Ubicación y colección del material vegetal.
- Extracción, aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en este material, con énfasis en los metabolitos secundarios análogos al taxol.
- Elucidación estructural de los compuestos aislados, mediante la recopilación y análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos.

### **III. ANTECEDENTES**

La clasificación taxonómica de la especie vegetal en estudio es la siguiente:

Reino: Plantae  
División: Pinophyta  
Clase: Coniferopsida  
Orden: Taxales  
Familia: Taxaceae

La familia Taxaceae comprende los géneros *Taxus* y *Torreya*. Dentro del género *Taxus* se incluyen 12 especies (Rushforth, 1987):

<i>Taxus baccata</i> (Linnaeus)	<i>Taxus canadensis</i> (Marshall)
<i>Taxus marieii</i> (Lemée & Leveille)	<i>Taxus floridana</i> (Nuttall & Chapman)
<i>Taxus cuspidata</i> (Sebold & Zuccarini)	<i>Taxus brevifolia</i> (Nuttall)
<i>Taxus wallichiana</i> (Zuccarini)	<i>Taxus globosa</i> (Schlechtendal)
<i>Taxus chinensis</i> (Pilger)	<i>Taxus x media</i> (Rehder)
<i>Taxus yunnanensis</i> (Cheng & L.K. Fu)	<i>Taxus x hunnewelliana</i> (Rehder)

El empleo de las especies de éste género por el hombre, ha sido muy amplio desde la antigüedad, aunque la información disponible es fragmentaria. G. Appendino (Appendino 1993) ha realizado una descripción muy completa

sobre los usos de *Taxus*, principalmente en Europa. De ésta descripción se mencionarán a continuación algunos usos a través de la historia.

*Taxus* ha sido llamado el árbol de la muerte, y en la antigüedad era muy conocida su naturaleza tóxica, la cual es mencionada en la literatura griega y latina. Julio César (100-44 a.C.) lo menciona en el sexto libro *Commentarii de bello gallico*, sobre las guerras gálicas, donde el jefe de una tribu Celta prefirió suicidarse con un veneno preparado de *Taxus* antes de rendirse a los romanos.

El sabio romano Plinio el viejo (23-79 d.C.) asocia la etimología de *Taxus* con τοξον (toxon: veneno). De acuerdo con el naturista griego Discórides (40-90 d.C.), ésta planta emitía humos venenosos, y comer o dormir bajo ella podía provocar la muerte. Esta creencia debe estar relacionada con la elevada producción de polen, ya que por su abundancia que llega a formar una nube amarilla. En la literatura se encuentran repetidas menciones del *Taxus* con fines tóxicos, a éste respecto es mencionado por Virgilio, Shakespeare y Agatha Christie.

En la tradición Celta éste era un árbol sagrado, muchos objetos religiosos eran elaborados a partir de la madera de *Taxus*. De su madera se elaboraban arcos y flechas, ya que se pensaba que el veneno estaría en éste material. La madera de éste árbol es muy fuerte, y resistente a la infestación de insectos. También se ha utilizado para elaborar instrumentos musicales y objetos artísticos (Appendino 1993).

Existen numerosos hallazgos de lanzas prehistóricas de *Taxus*, las cuales datan de cerca de 50,000 años, y en diversos hallazgos arqueológicos se han encontrado objetos elaborados a partir del tejo.

Sin embargo, los usos medicinales de éste vegetal han sido comparativamente restringidos, probablemente debido a la alta toxicidad que presenta. El emperador romano Claudio (10 a. C. - 54 d.C.) recomendó en el senado romano un antídoto de *Taxus* para mordeduras de víboras. En el siglo

XVIII era considerado como antimalárico y antirreumático; también hay indicios de haber sido recomendado como tónico cardíaco. En el siglo XIX fue utilizado como antiasmático, antiinflamatorio, contraestimulante, contra neumonías, depresivo del sistema nervioso central. Además se conoce que una coccción de las hojas de éste árbol podía servir como abortivo (Appendino 1993).

No existe información escrita disponible sobre usos medicinales de *Taxus* en América. En nuestro país *Taxus globosa* se emplea como maderable, ornamental y curtiente. (Zamudio 1992).

### Distribución Geográfica del género *Taxus*

La distribución del género *Taxus* se restringe al hemisferio norte y Nueva Caledonia. En México sólo se registra la existencia de una especie: *Taxus globosa*. En la tabla 1 (página 10) se enlistan las especies del género *Taxus*, su distribución y algunas sinonimias (Rushforth 1987, Hils 1993).

Las relaciones de la flora de las zonas montañosas mexicanas con las del este de Norteamérica son las que más han llamado la atención de los botánicos, tal hecho obedece principalmente a la naturaleza discontinua de la distribución geográfica de los elementos que establecen ésta afinidad, por lo general son especies ampliamente extendidas a través del bosque caducifolio del oriente de Estados Unidos que aparecen esporádicamente en sitios más húmedos de las cadenas montañosas de México. Estas especies son frecuentes, aunque no exclusivas de la Sierra Madre Oriental y de la Sierra de Chiapas, muchas llegan también a Guatemala; en su gran mayoría son componentes del bosque mesófilo de montaña. Rzedowsky menciona a *Taxus globosa* como uno de los taxa que posee en el este norteamericano un vicariante estrechamente emparentado: *Taxus floridana* (Rzedowsky 1978).

## Descripción botánica de *Taxus globosa*

*Taxus globosa* Schledl. Linnaea 12:496 1838. *T. baccata* ssp. *globosa* (Schlecht) Pilger, Pflanzenreich 18 (V, 5) 114. 1903

Se trata de un árbol bajo o arbusto, perennifolio, de 6 a 12 m de alto; tronco erecto, de 30 a 50 cm de diámetro, muy ramificado, las ramas son al principio algo ascendentes, pero después descienden y las ramillas son colgantes, formando una copa redondeada o extendida, corteza escamosa, de color café claro, se desprende en fragmentos cuadrados o rectangulares de unos 3 a 4 cm por lado. La corteza de las ramas es más o menos lisa, de color café claro, las ramillas son también cafés y conservan las bases en donde se insertaban las hojas que han caído, los renuevos son de color verde claro; las hojas jóvenes, distribuidas en espiral, más tarde se disponen en forma dística o subdística por la torsión del peciolo, aplanadas, lineares a linear lanceolada, ligeramente falcadas, de 1.59 a 3.5 cm de largo, por 2 a 2.5 mm de ancho, ápice agudo, acuminado, base angostada en un peciolo corto, márgenes ligeramente involutos, una sola vena media engrosada, hojas verde oscuras en el haz y más claras en el envés; estróbilos masculinos axilares ubicados en la parte inferior de las ramillas, solitarios o rara vez agrupados en espigas apretadas de 2 a 4, formados por 9 a 14 microsporangios con filamentos cortos, escama de la antera peltada, con 3 a 8 sacos polínicos péndulos, estróbilos femeninos solitarios en las axilas de las hojas, dispuestos en la parte posterior de las ramas, rodeados por varias brácteas membranosas, verdes con el margen escarioso; semillas ovoides, de 6 a 7 mm de largo por 4 mm de ancho, cubiertas parcialmente por un arilo rojo carnoso, maduran el primer año. Crece en el fondo de cañadas húmedas con bosque mesófilo de montaña, bosque de *Pinus patula*, bosque de *Abies religiosa*. Alt. 1000-2850 m y bosque mediano subperennifolio con *Quercus* y/o *Pinus* que ocupa las laderas entre 1500 y 2800m de altitud. Florece de diciembre a febrero, y las semillas maduras se encuentran de septiembre a noviembre. Se distribuye a lo largo de la Sierra Madre Oriental y la Sierra de Juárez de Oaxaca.

Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Centroamérica (Zamudio 1992).

En el mapa de la figura 2 se muestra la distribución aproximada de la ubicación de las principales poblaciones de acuerdo a las colectas registradas en el Herbario Nacional (Jardín botánico, Instituto de Biología de la UNAM) ésta información ha sido complementada con datos obtenidos de la literatura. (Zamudio 1992).

En algunos estados de la república se emplea éste árbol como maderable, ornamental, curliente y para elaborar carbón, como se mencionó anteriormente (Zamudio, 1992).

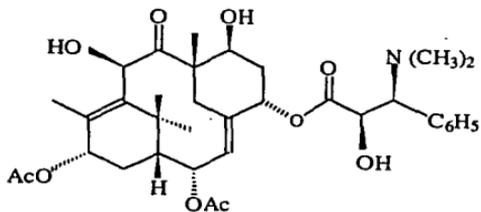
A pesar de que algunos autores han ubicado a *T. globosa* como una subespecie de *T. baccata*, en la actualidad se considera a las especies americanas como entidades independientes de la europea *T. baccata*; *T. globosa* se distingue por sus hojas más largas y delgadas, agudas, claramente falcadas y por la semilla ovoide más gruesa. Las diferencias en hábitat y el aislamiento geográfico refuerzan su separación (Zamudio 1992).

Los nombres comunes registrados para *Taxus globosa* en nuestro país son: romerillo, palmira y tlatscal (Zamudio 1992).

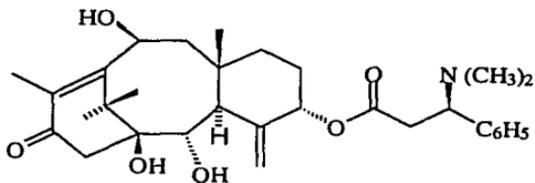
### **Importancia del estudio de las Taxáceas**

El estudio fitoquímico de las taxáceas se inició por la conocida toxicidad de *Taxus baccata*. Las hojas del tejo son tóxicas para todos los animales, la dosis letal es de 0.5 g/Kg en animales monogástricos y 5g/Kg en rumiantes. Existen registros muy antiguos de éste género donde es considerado como "el árbol de la muerte", como se mencionó previamente (Appendino 1993). Esta toxicidad es debida a una mezcla de alcaloides, conocidos genéricamente como taxinas.

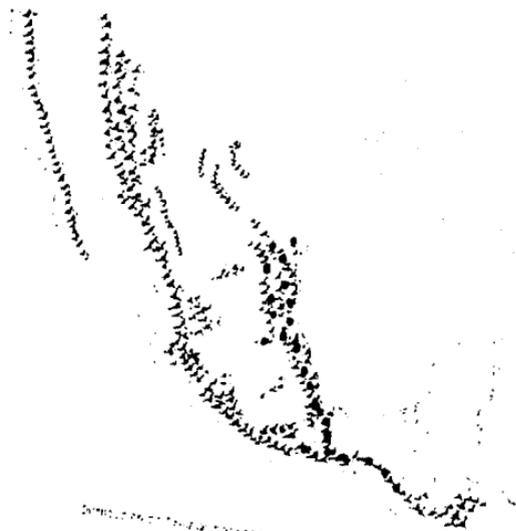
Hasta el momento sólo se conoce la estructura de la taxina A (5) que constituye 30% de la mezcla y la taxina B (6) que representa aproximadamente 2%. Las taxinas Interfieren en el sistema cardiaco de conducción causando bradicardia y arresto del corazón en diástole. El mecanismo de acción aún no es bien conocido, pero se sabe que las taxinas alteran el intercambio de iones en los canales de calcio, actuando en un sitio de recepción específico (Appendino 1993).



**Taxina A (5)**



**Taxina B (6)**



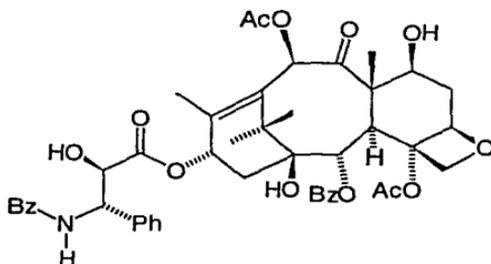
DEPARTMENT OF THE ARMY  
WASHINGTON, D. C. 20315

Espece	Distribución	Sinonimias
<i>Taxus baccata</i>	Inglaterra, Irán, Europa, África	spp. Cultivadas: Adpresa, Amerfoort, Dovastoniana, Fructo- tuteo, Nana, Repandens, Semperaures, Washingtonii
<i>Taxus brevifolia</i>	Alaska, Norteamérica	<i>T. baccata</i> var <i>brevifolia</i>
<i>Taxus cuspidata</i>	Japón, China	<i>T. cuspidata</i> var <i>nana</i>
<i>Taxus yunnanensis</i>	Yunan, Tibet, Sichuan, India	
<i>Taxus chinensis</i>	China	<i>T. walllichiana</i> var <i>chinensis</i>
<i>Taxus globosa</i>	México	<i>T. brevifolia</i> var <i>globosa</i>
<i>Taxus canadensis</i>	Canada	
<i>Taxus walllichiana</i>	China, Filipinas	
<i>Taxus floridana</i>	Florida	<i>T. brevifolia</i> var <i>floridana</i>
<i>Taxus mairei</i>	Indonesia	<i>T. celebica</i> , <i>T. speciosa</i> , <i>T. sumatrensis</i>
<i>Taxus x media</i>	-----	( <i>T. baccata</i> x <i>T. cuspidata</i> )
<i>Taxus x hunnewelliana</i>	-----	( <i>T. canadensis</i> x <i>T. cuspidata</i> )

Tabla 1.- Distribución geográfica del genero *Taxus* (Rushforth, 1987).

## Taxol

A partir de los años sesenta, en un estudio realizado por el Cáncer Chemotherapy National Service Center del Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos, como parte de un programa de investigación de plantas como posibles fuentes de agentes terapéuticos, en el cual se realizó un rastreo aleatorio de aproximadamente 35,000 especies (1960-1982), se comprobó que un extracto de *Taxus brevifolia* tenía actividad citotóxica en cultivos de células leucémicas. En 1969 se aisló por primera vez el Paclitaxel 4 o Taxol® (Nicolaou 1994) un diterpeno pseudoaicaicoide como el constituyente activo, pero fue hasta 1971 que se informó sobre la estructura molecular de ésta sustancia (Wani 1971).



### Taxol (4)

El hallazgo de esta sustancia fue prácticamente desapercibido por la comunidad científica por varios motivos, entre los cuales Wall menciona: el bajo rendimiento obtenido de la sustancia, la escasez de la fuente natural, la actividad biológica modesta que presentó el taxol (4) en los bioensayos empleados por esos años (ensayo en leucemia L1210 de ratón), y la imposibilidad de realizar estudios adicionales por limitaciones financieras (Wall and Wani 1994).

Sin embargo años más tarde se descubrió el mecanismo de acción antitumoral único del taxol, lo cual propició una mayor investigación sobre esta sustancia.

### **Mecanismo de acción del taxol**

En 1979, Horwitz (Horwitz 1979), en el Colegio de Medicina Albert Einstein, Bronx, N. Y., encontró que el mecanismo de acción de ésta sustancia era diferente a los hasta entonces conocidos, y representaba un mecanismo único, que involucra a los microtúbulos (Nicolaou 1994).

Los microtúbulos son estructuras celulares peptídicas que están involucradas en la formación del citoesqueleto responsable de la forma celular y posición de organelos. Las propiedades de los microtúbulos son utilizadas para la transmisión de señales celulares, reorganización de organelos, movimiento celular, y son indispensables para la división celular.

Los microtúbulos están compuestos por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina. Estos dímeros de tubulina se unen a dos moléculas de trifosfato de guanosina (TFG); una molécula de TFG se une temporalmente a un sitio de la subunidad  $\beta$ , denominado sitio E, mientras que la otra molécula se une en la subunidad  $\alpha$  en el sitio N, el resto del microtúbulo se forma por proteínas asociadas a microtúbulos (PAMs).

La polimerización de los microtúbulos se inicia con la formación de un heterodímero formado por la unión de una molécula de  $\alpha$  tubulina y una molécula de  $\beta$  tubulina, en presencia de iones magnesio y TFG. Estos heterodímeros se ensamblan para dar un centro de nucleación, y posteriormente protofilamentos, que a su vez se asociarán para formar un microtúbulo con crecimiento a la izquierda y en triple hélice.

Después de cierto periodo de crecimiento, la concentración microtúbulos-tubulina libre alcanza una concentración que corresponde al equilibrio; en éste punto el desensamblamiento y el crecimiento se encuentran balanceados. Si la concentración de tubulina es menor que el valor requerido para el equilibrio, la asociación espontánea no ocurre, y se lleva a cabo un rápido rearrreglo para alcanzar el equilibrio.

EL taxol (4) afecta precisamente el equilibrio microtúbulos-tubulina, disminuyendo la concentración crítica de la tubulina y el tiempo de inducción para la polimerización en ausencia o presencia de TFG, PAMs y magnesio. Los microtúbulos formados por la inducción de taxol, presentan un pequeño alargamiento típico, y resistencia a la refrigeración y al calcio iónico, los cuales, en condiciones normales, despolarizan a los microtúbulos. Un microtúbulo normal esta compuesto por 13 protofilamentos y tiene un diámetro aproximado de 24 nm. La inducción del taxol (4) produce túbulos con un diámetro inferior de 22 nm y compuestos por 12 protofilamentos (Nicolaou 1994).

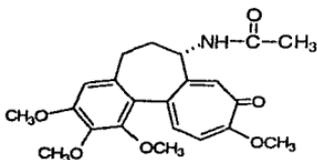
Dentro del ciclo celular, el taxol interfiere en aquellos eventos que involucran la actividad de microtúbulos, las células se detienen en la transición de interfase y mitosis (G<sub>2</sub> y profase), las células presentan asociaciones de microtúbulos anormales "estrellas", la tubulina se presenta como una estructura estable y la ausencia de tubulina libre inhibe la formación del huso mitótico.

Como el proceso de carcinogénesis se caracteriza por una proliferación no regulada de las células, el taxol, al inhibir la división celular, inhibe la actividad tumoral, en las células de tejidos normales se presenta la misma actividad, pero en menor magnitud ya que la frecuencia en la división celular es menor.

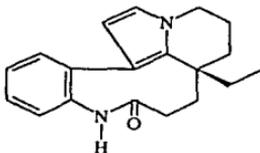
Se han determinado los sitios de la molécula de taxol que son importantes en su actividad (grupos farmacofóricos). Se conoce que son importantes los sustituyentes en C(2) y C(4) y el oxetano C(4)-C(20), para la unión al receptor (Chen 1995).

## Taxol y otros agentes antitumorales

El mecanismo de acción del taxol (4) es único, ya que otros fármacos colchicina (7), vincristina (1b), vinblastina (1a), podofilotoxina (2); actúan en sentido opuesto, bloqueando la polimerización de la tubulina y sólo se puede comparar con el razinilo (8) que tiene un mecanismo de acción intermedio entre el del taxol y los otros fármacos, es decir, inhibe el desensamblamiento de los microtúbulos como el taxol (4), y a la vez induce la agregación de la tubulina en espirales, como la vinblastina (1a). (Alzard 1996).



Colchicina (7)



Razinilo (8)

Se observó que el taxol (4) presenta mayor actividad en el ser humano que en otros modelos biológicos de estudio. Estudios clínicos han definido la actividad del taxol (4) junto con el cis platino y otros fármacos. Además de las respuestas en pacientes con cáncer ovárico, un reporte preliminar señala que el taxol (4)

produce respuestas favorables en pacientes con cáncer pulmonar metastásico, con una evidente reducción del tumor (Cragg 1993).

### Obtención del taxol (4)

La demanda mundial de taxol se ha incrementado notablemente al observar las respuestas favorables en el tratamiento de gran diversidad de tumores sólidos, incluyendo melanoma maligno y cáncer ovárico, de modo que existe ahora un nuevo problema por resolver: el suministro de taxol (4) para esta creciente demanda mundial.

La concentración de taxol en la corteza de *T. brevifolia* es muy baja: 100 ppm ( 1000 mg/Kg; 0.1% ) y su aislamiento es muy costoso. Además, la fuente del recurso no es renovable, ya que al descortezar los árboles, éstos mueren. Adicionalmente la corteza es muy delgada (aproximadamente 3 mm), y la planta es de lento crecimiento: tarda cerca de 100 años en alcanzar los 25 cm de diámetro y de 6 a 9 metros de altura. Es necesario descortezar al menos tres árboles para obtener la cantidad suficiente de taxol (4) para el tratamiento de un sólo paciente (que requiere aproximadamente 2 g por tratamiento). Estos arboles como se mencionó, no sobreviven al descortezamiento.

Para suplir la demanda mundial de taxol se han iniciado una serie de esfuerzos conjuntos a través de diferentes alternativas.

En el campo de la biotecnología se han desarrollado investigaciones para producir taxol en cultivos de tejidos de *Taxus* mediante el empleo de biorreactores.

Otra opción es la búsqueda e identificación de fuentes naturales alternas de taxanos a nivel mundial, mediante la realización de estudios de otras especies vegetales que pudieran servir como materia prima para la síntesis del taxol.

Recientemente se ha informado que un hongo endofítico asociado con *Taxus brevifolia*, *Taxomyces andreae*, produce taxol (4), aunque en cantidades muy pequeñas (Stierle and Strobel 1995).

Una tercera opción es la síntesis total de ésta sustancia. Sólo recientemente, se ha logrado su síntesis, la cual fue precedida por una intensa investigación por diversos grupos de investigación (Nicolau 1994, Holton 1994).

## Taxanos

Se ha denominado taxanos genéricamente a un grupo de compuestos diterpenoides que presentan un esqueleto como el que se muestra en la figura 3, el cual deriva biosintéticamente de precursores como el pirofosfato de geranilgeranilo, el cual a su vez, se forma a partir de fosfatode isopentenilo y fosfato de dimetilalilo (Eisenreich 1996). Se ha encontrado que pueden suceder algunas transposiciones en éste esqueleto, lo que dará origen a modificaciones estructurales.

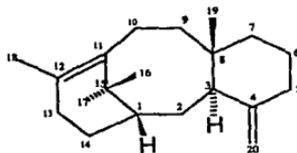
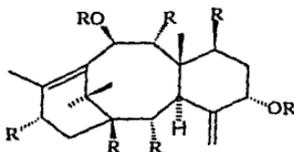


Figura 3 .- Esqueleto de un taxano

## Clasificación de taxanos

Los taxanos han sido clasificados por diferentes criterios, dependiendo de la naturaleza del patrón de oxidación, la presencia o ausencia de cadenas con nitrógeno, y otras características estructurales. A continuación se describirá la clasificación de acuerdo a la oxigenación en el C-20 y la presencia de cadenas, de acuerdo a su naturaleza (ácida o básica) como criterio de clasificación, realizada por el profesor Kingston (Kingston 1993).

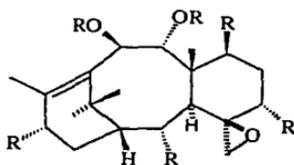
#### A.- Taxoides con una doble ligadura exocíclica C-4(20).



Dentro de éstos se encuentran:

- Taxoides neutros, con un grupo metileno exocíclico en el C<sub>4</sub> (todos ellos tienen un oxígeno  $\alpha$  sustituido en el C<sub>5</sub> y un oxígeno  $\beta$  sustituido en el C<sub>10</sub>)
- Taxoides básicos (carácter alcalino)
- Taxoides con una cadena 15 $\alpha$ -cinnamoyl

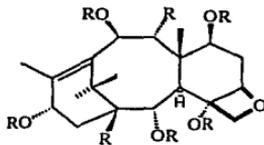
B.- Taxoides con un epóxido C(4)-C(20)



Dentro de éstos se encuentran:

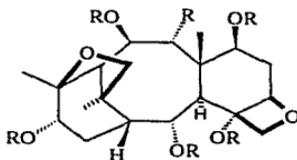
- Taxoides simples
- Taxoides básicos

C.- Taxoides con un anillo oxetano (éstos son los más interesantes desde el punto de vista medicinal)



- Taxoides simples
- Taxoides con una cadena éster en C(13)

#### D.-Taxoides diversos

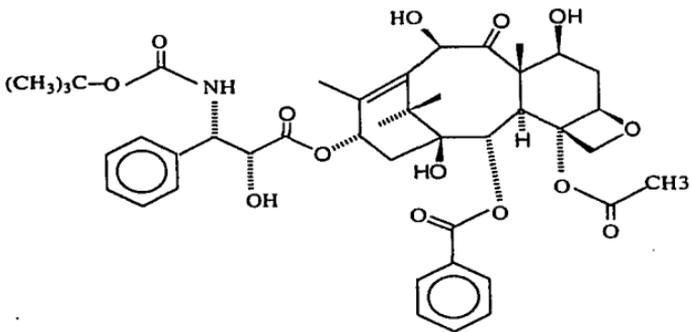


Estos se subdividen en:

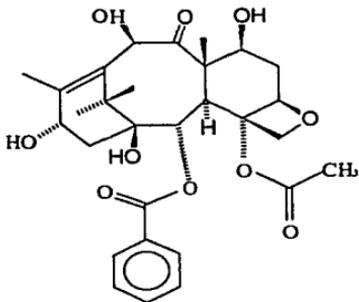
- Taxoides con una ligadura C(3)-C(11)
- Diversos : dentro de éste grupo es de especial interés la taxina A (5), la cual no tiene el esqueleto normal de un taxano.

A continuación mencionaremos algunos avances importantes en la obtención de análogos del taxol.

Un equipo de trabajo francés ha sintetizado un análogo del taxol muy importante y útil desde el punto de vista clínico: el Taxotere (9), que difiere del taxol en que tiene un grupo ter-butoxicarbonilo en lugar del grupo benzilo en el ester en C(13), y un grupo hidroxilo en lugar de un acetilo en C(10). Los cambios estructurales confieren una mayor solubilidad al taxotere, y por lo tanto, mayor biodisponibilidad que en el caso del taxol. El taxotere promueve la asociación y estabilidad de los microtúbulos con una potencia que se aproxima al doble que el taxol. Taxotere (9) se prepara por semisíntesis a partir de un precursor aislado de las hojas de *T. baccata* (una fuente renovable del recurso): 10-desacetilbaccatina III (10), que puede ser aislada de manera directa y en proporciones relativamente elevadas.



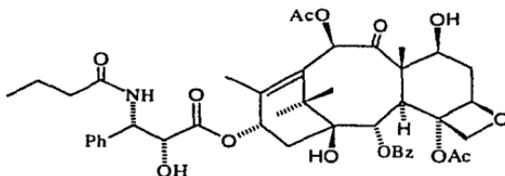
**Taxotere (9)**



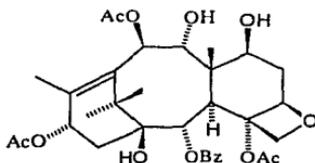
**Desacetylilbaccatina III (10)**

A partir de *Taxus canadensis* han sido aislados varios taxanos bioactivos. Uno de ellos, la taxullina (11), promueve el ensamblamiento de los microtúbulos, y su actividad es ligeramente más alta que la del taxol (4), pero menor que la del

taxotere (Ora 1996). A partir de la 13-acetoxy-9(R)-dihidrobaccatina (12) aislada de ésta misma especie, se han preparado una serie de 9(R)-dihidrotaxanos. En general, éstos taxanos son muy estables, más solubles que los que tienen carbonilo en C(9), y retienen la actividad antimicrotubular y de citotoxicidad del taxol (4) (Klein 1995).



**Taxucullina (11)**



**13-acetoxy-9(R)-dihidrobaccatina (12)**

Se tiene información, por comunicación personal con el profesor Robert Nicholson en Massachusetts, E.U., que éste investigador ha realizado un estudio preliminar sobre la composición química de *Taxus globosa* en nuestro país. Estos resultados, presumiblemente, no han sido publicados, ya que fueron parte de un rastreo a nivel mundial de fuentes alternas de taxol (4) (Delgado 1997) por requerimientos de empresas farmacéuticas. Este estudio, realizado en diferentes poblaciones de *T. globosa* en nuestro país, empleó cromatografía de líquidos de

alta resolución (CLAR) como criterio de identificación de taxanos. Es conveniente mencionar que ésta metodología no es completamente confiable cuando se analizan mezclas muy complejas de sustancias similares, como es el caso del análisis de los extractos, por lo que tales resultados deben considerarse como estudios preliminares.

## **IV.METODOLOGÍA**

El material vegetal fue colectado en Jocotic, Chiapas en julio de 1995. La muestra botánica se encuentra depositada en el Herbario Nacional, Instituto de Biología (MEXU 669748 Colecta J. Castillo # 726).

El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente, separando el follaje y la corteza. El peso seco de la corteza fue 2.2 Kg, que fueron extraídos a temperatura ambiente con etanol por 48 horas por tres ocasiones consecutivas. A los extractos etanólicos se les eliminó el disolvente por destilación a presión reducida. El residuo final se sometió a una partición con cloroformo y agua, obteniéndose 22.1 g de extracto clorofórmico.

El residuo clorofórmico se adsorbió en 20 g de sílice 70-230 Merck, y fué aplicado a una columna cromatográfica de 5 cm de diámetro empacada a presión reducida con sílice 230-400 (60 g) hasta alcanzar una altura de 5 cm, para realizar una cromatografía a presión reducida (Coll 1986), empleando un gradiente de polaridad creciente de elución de hexano-acetato de etilo, se colectaron 102 fracciones de 400 ml con la mezcla de elución que se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2.- Elución de la Cromatografía de la Fracción Clorofórmica.

FRACCIONES COLECTADAS	GRADIENTE DE ELUCIÓN Hex:AcOEt
1-10	100% hex.
11-22	98:2
23-29	95:5
30-35	9:1
36-44	85:15
45-50	8:2
51-61	7:3
62-70	6:4
71-80	5:5
81-85	6:4
86-90	100% AcOEt
91-101	100% acetona
102	100% metanol

Tabla 2.- Reunión de las fracciones de acuerdo con su similitud cromatográfica.

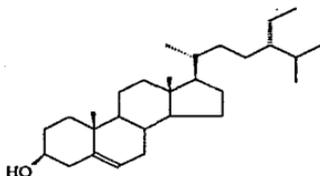
FRACCIONES REUNIDAS	REUNIDAS EN:	FRACCIONES REUNIDAS	REUNIDAS EN:
1-4	1	52-55	13
5-6	2	56-61	14
7-9	3	62-64	15
10-21	4	65-66	16
22-26	5	67-70	17
27-30	6	71-72	18
31-33	7	73-74	19
34-35	8	75-83	20
36-40	9	84-87	21
41-45	10	88-91	22
46-50	11	92-101	23
51	12	102	24

Las fracciones obtenidas de la cromatografía del extracto clorofórmico fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica como se muestra en la tabla 2, para ser purificadas posteriormente sus componentes mayoritarios mediante recromatografías sucesivas (en columna y en placa fina preparativa).

La fracción 4 (1 g) tenía una consistencia aceitosa, y al adicionar una mezcla de disolventes (hexano, acetato de etilo y acetona) precipitó un sólido amorfo de color blanco opaco identificado como  $\beta$  sitosterol (**13**), cuyos datos espectroscópicos son:

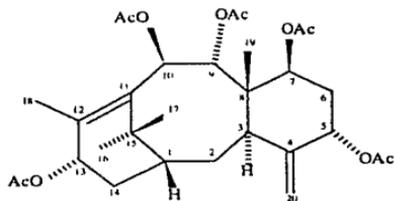
Pf. 136-137 °C

RMN<sup>1</sup>H. (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ . asignación: 0.68 (s, H-18), 0.81 (d, H-27), 0.83 (d, 6.7, H-26), 0.84 (t, 7.4 H-29), 0.97 (d, 6.4, H-21), 1.02 (s, H-19), 3.5 (m, H-3), 5.36 (d, H-6)



**$\beta$  sitosterol (13)**

La fracción 11 (1 g) fue adsorbida en sílica gel 70-230 (1 g) y aplicada en una columna de 1.8 cm de diámetro empacada con presión reducida con sílice 60 GF<sub>254</sub> hasta alcanzar 4 cm de altura. La columna fue eluida con mezclas de hexano: acetona con un gradiente de hexano:acetona. De polaridad ascendente. Se colectaron fracciones de 50 ml. La fracción 11.3 (622.5 mg) mostró por cromatografía en capa fina estar compuesta por dos constituyentes mayoritarios por lo que se decidió recromatografarla para aislar estos compuestos; fue adsorbida en 60 mg de sílica gel 230-400 y empacada en una columna de 2.5 cm de diámetro, a presión reducida con sílice 60 GF<sub>254</sub> hasta alcanzar 4 cm de altura; fue eluida con mezclas de hexano : acetona con un gradiente de polaridad ascendente, se colectaron fracciones de 100 ml. La fracción 11.32 (183 mg) de éste fraccionamiento se adsorbió en 180 mg de sílica gel 70-230 y empacó al vacío en una columna cromatográfica de 2 cm de diámetro de kieselgel 60 GF<sub>254</sub> hasta alcanzar 4 cm de altura, fue eluida con un gradiente de hexano:acetona. Se colectaron fracciones de 100 ml. La fracción 11.323 de éste fraccionamiento, se purificó por medio de una cromatoplaaca preparativa de 2 mm. de grosor, el sistema de elución fue CHCl<sub>3</sub> : acetona 95:5, se eluyó una vez. Se obtuvieron 20 mg de **15**(Halsall 1969), cuyos datos espectroscópicos se enlistan a continuación.



### 7β aceloxy taxusina (15)

Pf = 205-207 °C

IR  $\nu$  max (CHCl<sub>3</sub>) 3691, 3604, 2956, 2879, 1735 cm<sup>-1</sup>

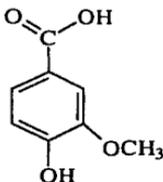
RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , asignación. 0.85 (s, H-19), 1.17 y 1.62 (s, H-16, H-17), 2.08, 2.03, 2.19, 2.07, 1.98 (s, Metilos en los acetatos), 2.20 (d, 1.5, H-18), 2.66 (m, H-1), 2.91 (d, 5.1, H-3), 4.96 (s, H-20b), 5.29 (s, H-20a), 5.39 (t, 2.5, H-5), 5.55 (dd, 5, 11.5, H-7), 5.91 (d, 11, H-10), 5.94 (t, H-13), 6.25 (d, 10.5, H-9).

RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ , asignación. 13.29(C-19), 14.94(C-18), 20.80(OMe), 20.95(OMe), 21.38(OMe), 21.38(OMe), 21.73(OMe), 27.36(C-16), 27.55(C-2), 31.16(C-17), 31.41(C-14), 34.13(C-6), 37.60(C-3), 39.45(C-15), 40.50(C-1), 46.18(C-8), 70.11(C-7), 70.76 (C-13), 71.67(C-10), 74.77 (C-5), 76.84 (C-9), 115.66(C-20), 134.54(C-11), 137.40(C-12), 146.78(C-4), 169.20(OAc-10), 169.80(OAc-7), 169.82(OAc-5), 170.25(OAc-13), 170.41(OAc-9).

EM m/z: (IE, 70 ev) 562 [M<sup>+</sup>], 502 [M<sup>+</sup>-60 (CH<sub>3</sub>COOH)], 442 [M<sup>+</sup>-60-60], 382 [M<sup>+</sup>-240], 262 [M<sup>+</sup>-300], (C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>10</sub>)  $\Omega$ =10

La fracción 12 (267 mg) fue recromatografiada en 300 mg de sílica gel 70-230 y empacada al vacío en una columna cromatográfica de 2.5 cm de diámetro de Sílica gel 230-400 hasta alcanzar 5 cm de altura, se eluyeron fracciones de 50 ml con un gradiente de hexano: acetato de etilo. La fracción 12f (13.9 mg) de éste fraccionamiento se aplicó en una cromatoplaqa preparativa de 0.25 cm de grosor, y fue eluída 2 veces en el sistema CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:

acetona 9:1 ( 100 ml del sistema más 1 ml de ácido acético), mediante éste procedimiento se obtuvieron 12 mg de **16**.



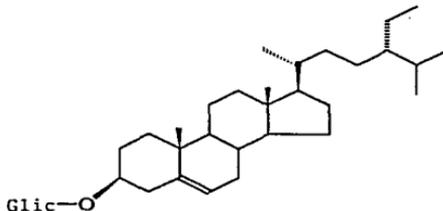
**(16) Ácido Vainílico**

Pf = 210-212 °C

IR v max (CHCl<sub>3</sub>) 3531.5, 2962, 2931.7, 2873.8, 1724.3, 1280, 1128, 1074 cm<sup>-1</sup>

RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, asignación. 7.58 (dd, 8.1, 1.8, H<sub>a</sub>), 7.55 (d, 1.8, H<sub>b</sub>), 6.89 (d, 8.1, H<sub>c</sub>), 3.92 (s, metoxilo)

De la fracción 22 se aisló un sólido amarillento (20mg), **(12)**, cuyos datos espectroscópicos correspondieron a los de un glicósido de β-sitosterilo. Sus características se enlistan a continuación.



**Glicósido de β sitosterilo (14)**

Pf. 283-286 °C

RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO) δ. asignación. 5.32 (d, 4.8, H-6), 4.85 (d,d, 4.8, H-4'), 4.83(d,d, 2.4, 2.1, H-3'), 4.39 (t, 6, H-2'), 4.22 (d, 8.1, H-1'), 3.64 (m, 10.5, 5.7, H-5'), 3.28 (s, H-6'), 3.41 (m, 11.4,5.7, H-3), 2.89 (m, 4.5, 7.8, H-7), 3.07 (m, 4.8 H-4) 0.65 (s, CH<sub>3</sub>-18),0.95 (s, CH<sub>3</sub>-19), 0.90 (s, CH<sub>3</sub>-21), 0.80 (s, CH<sub>3</sub>-26), 0.78 (s, CH<sub>3</sub>-27), 0.82 (s, CH<sub>3</sub>-29).

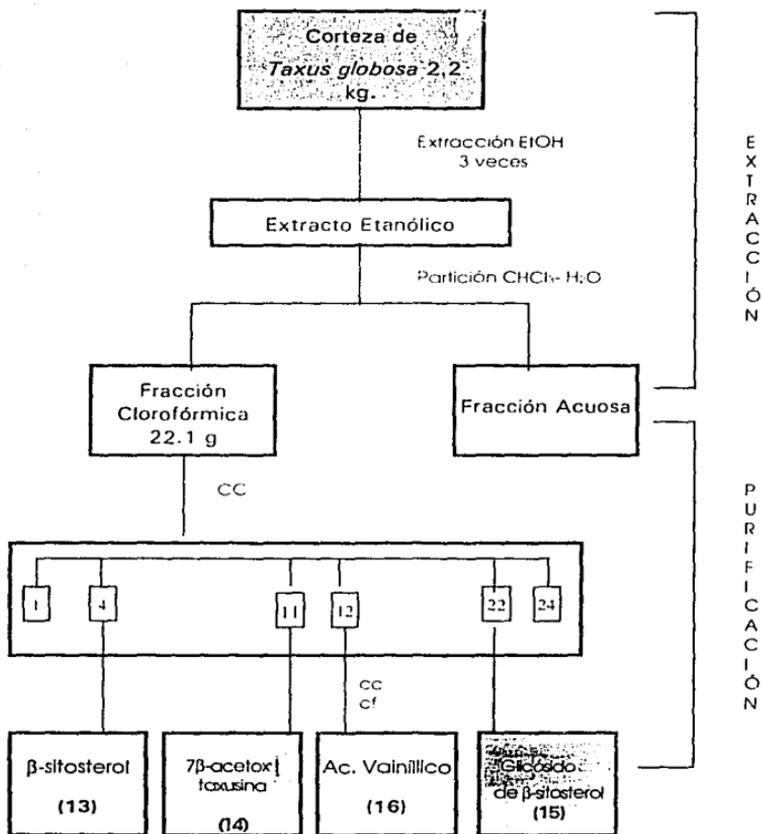


Figura 4 - Procedimiento experimental para el aislamiento de metabolitos secundarios mayoritarios de *Taxus globosa*

## V. MATERIAL

## Material y Equipo

Para las cromatografías en columna se utilizó como fase estacionaria, Sílica-gel para placa Merck, malla 230-400, y Kieselgel 60 GF <sub>254</sub>. El análisis por cromatografía en placa fina analítica se llevó a cabo en cromatofolios Alugram Sil G/UV 254, Macherey-Nageel Düren y como reveladores una lámpara UV Spectroline Modelo ex-20 a 365, 254 nm de longitud de onda, y solución de sulfato cérico amónico al 1% en ácido sulfúrico 2N. La cromatografía en placa se realizó en placas preparativas Merck de 2 mm, 1 mm y 0.5 mm de grosor y una superficie de 20 x 20 cm.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns, y no están corregidos.

Los espectros de RMN<sup>1</sup>H se obtuvieron en un espectrómetro analítico Varian-Gemini 200 y Varian XR-300, a 300 y 500 MHz, utilizando como disolvente CDCl<sub>3</sub> y como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de RMN<sup>13</sup>C se obtuvieron en instrumentos Varian-300 a 75 y 125 MHz.

Los espectros de IR se obtuvieron en espectrómetro Perkin-Elmer 283-B

Los espectros de Masas se obtuvieron en un espectrómetro Hewlett Packard 5985-B, utilizando la técnica de impacto electrónico de ionización de 70 ev.

Los espectros de UV se determinaron en un espectrómetro Shimadzu UV 160.

Para el la elucidación estructural de la 7β-acetoxo taxusina se recurrió a experimentos en RMN<sup>13</sup>C con desacoplamiento electrónico por transferencia de polarización (DEPT y HMQC) y (COSY) en RMN<sup>1</sup>H.

De la fracción clorofórmica del extracto etanólico de la corteza de *Taxus globosa*, se aislaron, mediante los procedimientos que se describen en la parte experimental, los siguientes metabolitos:

$\beta$ -sitosterol (13)

Glicósido de  $\beta$ -sitosterilo (14)

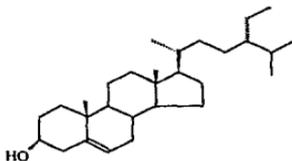
7 $\beta$ - acetoxi - taxusina (15)

Ac. Valnílico (16)

A continuación se describirán y analizarán las propiedades físicas y espectroscópicas de los esteroides caracterizados, que son el  $\beta$  sitosterol (13) y glicósido de  $\beta$ -sitosterilo (14). Posteriormente se analizarán la 7 $\beta$ - acetoxi - taxusina (15) y, finalmente el ácido valnílico (16).

El  $\beta$ -sitosterol (13) es un sólido de color blanco que al revelar la cromatoplaaca analítica con sulfato cérico amónico, presenta una coloración grisacea, característica de esteroides. El espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, espectro 1), muestra una señal centrada en  $\delta$  5.35 (doblete ancho, J=4.7 Hz) característica del hidrógeno vinílico H-6, presumiblemente de un esteroide. El multiplete centrado en  $\delta$  3.53 corresponde al hidrógeno carbonílico en C-3. Las señales comprendidas entre  $\delta$  2.21 corresponden a metinos y metilenos, mientras que en el intervalo  $\delta$  1.0- 0.6 se encuentran las señales pertenecientes a los metilos.

Estas características están de acuerdo con la estructura del  $\beta$ -sitosterol (13); la identidad de ésta sustancia fue confirmada por comparación directa por ccf, ir, pf, RMN <sup>1</sup>H, ( $\alpha$ )<sub>D</sub> y con una muestra auténtica aislada en nuestro laboratorio.



$\beta$  sitosterol (13)

## **VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

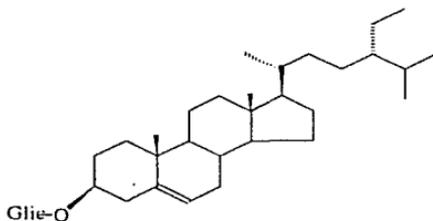
El glicósido de  $\beta$ -sitosterilo (14), fue aislado como una sustancia de mayor polaridad y su espectro de RMN<sup>1</sup>H (DMSO, 300 MHz, espectro 2) muestra las mismas señales que las descritas para el  $\beta$ -sitosterol (13), es decir, el hidrógeno vinílico en H-6 ( $\delta$  5.32, doblete amplio J=4.8), el hidrógeno geminal al oxhidrilo ( $\delta$  3.40, multiplete), y a campo alto, las señales singuletes correspondientes a los metilos. Se observan en el espectro de 14, señales adicionales entre  $\delta$  4.80 y 2.80, asignadas a hidrógenos geminales a oxígeno y que corresponden al residuo glicósido, las cuales se describen en la tabla 5.

Tabla 4.- Datos obtenidos de RMN<sup>1</sup>H (300, DMSO), glicósido de  $\beta$ -sitosterilo (14).

Asignación	$\delta$	Asignación	$\delta$
H <sub>6</sub>	5.323 (d, 4.8)	H <sub>7</sub>	2.892 (m, 4.5, 7.8)
H-GII	4.8455 (dd., 4.8)	H <sub>4</sub>	3.073 (m, 4.8)
H-GII	4.827 (dd., 2.4, 2.1)	CH <sub>3</sub> -18	0.650 (s)
H-GII	4.395 (t, $\delta$ , H-2')	CH <sub>3</sub> -19	0.954 (s)
H-GII	4.216 (d, 8.1)	CH <sub>3</sub> -21	0.90 (s)
H-GII	3.643 (m, 10.5, 5.7)	CH <sub>3</sub> -26	0.803 (s)
H-GII	3.280 (s)	CH <sub>3</sub> -27	0.781 (s)
H <sub>3</sub>	3.412 (m, 11.4, 5.7)	CH <sub>3</sub> -29	0.819 (s)

La comparación por ccf de ésta muestra con el glicósido de  $\beta$ -sitosterilo, no permitió concluir sin ambigüedad sobre la identidad de ambas sustancias. El espectro de la muestra aislada de *T. globosa* fué corrido, por cuestiones de solubilidad, en DMSO, y en éste disolvente el trazo del espectro no se resolvió completamente, lo cual implicó la caracterización del azúcar, sin embargo, es indudable que las señales ubicadas en  $\delta$  4.2 y 5.0 corresponden al residuo glicosídico.

Debido a la amplia distribución de los glicósidos esteroidales, como constituyentes de las plantas superiores, se decidió continuar con el trabajo experimental, estableciéndose ésta estructura comoun glicósido de  $\beta$ -sitosterilo (14).



#### Glicósido de $\beta$ -sitosterilo (14)

De las fracciones de mediana polaridad (11 y 12, ver metodología) se aisló un sólido de pf. 205-207 °C, que en el análisis por cromatografía en capa fina y revelado con sulfato cérico amónico, presentó una mancha homogénea de color café oscuro.

En el espectro de IR de ésta sustancia (espectro 3) se observan señales en 3691  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a enlace carbono oxígeno. La presencia de señales en 2956 y 2879  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a metilos y metilenos. Una señal característica para carbonilo aparece en 1735  $\text{cm}^{-1}$ , probablemente de éster, lo cual es corroborado por la absorción en 1247  $\text{cm}^{-1}$ .

El espectro de masas (espectro 4) muestra un ión molecular en  $m/z$  562, y se observan cinco pérdidas sucesivas de 60 unidades de masa cada una, lo que presumiblemente corresponde a eliminaciones de ácido acético de la molécula.

En efecto, el espectro de RMN<sup>1</sup>H (espectro 5, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) permite determinar la presencia de cinco acetatos, evidenciados por los cinco singuletes entre  $\delta$  1.90-2.20, correspondientes a metilos unidos a carbonilos. En éste mismo espectro, entre  $\delta$  4.90 y 6.40 se observan las señales asignables a hidrógenos vinílicos e hidrógenos metínicos geminales a oxígeno, las cuales suman cinco protones, y serán asignados posteriormente. La integral bajo la curva de éste espectro establece la presencia de aproximadamente 40-44 hidrógenos, veintisiete de los cuales pertenecen a los nueve metilos, debido a la presencia a campo alto de los singuletes correspondientes.

En el espectro de RMN<sup>13</sup>C (espectro 6, 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>), se observan un total de 30 señales. Este dato, conjuntamente con el número aproximado de hidrógenos determinados por RMN<sup>1</sup>H, y con el ión molecular observado(m/z 562, espectro 4), permiten deducir la fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>10</sub>. Esta sustancia posee, por lo tanto, diez insaturaciones.

Mediante el espectro de RMN<sup>13</sup>C (modalidad DEPT, espectro 7) fue posible establecer el grado de hidrogenación de los carbonos: nueve son de metilo, tres son de metilenos alifáticos, un metileno vinílico, siete carbonos de metinos, cinco de ellos (los que resuenan entre  $\delta$  70-80) deben ser carbonos geminales a oxígeno. Finalmente, por diferencia del espectro normal de RMN<sup>13</sup>C (espectro 6) y el espectro de RMN<sup>13</sup>C modalidad DEPT (espectro 7), se determinó la presencia de tres carbonos cuaternarios vinílicos, dos carbonos cuaternarios alifáticos y cinco carbonos carbonílicos, los cuales pertenecen a acetatos. Este análisis permite definir los siguientes fragmentos estructurales, los cuales suman treinta carbonos (figura 5).

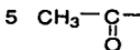
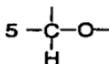
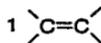
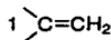
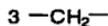


Figura 5.- Fragmentos estructurales

Los grados de insaturación de ésta sustancia (diez grados de insaturación) pueden explicarse de la siguiente manera: cinco dobles enlaces carbono - oxígeno, dos dobles enlaces carbono - carbono y los tres restantes deben corresponder a tres ciclos.

Esta estructura pertenece, por lo tanto, a un esqueleto de veinte átomos de carbono (diterpeno tricíclico), ya que los diez átomos restantes pertenecen a los cinco acetatos (dos por acetato).

Cinco de los metinos son el punto de inserción de los acetatos, esto explica que sus señales en RMN <sup>1</sup>H se observen desplazados a campo bajo (δ 5.30-6.50). Se observa además, un sistema AB para dos metinos en δ 6.25 y 5.91 respectivamente, cuya constante de acoplamiento es de 10.5 Hz. éstos metinos como se mencionó anteriormente, están unidos a los grupos acetato. De éstos metinos, el que se encuentra a campo más bajo, debe estar unido a un grupo electroattractor que lo desproteja. De acuerdo con los grupos funcionales presentes, solamente podría estar unido a un carbono cuaternario vinílico,

mientras que el otro metino debe estar unido probablemente a un carbono cuaternario alifático, deduciéndose el fragmento estructural de la figura 6.

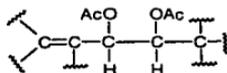


Figura 6.- Sistema AB

La vecindad entre éstos dos hidrógenos vecinales se confirma por la correlación que se observa en el espectro bidimensional COSY (espectro 8, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

Se observa además, en el espectro de resonancia magnética protónica original (espectro 6) una señal doble de doble cuarteteado (centrada en  $\delta$  5.94) de otro hidrógeno correspondiente a un metino unido a acetato. Esta señal está parcialmente superpuesta con la rama a campo alto del sistema AB recién descrito. La multiplicidad de ésta señal (d,d,c) indica el acoplamiento con un metilo a larga distancia (c,  $J=1.5$ ) y un acoplamiento mayor con un metileno (d,d  $J=8,8$ ). El desplazamiento a campo bajo ( $\delta$  5.94), indica la vecindad con una olefina.

La presencia de una señal doblete a campo bajo en  $\delta$  2.20 ( $J=1.5$ ), asignable a un metilo olefínico. La unión de éstos fragmentos con la fórmula parcial de la figura 5, permite deducir la fórmula de la figura 7.

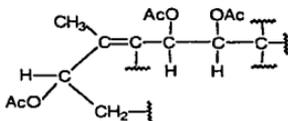


Figura 7

Este arreglo estructural está de acuerdo con las intersecciones que se observan en el espectro COSY (espectro 8) para la señal de  $\delta$  5.94. Esta correlaciona con un metileno a campo alto ( $\delta$  2.66 y 1.03) y con un metilo vinílico ( $\delta$  2.20) Figura 8.

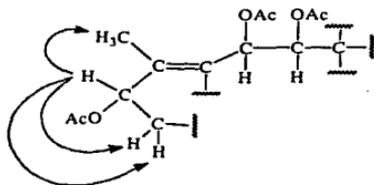


Figura 8.- Correlaciones observadas en el espectro COSY.

El hidrógeno alílico que forma parte del sistema AB ( $\delta$  6.25), presenta únicamente un acoplamiento con el hidrógeno en  $\delta$  5.91, por lo que este último debe de estar vecinal a un carbono cuaternario alifático.

Hasta el momento se conoce que de los nueve metilos, cinco son de acetato y uno es vinílico. Los tres restantes deben pertenecer a metilos unidos a carbonos cuaternarios alifáticos. Debido a que sólo hay dos carbonos cuaternarios de ésta naturaleza, se deduce la presencia de un dimetilo geminal, y un metilo sobre carbono cuaternario (figura 9)



Figura 9.- Gem dimetilo y metilo sobre carbono cuaternario.

La conexión de las fórmulas parciales de las figuras 6 y 8 permite deducir la fórmula parcial de la figura 10, la cual omite la ubicación del gem di-metilo.

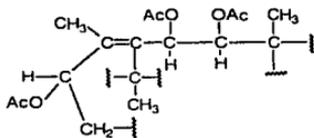


Figura 10.

Por otro lado, las señales que observadas en  $\delta$  5.28 y 4.95, corresponden a un sistema AB y son dos hidrógenos vinílicos unidos a un carbono olefínico. Prácticamente no se observa acoplamiento H-C-H geminal, y éste fragmento corresponde a un doble enlace exocíclico.

Un hidrógeno de metino, cuya señal doblete ancho se observa a campo alto ( $\delta$  2.91,  $J=5$ ), debe corresponder a un protón alílico, por su desplazamiento a campo bajo, de modo que es posible unirlo al fragmento descrito en el párrafo anterior. El otro sustituyente del carbono cuaternario vinílico podría ser uno de los metinos unidos a acetato, que se encuentran en  $\delta$  5.0-6.0. De lo anterior se deduce el fragmento de la figura 11.

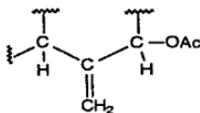


Figura 11.

Los hidrógenos vinílicos, efectivamente, correlacionan con el hidrógeno terciario en  $\delta$  2.91 en el espectro bidimensional COSY (espectro 8).

Para la integración de la fórmula total de ésta sustancia es necesaria la incorporación de siete átomos de carbono. Dos de éstos pertenecen al grupo acetato, dos metinos, dos metilenos y un metilo. Estos fragmentos, en conjunción con las fórmulas parciales de las figuras 10 y 11, permiten deducir la presencia de

un tricyclo diterpénico de taxano (figura 12). Así, resulta evidente la presencia del biciclo (5.3.1) fusionado con un ciclohexano, y en éste esqueleto, se ubican las funcionalidades anteriormente deducidas: el doble enlace tetra sustituido se ubica en C(11)-C(12), el doble enlace exocíclico se localiza en C(4)-C(20), los acetatos vecinales se encuentran en C(9) y C(10), los tres acetatos unidos a carbonos secundarios cuyo hidrógeno metínico es vecino a metilenos se ubican en C(5), C(7) y C(13), y el gem di-metilo se localiza en C(15). La estructura de ésta sustancia se muestra en la figura 15. De modo que es posible asignar las señales observadas en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 6, tabla 5)

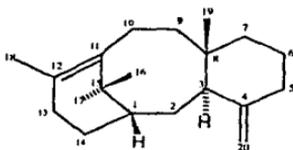
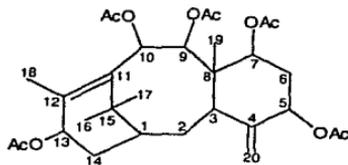


Figura 12.- Esqueleto de un Taxano.



(15)

Mediante el experimento HMQC fué posible determinar las correlaciones carbono - hidrógeno a un enlace, lo que permitió determinar los desplazamientos de los carbonos protonados (figura 13). Este experimento confirmó la estructura

propuesta para ésta sustancia y las asignaciones deducidas mediante este experimento se muestran en la tabla 6.

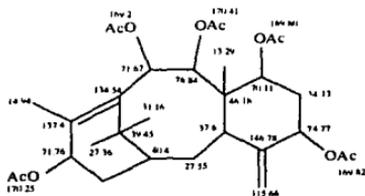


Figura 13.- Asignaciones de RMN<sup>13</sup>C para 15

Tabla 5.- Datos experimentales de RMN<sup>1</sup>H de (15)

Asignación	Características de la señal	Asignación	Características de la señal
H <sub>10</sub>	6.25 (d, 10.5).	COOCH <sub>3</sub>	2.06 (s)
H <sub>13</sub>	5.94 (t)	COOCH <sub>3</sub>	2.02 (s)
H <sub>9</sub>	5.91 (d, 11)	COOCH <sub>3</sub>	1.98 (s)
H <sub>7</sub>	5.55 (dd, 5.11.5)	H <sub>6a</sub>	1.91 (dd, 2.5.5)
H <sub>5</sub>	5.39 (t, 2.5)	H <sub>6b</sub>	1.78 (dd, 4.2.5)
H <sub>20a</sub>	5.28 (d, 1)	H <sub>14</sub>	2.66 (dt, 14, 9.5)
H <sub>20b</sub>	4.95 (d, 1.5)	H <sub>14</sub>	1.03 (dd, 14, 7.5)
H <sub>3</sub>	2.91 (d, 5.1)	H 16	1.63 (s)
H <sub>1</sub>	1.88 (m)	H 17	1.17 (s)
H <sub>18</sub>	2.20 (d, 1.5)	H 19	0.846 (s)
COOCH <sub>3</sub>	2.18 (s)	H <sub>2</sub>	1.72 (d, ancho, 6.5)
COOCH <sub>3</sub>	2.07 (s)	H <sub>2</sub>	1.86

Asignación de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de acuerdo al análisis del espectro HMQC. Tabla 6.

C	Señales en RMN $^{13}\text{C}$	Señales en RMN $^1\text{H}$
1	40.40	1.88
2	27.55	1.72, 1.86
3	37.60	2.91
4	146.78	----
5	74.77	5.39
6	34.13	1.91, 1.78
7	70.11	5.55
8	46.18	----
9	76.84	5.91
10	71.67	6.25
11	134.54	5.28, 4.90
12	137.40	----
13	71.76	5.94
14	31.41	2.66, 1.03.
15	39.45	----
16	27.36	1.63
17	31.16	1.17
18	14.94	2.20
19	13.29	0.84
20	115.66	4.95, 4.28
OCH $_3$	20.80	2.02
OCH $_3$	20.95	1.98
OCH $_3$	21.38	2.06
OCH $_3$	21.38	2.07
OCH $_3$	21.73	2.18
10(C)-CO	169.20	----
10(C)-CO	169.80	----
10(C)-CO	169.82	----
10(C)-CO	170.25	----
10(C)-CO	170.41	----

Realizadas las asignaciones de carbono e hidrógeno, se determinan, mediante el experimento HMBC, las correlaciones hidrógeno carbono a dos y tres enlaces, esta información está resumida en la tabla 7 e ilustrada en la figura 14.

Tabla 7.-Correlaciones observadas mediante el experimento de HMBC (Espectro 8d)

$\delta$ hidrógeno	Carbonos con los que correlaciona
$\delta$ 6.25 (C $\delta$ 71.67)	$\delta$ 76.84, 39.45, 134.5, 137.4, 169.2.
$\delta$ 5.94 (C $\delta$ 70.76)	$\delta$ 170.25, 134.54, 137.4, 31.4.
$\delta$ 5.91 (C $\delta$ 76.84)	$\delta$ 71.67, 70.11, 46.2, 13.29, 134.5, 170.41.
$\delta$ 5.55 (C $\delta$ 70.11)	$\delta$ 13.29, 34.13, 169.80.
$\delta$ 5.39 (C $\delta$ 74.77)	$\delta$ 70.11, 37.6, 34.13, 115.66, 169.82.
$\delta$ 4.95, 4.28 (C $\delta$ 115.66)	$\delta$ 74.77, 37.6, 146.78.
$\delta$ 2.91 (C $\delta$ 37.6)	$\delta$ 70.11, 46.18, 40.50, 27.55, 13.29, 146.78, 115.6.
$\delta$ 2.66, 1.03 (C $\delta$ 31.41)	$\delta$ 70.76, 27.55, 137.4, 27.55, 40.50.
$\delta$ 1.63 (C $\delta$ 27.36)	$\delta$ 40.50, 134.5, 39.50, 31.16.
$\delta$ 1.17 (C $\delta$ 31.16))	$\delta$ 134.5, 39.50, 27.36, 40.50
$\delta$ 0.84 (C $\delta$ 13.29)	$\delta$ 70.11, 76.84, 46.22, 37.60.
$\delta$ 1.91, 1.78 (C $\delta$ 34.13)	$\delta$ 146.78, 70.11, 74.77, 46.18
$\delta$ 1.72, 1.86 (C $\delta$ 27.55)	$\delta$ 46.22.
$\delta$ 2.20 (C $\delta$ 14.94)	$\delta$ 134.5, 137.4.

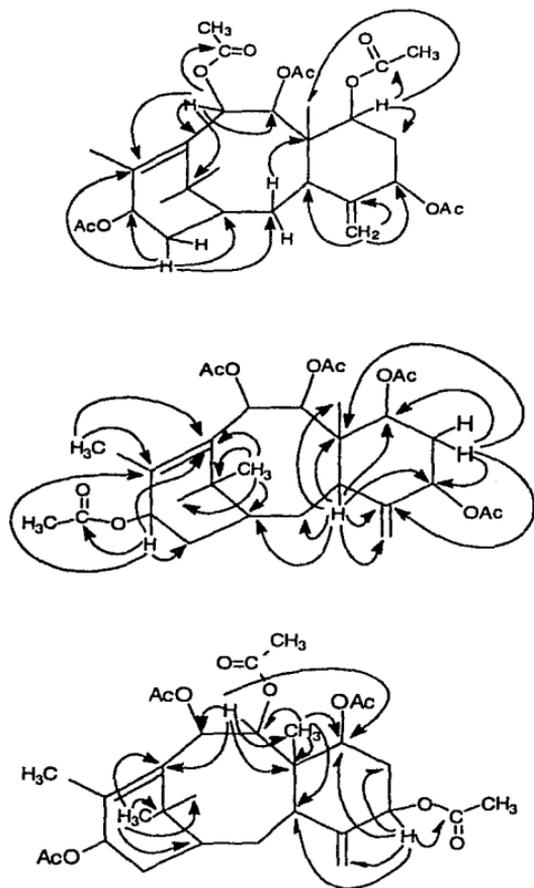


Figura 14.- Correlaciones observadas en HMBC (Espectro 8d).

La determinación de la configuración relativa de cada uno de los centros quirales se llevó a cabo mediante la comparación de los datos informados en la literatura y mediante el análisis de las constantes de acoplamiento de los hidrógenos geminales a los acetatos. Esta molécula presenta diez centros estereogénicos, los cuales, se localizan en los carbonos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14. Para los carbonos 11 y 12, sólo existe una configuración posible debido a la conectividad de la molécula. En el caso de los carbonos 1, 3, y 8, su configuración relativa está determinada, ya que son centros quirales que están dentro del esqueleto de un taxano (fig. 12, Kingston, 1993). Para el resto de los carbonos quirales es necesario realizar un análisis de las constantes de acoplamiento.

Los hidrógenos de los carbonos 9 y 10 que corresponden a un sistema AB como se ha determinado, presentan una constante de acoplamiento de 10.5 Hz. Esta constante de acoplamiento debe corresponder a una disposición espacial anti (Figura 15)

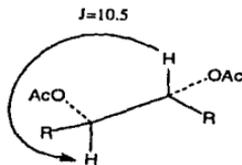


Figura 15.- Acoplamiento anti.

Por lo tanto el acetato en C(9) es  $\alpha$  y el de C(10) es  $\beta$ .

Para el hidrógeno correspondiente al carbono 7 (que resuena en  $\delta$  5.55) se observan dos constantes de acoplamiento que corresponden a su vecindad con el metileno C(6). La mayor de las constantes, 11.5 Hz, corresponde a un acoplamiento trans diaxial, y la constante de 5.0 Hz representa un acoplamiento pequeño de H(7) con el hidrógeno ecuatorial de H(6), (figura 16). Este análisis establece la orientación  $\beta$  del acetato en C(7).

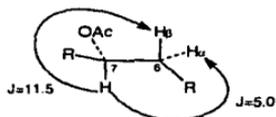


Figura 16.- Acoplamientos de H<sub>7</sub>

El hidrógeno en C(5) presenta solamente un acoplamiento (de 2.5 Hz): éste pequeño acoplamiento indica que el hidrógeno en C(5) se encuentra a la misma distancia de los hidrógenos de C(6), en una configuración *synperiplanar* (Figura 17), por lo que el acetato se encuentra  $\alpha$ .

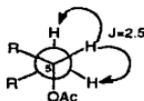


Figura 17.- Configuración de H<sub>5</sub>

Para el hidrógeno en C(13), se observa un doble de doble cuarteteado, con  $J=1.5$ , que corresponde al acoplamiento a larga distancia con el metilo de C(18). La similitud en la magnitud de las constantes de acoplamiento restantes ( $J=8.6$   $J=8.5$ ) puede explicarse, si se supone, de acuerdo a la ecuación de Karplus (Dyer 1980), la existencia de un ángulo diedro cercano a cero y otro cercano a  $150^\circ$ , éste acomodado está de acuerdo con la orientación  $\alpha$  del acetato en C(13) (Figura 18)

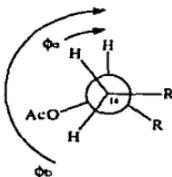


Figura 18.- Configuración relativa para el C(13),  $\phi_a = 10^\circ$ ,  $\phi_b = 150^\circ$ .

Integrando la información anterior podemos determinar la estructura tridimensional de la molécula, la cual se ilustra en la figura 19.

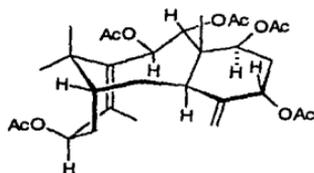


Figura 19.- Estructura tridimensional de 7 $\beta$ -acetoxi taxusina (15)

Determinada la estructura y estereoquímica de ésta sustancia, se realizó una investigación bibliográfica, recopilando las estructuras similares a ésta. Esta revisión permitió determinar que ésta sustancia ha sido aislada previamente de *T. baccata* (Halsall, 1969), *T. mairei* (Yang, 1996). La comparación de los datos obtenidos con los informados en la literatura, para ésta sustancia, se presenta en la tabla 9. De ésta forma es posible concluir que la sustancia aislada corresponde a 7 $\beta$ -acetoxi taxusina (15).

Tabla 9.- Comparación de datos obtenidos experimentalmente y informados para la 7 $\beta$ -acetoxi taxusina (15).

	Bibliográfico	Experimental
CH <sub>3</sub> -C <sub>8</sub>	1.15	1.14
CH <sub>3</sub> -C <sub>15</sub>	1.65	1.63
CH <sub>3</sub> -C <sub>12</sub>	2.14	2.19
H-C <sub>3</sub>	2.95 w 1/27	2.91 d, J= 5.1
=CH <sub>2</sub>	5.32- 4.99	4.99-5.29 J= 0.9
H-C <sub>5</sub>	5.42 t, J=3	5.39 t, J= 3.6, 2.4
H-C <sub>7</sub>	5.59 q, J=6, 10.5	5.55 q, J=5.1, 11.7
H-C <sub>9</sub>	5.97 d, J= 11.5	5.91 d, J= 11.4
H-C <sub>10</sub>	6.25 d, J= 11.5	6.26 d, J= 11.1
H-C <sub>11</sub>	5.99	5.97

En las fracciones de mediana polaridad se encontró presente, como componente mayoritario, el compuesto **16**. Los datos espectroscópicos a partir de los cuales se determinó su identidad, se mencionan a continuación.

En el espectro de IR (espectro 10) se observa una señal en  $3531\text{ cm}^{-1}$  que indica la presencia de el grupo oxhidrilo, la señal en  $1724\text{ cm}^{-1}$  es característica para un carbonilo, se observan además señales entre  $1000\text{--}1310\text{ cm}^{-1}$  correspondientes, presumiblemente a un grupo éter ya que se observan señales en  $1128$  y  $1074\text{ cm}^{-1}$  (de C-O). Sin embargo, el trazo del espectro de IR entre  $3530$  y  $2700\text{ cm}^{-1}$  como una banda amplia, es indicativo de un hidroxilo de un grupo carboxilo. De modo que los grupos funcionales presentes en la molécula, descritos hasta el momento son: éter, alcohol, y un carboxilo.

En RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, espectro 11) se observan claramente hidrógenos que resuenan en la región de los compuestos aromáticos. Tres señales, que integran para un hidrógeno cada una, se observan en  $\delta$  7.580, 7.555 y 6.895. Adicionalmente a éstas señales de protones aromáticos, únicamente se observan los hidrógenos correspondientes a un metoxilo.

En el espectro de masas (espectro 11) se observa el ión molecular m/e 168, este dato permite establecer una fórmula molecular, tomando en consideración los siguientes datos:

- Es un compuesto con tres hidrógenos aromáticos, presumiblemente bencénicos, de acuerdo a los datos de RMN<sup>1</sup>H.

- Uno de los sustituyentes del anillo bencénico es un metoxilo, y el otro, por lo tanto, es un grupo carboxilo, deducido por el espectro de IR.

Si consideramos un ácido benzoico sustituido con un grupo metoxilo se explican 152 unidades m/z, por lo que se deduce que el sustituyente adicional, solo puede ser un hidroxilo. Se tiene así la fórmula molecular

mínima  $C_8H_8O_4$ . Esta sustancia es, por lo tanto un ácido benzóico sustituido en el anillo aromático con un hidroxilo y un metoxilo (figura 20).

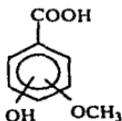


Figura 20.-Formula parcial de 16

Las constantes de acoplamiento observadas para los hidrógenos aromáticos (Tabla 10) establecen un sistema ABC (figura 21), donde  $H_A$  presenta dos constantes de acoplamiento, la más grande (8.1 Hz) corresponde a un acoplamiento *orto*, y la menor (1.8 Hz) corresponde a un acoplamiento *meta*.  $H_C$  presenta acoplamiento *orto*. Finalmente  $H_B$  se manifiesta como un doblete con acoplamiento *meta* (figura 22 y 23).

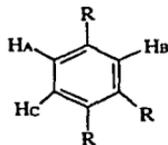
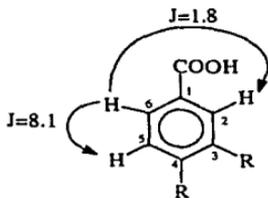


Figura 21.- Sistema ABC



**VII. CONCLUSIONES Y  
COROLARIO**

Figura 22.- Acoplamientos observados en 16

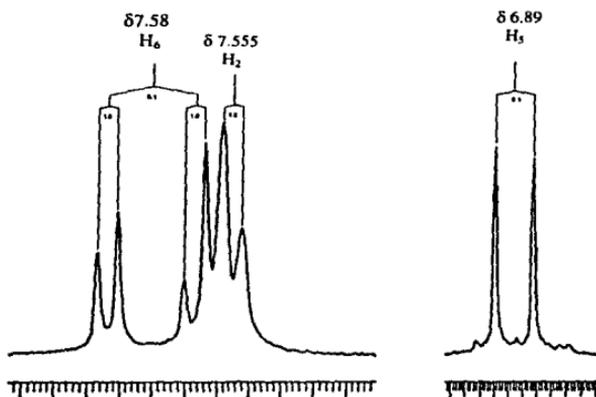


Figura 23.- Análisis de las señales de los hidrógenos aromáticos de 16.

Tabla 10.- Datos de RMN<sup>1</sup>H (300 Hz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido Valnílico (16)

Asignación	$\delta$
$H_5$	7.580, J= 8.1, 1.8
$H_2$	7.555q, J=1.8
$H_6$	6.895, d, J=8.1
OCH <sub>3</sub>	3.95, s

Existen seis isómeros del ácido benzoico que están de acuerdo con el patrón de sustitución observado. Estos isómeros se ilustran en la figura 24.

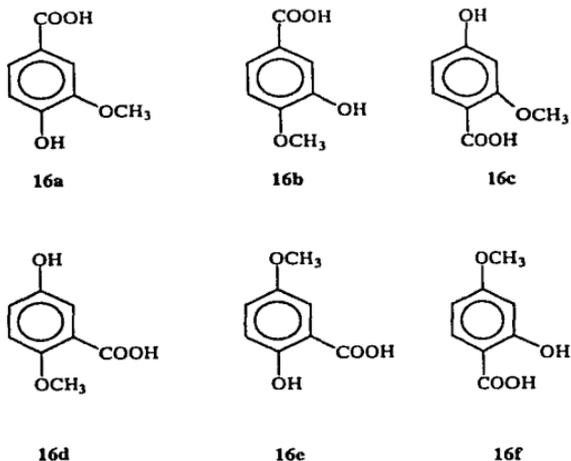


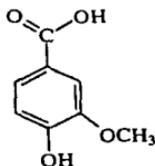
Figura 24.- Isómeros del ácido benzoico con sustitución 1,3,4, que producen un sistema ABC en RMN<sup>1</sup>H.

Para discernir entre los seis posibles regioisómeros, se considerarán las siguientes características:

- Dos hidrógenos están desprotegidos ( $H_A$  y  $H_B$ ), lo cual es indicativo de que deben estar en posiciones *orto* y/o *para* al carboxilo.
- El doblete a campo alto, debe corresponder a  $H_C$ , lo que indica que se encuentra en posición *orto* o *para* a grupos electrodonadores ( $CH_3$ ,  $OH$ ).

Estos requerimientos, se satisfacen en las fórmulas **16a** y **16b**, las cuales, precisamente presentan el patrón de acoplamiento observado.

Mediante la comparación de los datos obtenidos en RMN<sup>1</sup>H y datos informados en la literatura, es posible concluir que ésta sustancia corresponde al ácido vainílico (16). La tabla 11 presenta una comparación de los datos obtenidos experimentalmente y los informados para ésta sustancia.



(16) Ácido Vainílico

Comparación de señales obtenidas en RMN<sup>1</sup>H con las reportadas para el ácido vainílico. Tabla 11

Asignación	$\delta$ (300 MHz) <sup>a</sup>	$\delta$ (200 MHz) <sup>b</sup>
H <sub>6</sub>	7.580	7.67
H <sub>2</sub>	7.555	7.59
H <sub>5</sub>	6.895	7.00
OCH <sub>3</sub>	3.920	3.92

Esta comparación permite concluir que el ácido vainílico es un constituyente de *Taxus globosa*.

## VIII. ESPECTROS

El estudio químico de los constituyentes mayoritarios presentes en la corteza de un individuo de *Taxus globosa* colectado en Chiapas, permitió el aislamiento y caracterización de la estructura molecular de  $\beta$ -sitosterol (13), un glicósido de  $\beta$ -sitosterol (14), un peracetil taxano, identificado como 7 $\beta$ -acetoxitaxusina (15), previamente encontrado en otras especies de *Taxus* (Halsall 1969, Yang 1996), y ácido vainílico (16).

La presencia del peracetil taxano (15) reviste notable interés, debido a la importancia terapéutica como agentes anticancerígenos de este tipo de sustancias, como se ha descrito sucintamente en la introducción del presente trabajo. Sin embargo, la abundancia relativa de 7 $\beta$ -acetoxitaxusina (15) presente en *Taxus globosa* es de aproximadamente  $9.1 \times 10^{-4}$  %, por lo que difícilmente puede considerarse la corteza de este vegetal como fuente viable de taxanos como materia prima para semisíntesis de otros compuestos de interés terapéutico.

Por otro lado, la ausencia del oxetano en C(4)-C(20) en 15, el cual es considerado como una de las partes farmacofóricas en taxanos de utilidad terapéutica, permite suponer una menor actividad anticancerígena de 15 con respecto al taxol (4).

La producción de metabolitos secundarios, como una respuesta a las condiciones ecológicas, es un proceso dependiente a diferentes fuentes de variación, como está ampliamente documentado en la literatura. Es importante la determinación e influencia de tales fuentes de variación, así como de la fisiología de la especie; sobre todo si se pretende optimizar la producción de éstas sustancias.

Dentro de las fuentes de variación en la producción de los metabolitos secundarios se encuentran factores interpoblacionales e intrapoblacionales. Los primeros se explican directamente por las variaciones geográficas que se pueden

presentar en diferentes poblaciones, y específicamente considerando la distribución de *Taxus globosa* en nuestro país es predecible una amplia variación en diferentes especies de *Taxus*. Dentro de los segundos, pueden mencionarse las variaciones ontológicas, donde la producción de los metabolitos es dependiente de la etapa de desarrollo del organismo y las fenológicas, donde se analiza los eventos bióticos periódicos en relación a diversas variantes. A nivel individuo se puede observar una distribución diferencial de los metabolitos en los diversos tejidos.

Si se considera que la producción de los metabolitos secundarios es una respuesta a las condiciones ecológicas, la variación de éstas reflejará cambios en la producción de los metabolitos. En particular, se han realizado estudios donde se pone en evidencia la variación en la concentración de ciertos taxanos presentes en *Taxus brevifolia* durante diferentes épocas del año (Vance 1993). Resulta aconsejable, por lo tanto, determinar las variaciones ontológicas y fenológicas en el tejo mexicano.

Para la realización de todos los estudios anteriormente descritos, se requieren técnicas muy sensibles de detección de constituyentes químicos específicos. La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con espectrometría de masas (CLAR/EM) han sido empleadas recientemente de manera rutinaria para la detección de taxanos (Kerns 1994, Hoke 1994). Otras técnicas, tales como las reacciones con anticuerpos monoclonales se han desarrollado para la detección y cuantificación de taxanos (Stierle 1995).

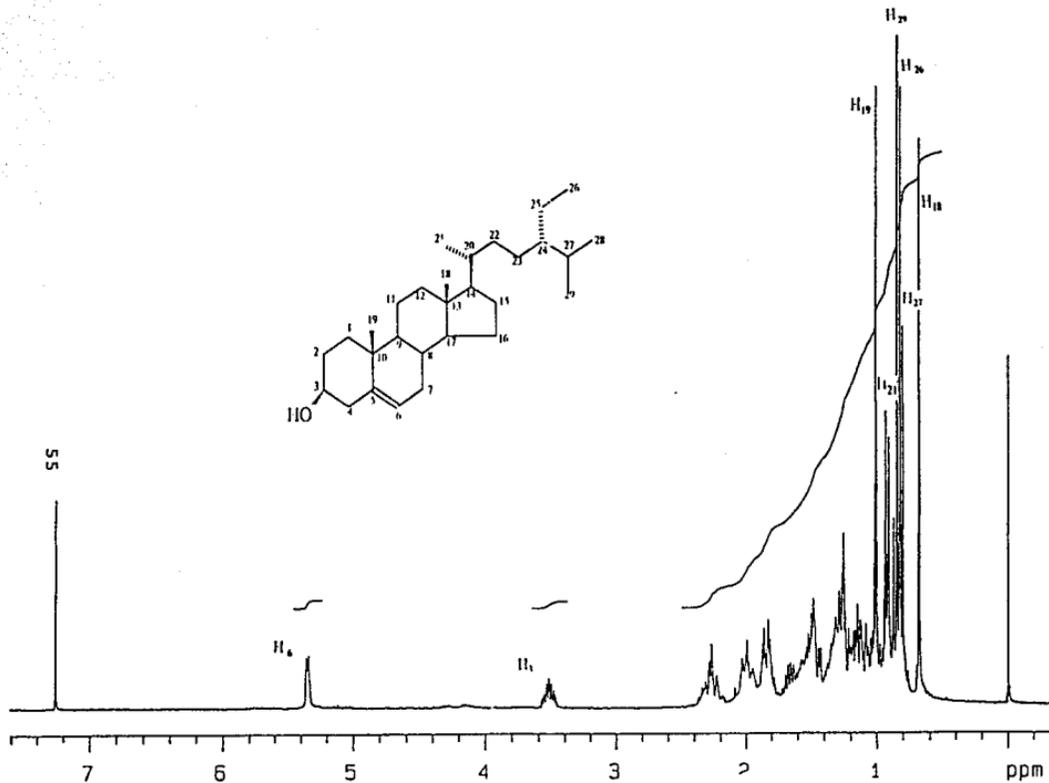
Respecto al suministro de taxol (4), se ha descubierto recientemente que existen microorganismos asociados a *Taxus brevifolia* capaces de biosintetizar ésta sustancia. El hongo *Taxomyces andreae*, el cual se aisló de la parte interna de la corteza de *T. brevifolia*, se considera un microorganismo promisorio en este sentido, por lo que estas fuentes representan una alternativa más viable como fuente de taxol y análogos estructurales (Stierle 1995). Es importante la

Identificación y el estudio de los metabolitos secundarios de los hongos endofíticos presentes en *Taxus globosa*, ya que el estudio de la corteza sólo proporcionó una pequeña cantidad de taxanos, como se describe en el presente trabajo.

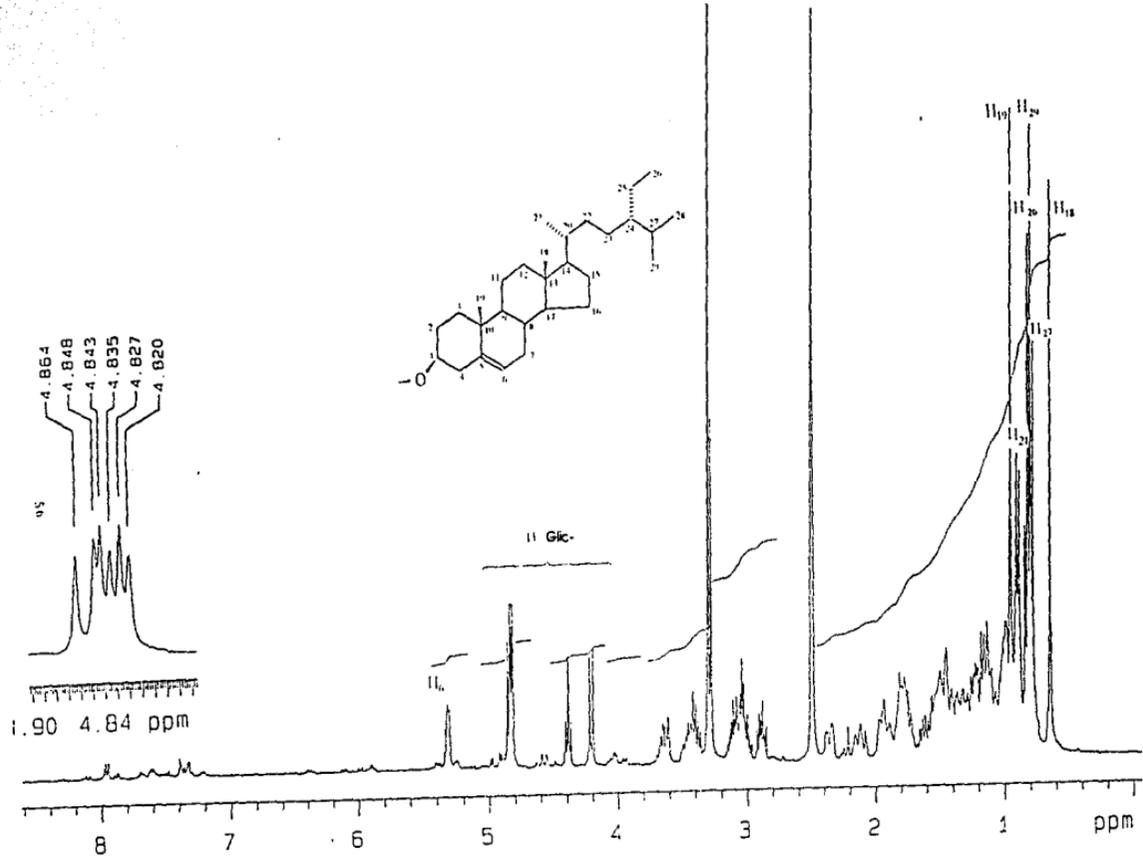
Recientemente ha surgido la cuestión referente a la convergencia en el metabolismo en las plantas superiores (Taxaceae) y los microorganismos endofíticos (hongos). Actualmente no existen evidencias que determinen la etiología química de los taxanos, ya que presumiblemente puede suceder una transmisión genética horizontal, o puede tratarse de un proceso de convergencia metabólica, o bien, exista otro fenómeno de Interacción biológica.

Estudios recientes sobre la biosíntesis de taxol (4), han demostrado que éste diterpeno no proviene de la ruta del ácido mevalónico (como sucede en los terpenoides de las plantas superiores), sino de una ruta del ácido acético, que puede considerarse análoga a la biosíntesis de terpenos en eubacterias (Eisenreich 1996, Rohmer 1993).

El conocimiento generado en el presente trabajo permitió cubrir ampliamente los objetivos planteados, y con estos resultados se han creado bases y fundamentos para el diseño de estudios posteriores.

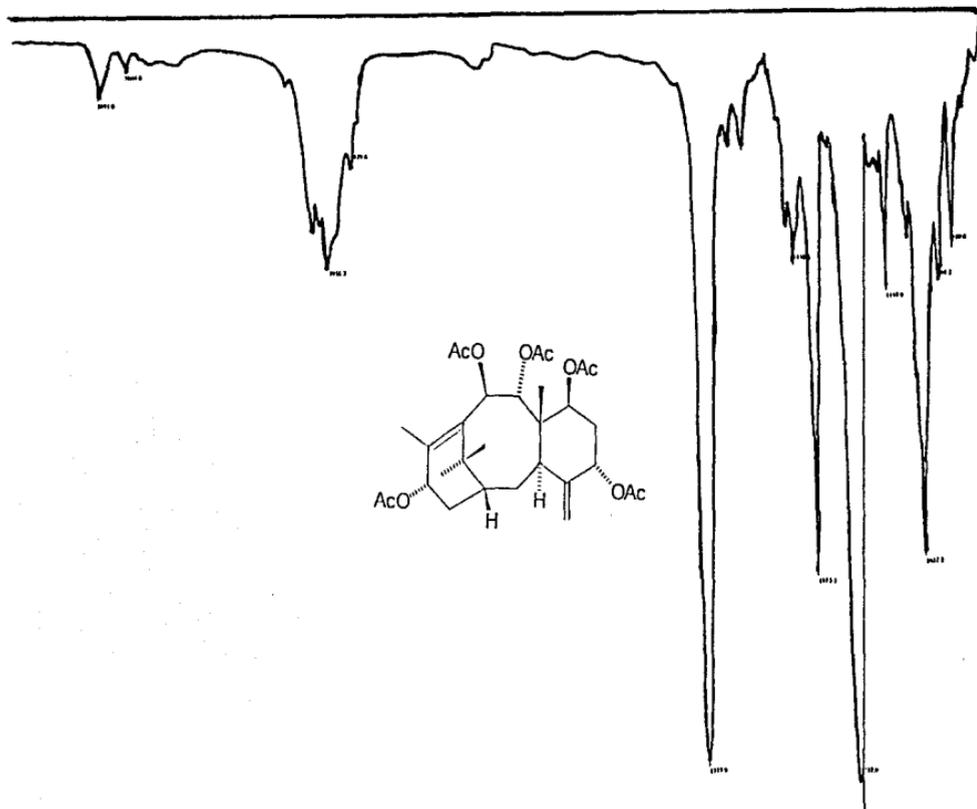


Espectro 1 RMN $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO)  $\beta$ -sitosterol (13)

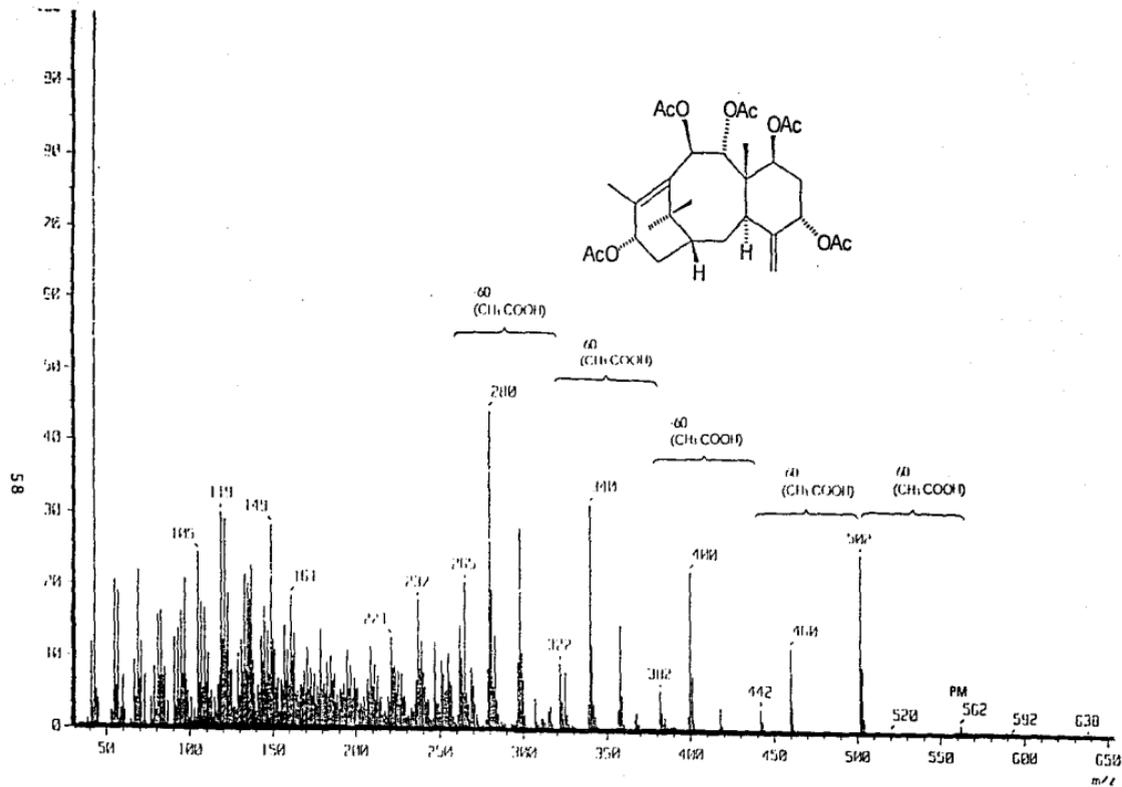


Espectro 2 RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO)

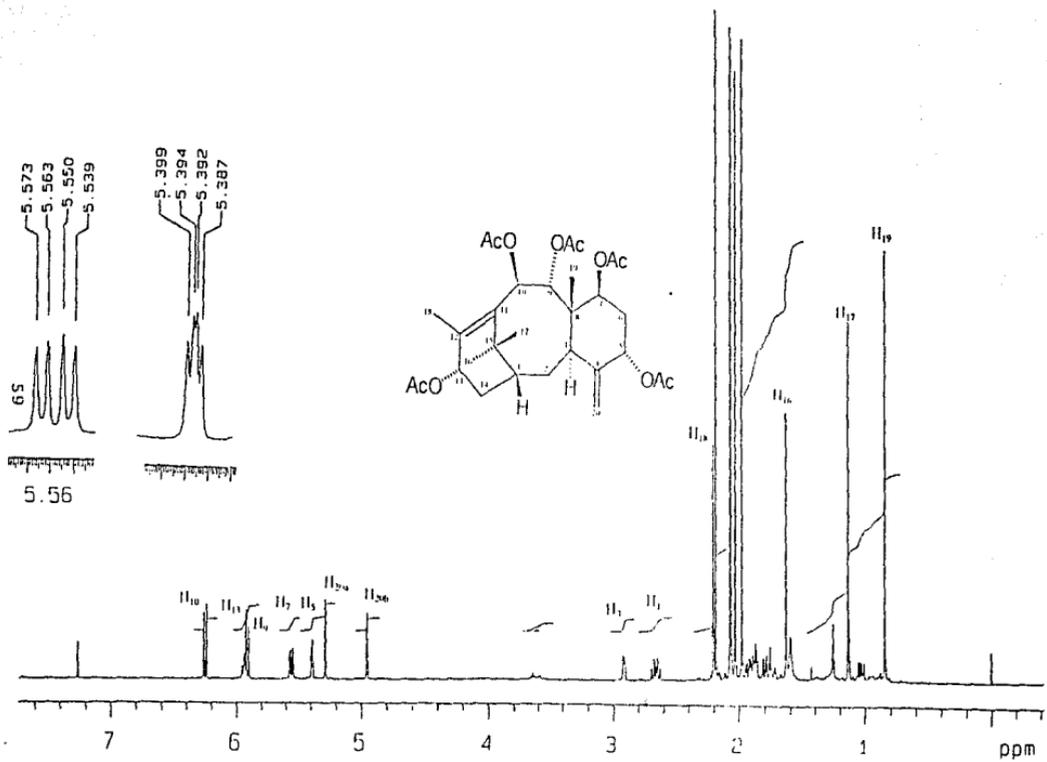
Glicósido de β-sitosterol (14)



Espectro 3 IR 7β-Acetoxy taxusina (15)

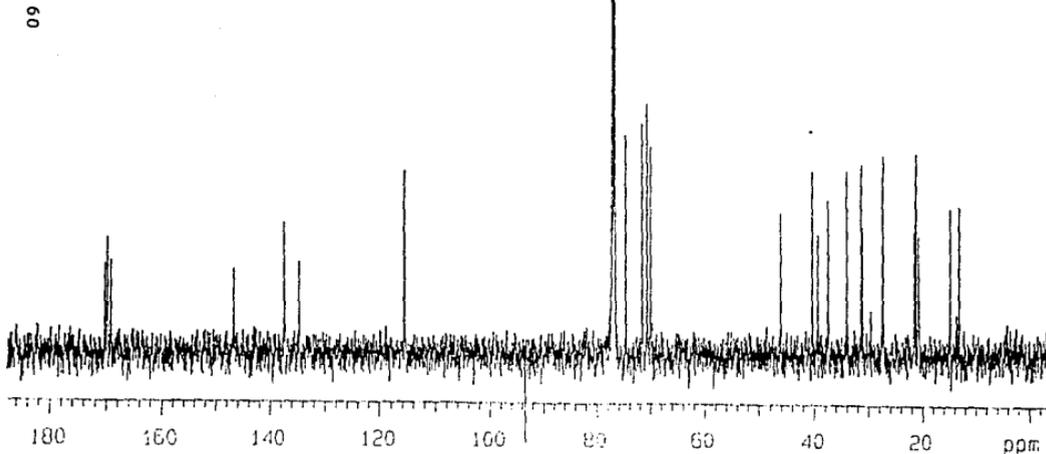
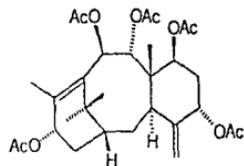


Espectro 4 EM 7β-Acetoxy taxusina (15)

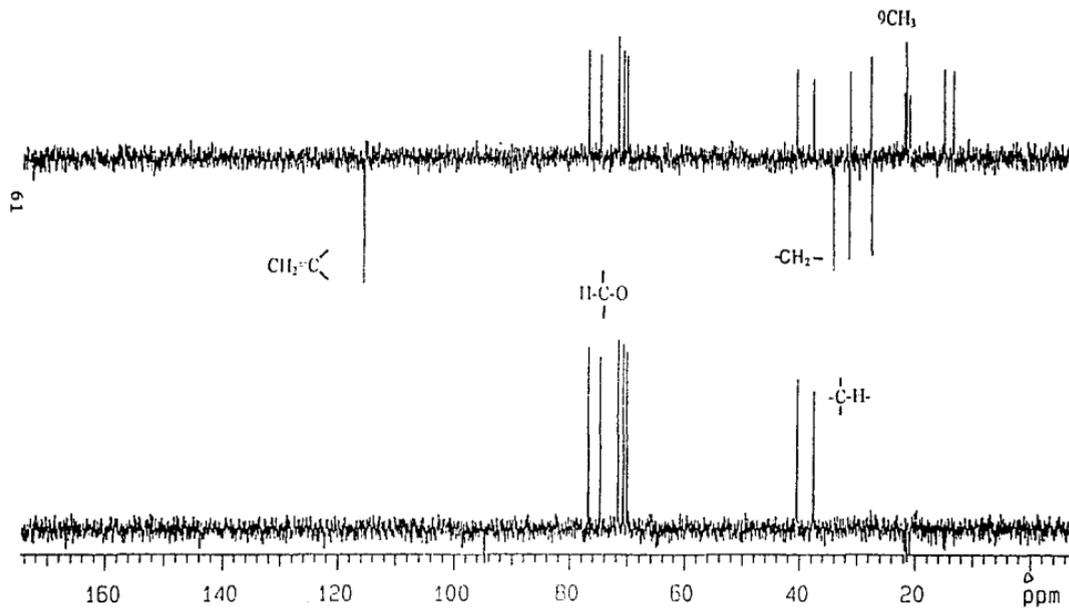
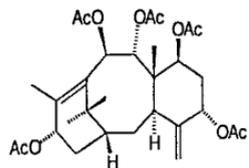


Espectro 5 <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7β-Acetoxy taxusina (15)

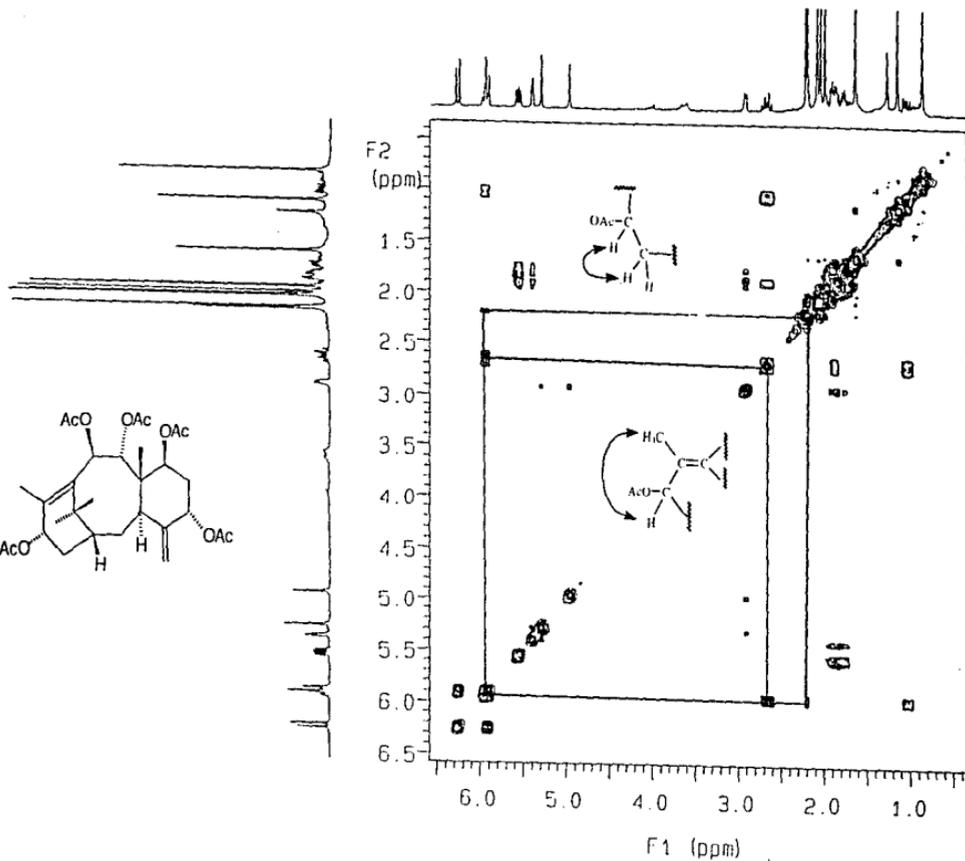
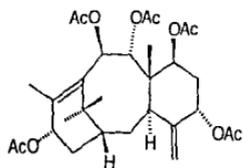
13.29	q	40.40	d	134.54	s
14.94	q	46.18	s	137.40	s
27.36	q	70.11	d	146.78	s
27.55	t	71.67	s	169.20	s
31.16	q	71.76	d	169.80	s
31.41	t	74.77	d	169.82	s
34.13	t	76.84	d	170.25	s
37.60	d	115.66	t	170.41	s
39.45	s				



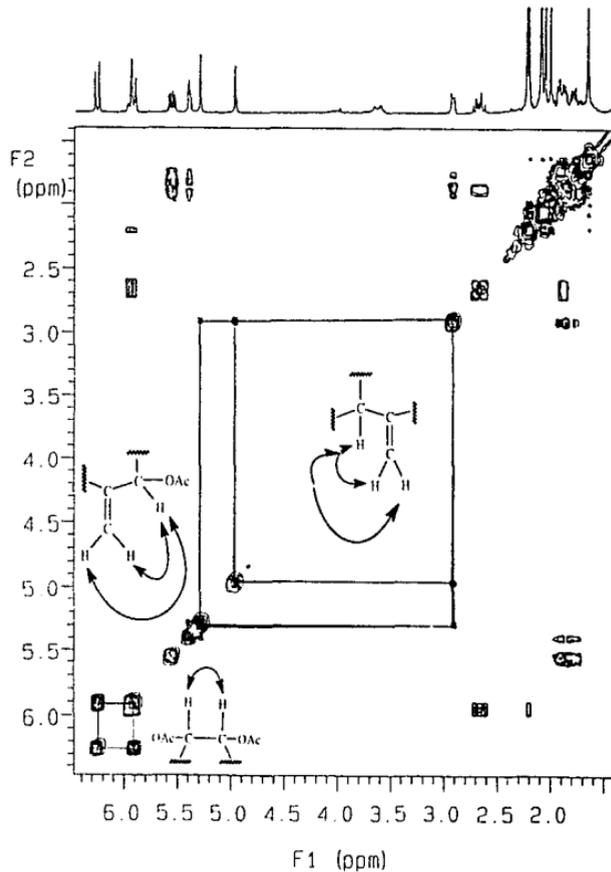
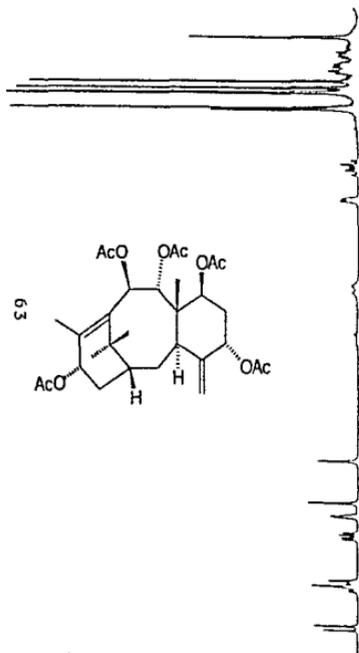
Espectro 6 RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7β-Acetoxy taxusina (15)



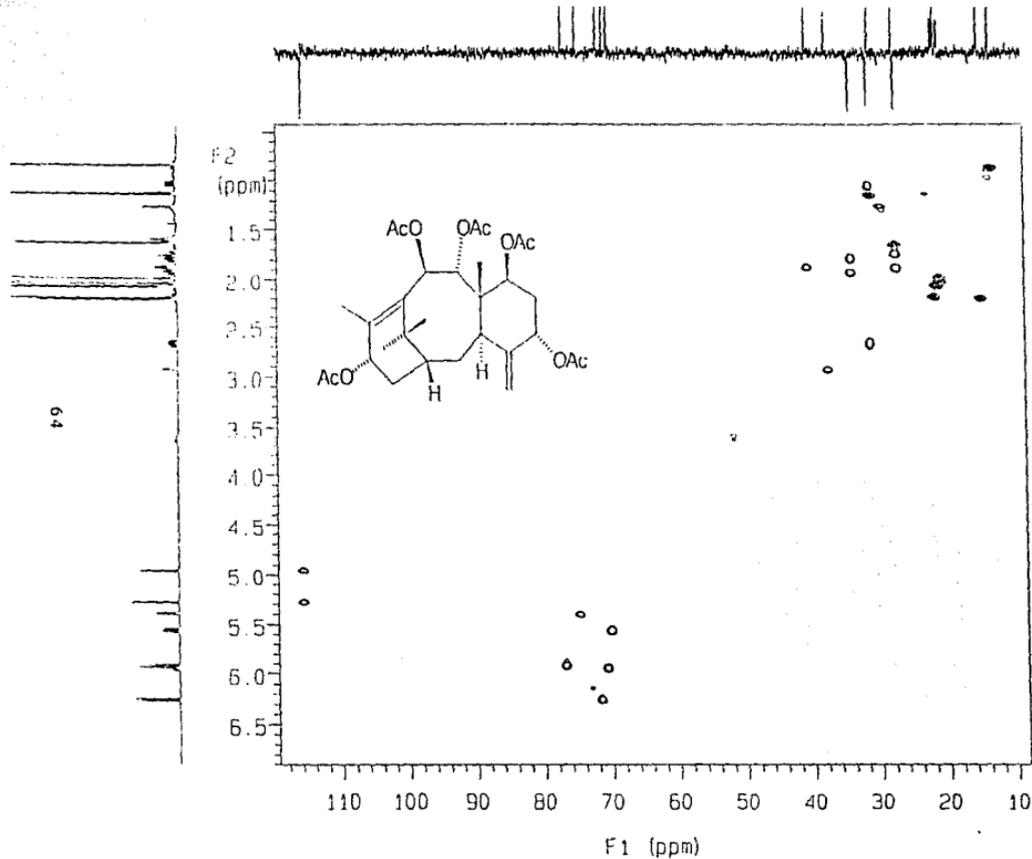
Espectro 7 RMN<sup>13</sup>C DEPT (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7β-Acetoxy taxusina (15)



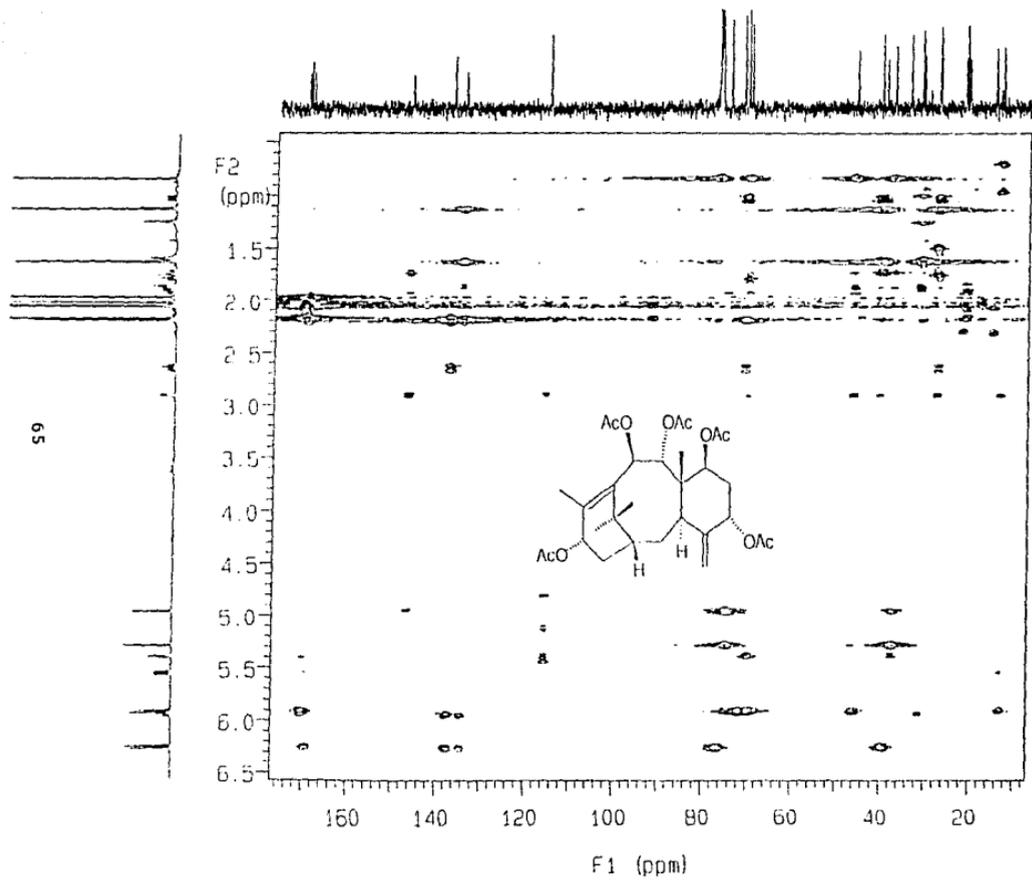
Espectro 8a.- RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) COSY 7β-Acetoxy taxusina (15).



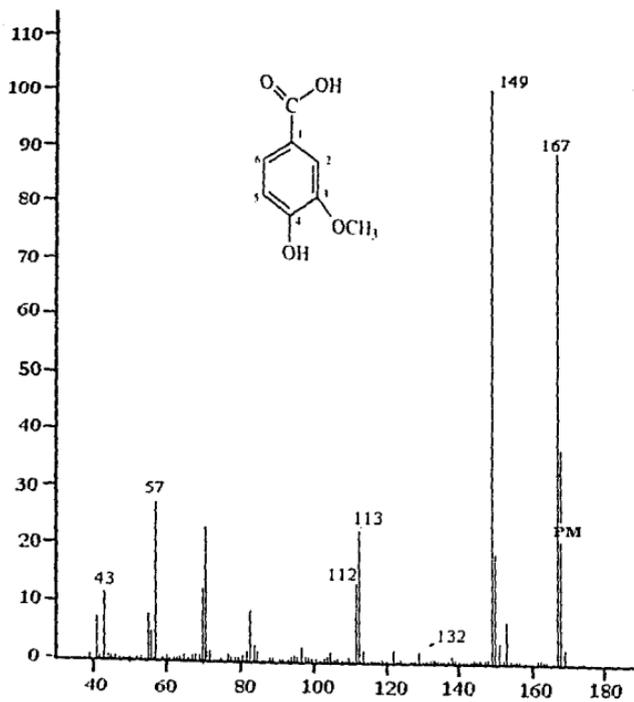
Espectro 8b. - RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) COSY 7β-Acetoxy taxusina (15).



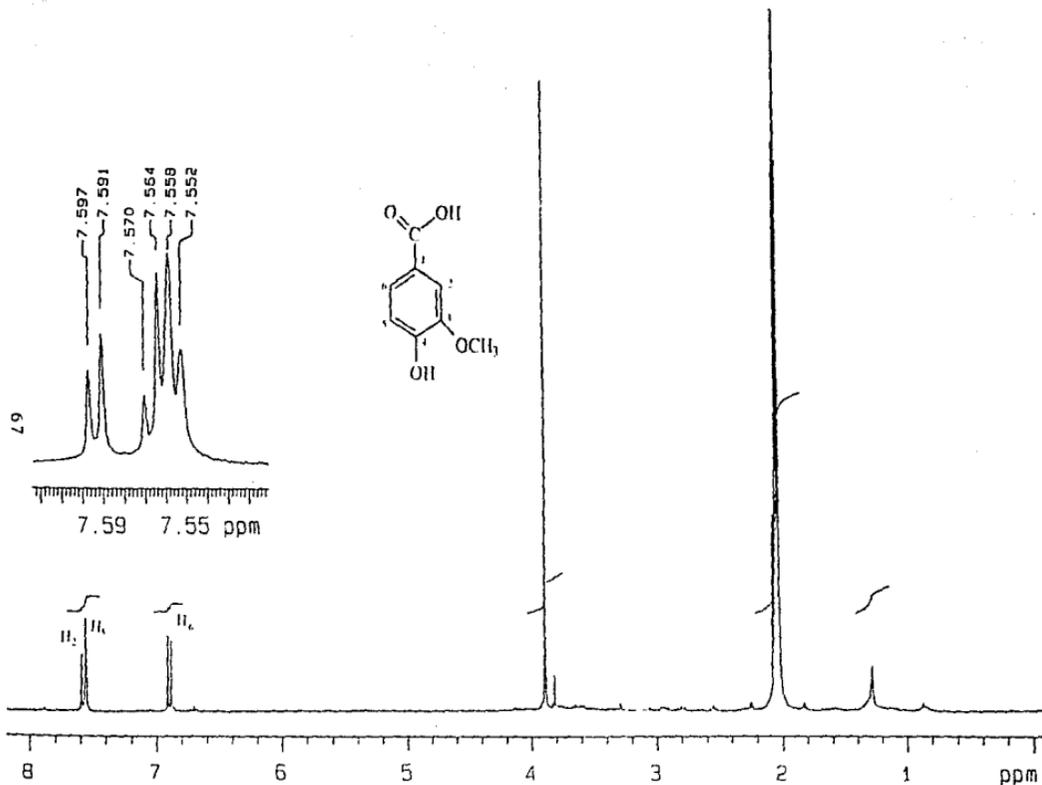
Espectro 8c HMQC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7β-Acetoxy taxusina (15)



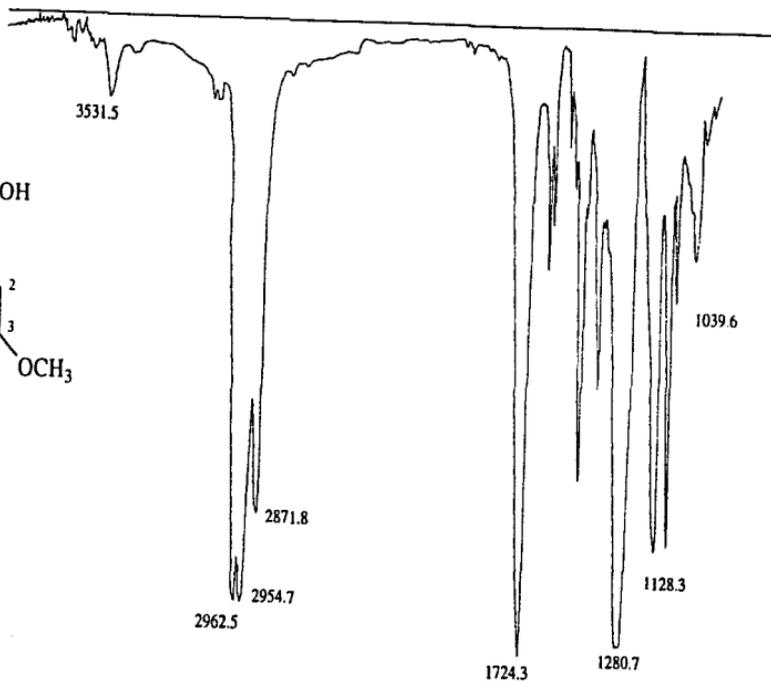
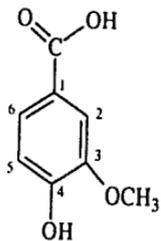
Espectro 8d HMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7β-Acetoxy taxusina (15)



Espectro 11 EM Ácido Vanillico (16)



Espectro  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, Acetona) Ácido Vanílico (16)



Espectro 9 IR Acido Vanillico (16)

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alzard, J., Millet-Pallison, C., Guénard, D., Thal, C., Composés Interagissant avec la tubuline. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1996**, 133, 251
- Appendino, G., Taxol (Paclitaxel) Historical and Ecological Aspects. *Fitoterapia* **1993**, 64, 1
- Boyd, M.S. Current Therapy in Oncology: The Future of New Drug Development. **1992**. De. JE Nelderhuber. pp. 11-22
- Chen, S., Fairchild C., and Long, B. Synthesis and Biological Evaluation of Novel C-4 Aziridine-Bearing Paclitaxel (Taxol) Analogs. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2263
- Coll, J. C and Bowden B.F., The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 934.
- Cragg, G. M., Boyd, R.M., Cardelina, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M. and McCloud, T.G. *Ethnobotany and Drugs Discovery: The Experience of the US National Cancer Institute. Ethnobotany and the Search for New Drugs.* **1994**. Ciba Foundation Series, pp 178.
- Cragg, G. M., Schepartz, S.A., Suffnes, M., Grever, M.R., The Taxol Supply Crisis. New Policies for Handling the Large Scale Production of Novel Natural Product Anticancer and Anti-VIH Agents. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 1657
- Delgado, G. Organic Natural Products from some Medicinal Plants: Bioactivity and Chemical Reactivity. *Rev.Latinoam. Quim.* **1996**, 24, 37
- Delgado, G., Bioactive Constituents of Some Mexican Medicinal Compositae. Proceedings of the Int. Compositae Conference, Kew. **1994** 2, 505
- Delgado G. **1997**. Comunicación personal con el Prof. Robert Nicholson, Smith College, Northampton, Massachussets, E.U.

- Eisenreich, W., Menhard, B., Hylands, P., Zenk, M. And Bacher, A. Studies on the Biosynthesis of Taxol: The Taxane Carbon Skeleton Is not of Mevalonoid Origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1996**, *93*, 6431
- Fernández R.M. Neoplasias en México. **1983**. *Salud Pública de México*, *SSA* 25:3
- Halsall, T.G., Della Casa de Marcano, P. The Isolation of Seven New Taxane Derivatives from the Heartwood of Yew (*Taxus baccata* L.). *Chem. Comm.* **1969**, 1282.
- Hils, N.M., *Flora of North America*. V2. *Pteridophytes and Gymnosperm*. Flora of North America Ed. Committee **1993**.
- Hikino, H. Wagner, H. And Farnsworth, N. R. Eds. *Economic and Medicinal Plant Research*. **1989**. Academic Press, London, V 3.
- Hoke II, S.H., Cooks, G.R., Chang, CH., Kelly, C.R., Qualls, S.J., Alvarado, B., McGuirre, T.M., Snader, K.M. Determination of Taxanes in *Taxus brevifolia* Extracts by Tandem Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 277.
- Holton R.A., Somoza, C., Kim, H., Liang, F., Biediger, R.J., Boatman, P.D., Shindo, M., Smith, C.C., Kim, S.C., Nadizadeh, H., Suzuki, Y., Tao, P., Vu, V., Tang, S.H., Zhang, P., Murthi, K.K., Gentile, L.N. and Liu, J.H. Total Synthesis of Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597.
- Horwitz, S., Schiff, P., Fant.L. Promotion of Microtubule Assembly *in vitro* by Taxol. *Nature* **1979**, *277*, 665
- Kerns, E.H., Volk, K.J., Hill, S.E. Profiling Taxanes in *Taxus* Extracts Using LC/MS and LC/MS/MS Techniques. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1391.
- Kingston, D.G. Sorties and Surprises Unexpected Reactions of Taxol. *Rev. Latinoam. Quim.* **1996**, *24*, 69.

- Kingston, D.G., Molinero, A.A., Rimoldi, J.M. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1993** Springer-Verlag, New York.
- Klein, L., Li, L., Maring, C.J., Yeung, C.M., Thomas, S.A., Grampovnik, D.J., and Plattner, J.J. Antitumor Activity of 9(R)-Dihydrotaxane Analogs. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1482
- Mata, R. y Delgado G., Química de Productos Naturales Orgánicos. Química en México. Edición de la Facultad de Química, UNAM. **1991**. pp 419
- Nicolaou, K.C., Dal, W. And Guy, R.K., Chemistry and Biology of Taxol. *Angew. Chem. Int Ed. Engl.* **1994**, *33*,15
- Nicolaou, K.C., Yang, Z., Liu, J., Nantermet, G., Guy, R.K., Claiborne, F., Renaud, J., Coulaudourus, A., Paulvannan, K., and Sorensen, J. Total Synthesis of Taxol. *Nature* **1994**, *317*. 630
- Ora, Z. L., Nedeá, M.E., Zhou, Z., Caron, G. Sauriol, F., Mamer, O. Isolation and Semi-synthesis of a Bioactive Taxane from *Taxus canadensis*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 803
- Rushford, K., *Conifers*. **1987**. Fact on File Publications. Britain.
- Rzedowsky, J. *Vegetación de México*. **1978**. Ed. Limusa, México 431 pp.
- Rhomer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. And Sahm, H. Isoprenoid Biosynthesis In Bacteria: A Novel Pathway For The Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate. *Biochem.* **1993**, *295*, 517.
- Stierle, A. and Strobel, G. The Search for a Taxol-producing Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat Prod.* **1995**, *58*, 1315.
- Vance, N.C., Kesley, R.G. and Sabin, E. T. Seasonal and Tissue Variation in Taxane Concentrations of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry* **1993**, *36*, 1241.

- Wall, M.E. and Wani, M.C. Taxol: Discovery to Clinic. Economic and Medicinal Plant Research. Vol. 6. Pp 299 (Wagner, H. And Farnsworth, N.R., Eds.) Academic Press 1994.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T., Plant Antitumor Agents VI: The Isolation and Structure of Taxol, a novel Antileukemic and Antitumor Agent From *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 93, 2325.
- Yang, S.J., Fang, J.M. and Cheng, Y.S. Taxanes From *Taxus mairei* *Phytochemistry* 1996, 43, 839.
- Zamudio, R.S., *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Fasc. 9. Fam. Taxaceae. Inst. Ecol. A.C. Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán México 1992.