



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

METABOLITOS SECUNDARIOS DEL TEJO
MEXICANO
(T. globosa. Schlecht)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ROSA MARIA HERRERA ARRIAGA



MEXICO, D. F.

258461

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

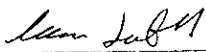
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

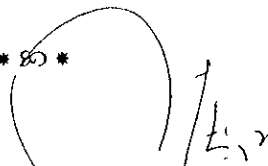
JURADO ASIGNADO	
Presidente	Prof. Aguilar Laurens Ma. Isabel
Vocal	Prof. Soto Hernández R. Marcos
Secretario	Prof. Lira Rocha Alfonso Sebastian
1er. Suplente	Prof. Pereda Miranda Rogelio Gregorio
2do. Suplente	Prof. Duarte Lisci Georgina Artemisa

* ❧ * ❧ ☆ ❧ * ❧ *

Este trabajo se desarrolló en el Instituto de Recursos Naturales, Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados y en el Instituto de Química, área de Productos Naturales, UNAM.

* ❧ * ❧ ☆ ❧ * ❧ *


 Dr. R. Marcos Soto Hernández
 (asesor)


 Dr. Mariano Martínez Vázquez
 (supervisor técnico)


 Rosa Ma. Herrera Arriaga
 (sustentante)

DEDICATORIAS

A Dios

Quiero agradecerte por estar siempre a mi lado y por permitirme llegar a este momento tan preciado de la vida conservando a mi familia y a toda la gente que quiero, sinceramente gracias.

A mis Padres

Gracias Papà por el apoyo y el cariño que siempre me has brindado, realmente no hay más palabras para agradecerte este regalo que gracias a ti hoy tengo.
Gracias Mamà por tu apoyo, cariño y comprensión que siempre has tenido conmigo, mamá quiero decirte que eres una mujer excepcional y que gracias a ti he llegado a este momento tan importante para mí.

A mis Hermanos

Gracias por estar cerca de mí en el trayecto que hasta hoy llevo, ojalá siempre sigamos unidos y apoyándonos y con ese carácter propio de nosotros.

A mis Profesores

Gracias por la enseñanza y el apoyo que recibí de todos aquellos profesores que estuvieron en el trayecto de mis estudios, en especial a la profesora Bertha Contreras y a la profesora Socorro Alpizar por el apoyo y comprensión que me brindaron.

A mis Asesores

Gracias al Dr. Marcos Soto H. por su apoyo y la paciencia que tuvo para la realización de este trabajo.
Gracias al Dr. Mariano Martínez V. por el apoyo y la enseñanza brindada en la realización de este trabajo

A mis Amigos

Elizabeth, tengo tanto que agradecerte que no me alcanzaria el papel, gracias por estar siempre conmigo en cualquier momento, por tus consejos, comprensión y apoyo.

Le doy gracias a Dios por mandarme una amiga como tú.

Angel, quiero agradecerte el apoyo y los ratos maravillosos que pasamos juntos y aunque ahora son pocos los momentos que compartimos siguen siendo gratos por que nuestra amistad sigue siendo la misma que el primer día en que nos conocimos.

Alejandro, quiero agradecer a Dios que te haya puesto en mi camino realmente eres un amigo tan especial y excepcional que pocas personas pueden conservar. Ojalà que los momentos que hemos compartido hasta ahora sirvan para seguir cultivando nuestra amistad.

Juan Carlos, gracias por los momentos que compartimos, nunca los olvidaré, espero que siempre recuerdes nuestra amistad y no por que ya seas casado te olvides de tus verdaderos amigos.

Luz del Carmen, le agradezco a Dios el darme una amiga como tú, aunque nuestras vidas hayan tomado caminos distintos, son hermosos los regalos que nos ha dado entre ellos la amistad que nos une hasta hoy, ojalà siempre sigas siendo la misma.

Norma, gracias por la amistad que siempre me has brindado, ojalà que los momentos que pasamos juntas nunca se olviden y que nuestra amistad siga adelante como hasta hoy.

Bruno y Lotario, aunque el tiempo haya pasado, quiero decirles que para mi siguen siendo los mismos amigos que un día conocí, es bueno saber que hoy nuestra amistad sigue viva.

Alejandro H., Efrain, Sobeida, Mario, gracias por su amistad; aunque ahora el tiempo ha pasado estoy segura que recordamos con gusto todos aquellos momentos que nos unieron.

Soledad, Guadalupe Veronica Saavedra, Veronica y Ruben, Araceli, Lupita Rangel, Quiero agradecerles por estar siempre conmigo, por sus consejos ojalà nunca cambien y que la amistad que un día comenzamos siga brillando. Han sido tantos los momentos que hemos compartido que nunca terminaria de recordar, gracias por haberme elegido su amiga.

*Adriana, Lupita y Rosaura, gracias por la amistad que hasta hoy nos une, ojalá
nunca cambien.*

*Anita, Mary, Benjamin, Maru, Memo, quiero agradecerles por el apoyo y consejos y
más aun por hacerme participe de su equipo, gracias por su amistad.*

*Gracias a todas aquellas personas que contribuyeron para la realización de este
trabajo, en especial a la M. C. Tere y al Sr. Jorge por el apoyo que me brindaron.*

•

ÍNDICE

Índice.....	I
Lista de abreviaciones.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
I. ANTECEDENTES	
1. EL ARBOL DEL TEJO	
A. Datos Históricos.....	5
B. Descripción Botánica.....	7
C. Clasificación Taxonómica	8
D. Distribución Geográfica de <i>Taxus globosa</i>	10
2. COMPUESTOS PRESENTES EN EL FOLLAJE DEL TEJO MEXICANO	
A. COMPUESTOS TIPO TAXANO.....	11
A.1. Estructura.....	11
A.2. Biosíntesis (taxol).....	13
A.2.a. Biosíntesis del anillo tricíclico taxano y del anillo oxetano.....	14
A.2.b. Biosíntesis de la cadena lateral.....	18
A.3. Mecanismo de Acción.....	20
A.4. Relación Estructura-Actividad	24

A.5. Aplicaciones Clínicas de Taxol.....	28
A.6. Alternativas de Obtención de Taxol.....	28
B. ESTEROIDES.....	30

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1 Aparatos y Material Químico.....	35
2. Diagrama General de Trabajo.....	36
3. PRIMERA PARTE.....	37
4. SEGUNDA PARTE.....	41

III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

1. 10-Desacetilbaccatina III.....	50
2. O- β -Glucopiranosido del stigmast-5en-3ol y β -Sitosterol.....	55

IV. CONCLUSIONES

V. ESPECTROS

1. 10-Desacetilbaccatina III.....	65
2. O- β -Glucopiranosido del stigmast-5en-3ol.....	74
3. β -Sitosterol.....	79
4. Sustancias no identificadas.....	84
5. Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C de los estándares de 10- desacetilbaccatina y taxol.....	89

VI. BIBLIOGRAFIA

Lista de Abreviaciones

RMN¹H: Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno

RMN¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

IR: Infrarrojo

EMIE: Espectro de Masas Obtenido por Impacto Electrónico

HETCOR: Correlación Heteronuclear

COSY: Resonancia Magnética Homonuclear (¹H) Bidimensional
(Correlate Spectroscopy)

DEPT: Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer

CDCl₃: Cloroformo Deuterado

DMSO: Dimetilsulfoxido

TMS: Tetrametilsilano

CH₂Cl₂: Cloruro de Metileno

MeOH: Metanol

AcOEt: Acetato de Etilo

m/z: Relación masa/carga

DL50: Dosis Letal Media

s: singulete

d: doblete

dd: doble de doble

t: triplete

Mhz: Mega Hertz

Hz: Hertz

ppm: partes por millón

δ : Desplazamiento Químico

FDA: Food and Drug Administration

GTP: Guanosin 5 Trifosfato

PAM'S: Proteínas Asociadas a Microtúbulos

KD: Kilodaltons

nm: nanometro

DNA: Acido Desoxirribonucleico

ng: nanogramos

UV: Ultravioleta

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

31.INTRODUCCIÓN ∞

La necesidad de encontrar más fuentes naturales alternas a *Taxus brevifolia* susceptibles de producir taxol o de algún compuesto análogo nos llevó a desarrollar el presente estudio fitoquímico, el cual se centro principalmente en la búsqueda de taxol así como cefalomanina y 10-desacetilbaccatina III que son también compuestos tipo taxano.

Durante el desarrollo de este trabajo no se descartó la posibilidad de encontrar otro tipo de compuestos que resultaran de interés esto debido a que el metabolismo de plantas comprende diferentes rutas biosintéticas que dan como resultado una gran diversidad de compuestos.

El taxol es un pseudoalcaloide diterpénico cuya estructura tan poco usual dió origen a una nueva clasificación estructural dentro de los diterpenoides, conocida como taxano; se aisló por primera vez de la corteza del Tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* Nutt., y hoy en día también se ha aislado de otras especies de *taxus*. Es importante mencionar que es un compuesto con acción antitumoral al igual que la colchicina y los alcaloides de la vinca; sin embargo, el taxol posee un mecanismo de acción único ya que en vez de prevenir la formación del huso mitótico, promueve su formación al mismo tiempo que lo estabiliza impidiendo de esta manera la mitosis celular. Gracias a su mecanismo de acción tan singular ha resultado ser un fármaco muy útil principalmente en el tratamiento de cáncer ovárico.

Actualmente el taxol ha sido aprobado por la FDA por lo que la sustancia es necesaria en mayores cantidades debido al gran número de pacientes con cáncer, esto ha generado

que se busquen otras fuentes alternas de obtención de la droga ya que la fuente principal que es la corteza del Tejo del Pacífico permite obtener cantidades mínimas (300mg aprox.) siendo necesarios de 4 a 10 árboles para obtener 2g. de taxol para el tratamiento de un paciente por otra parte también existe el problema de descortezado lo que no ha sido aceptado por los grupos ecologistas debido a que le toman 100 años para alcanzar dimensiones adecuadas lo que ha puesto a la especie en peligro de extinción.

Debido a lo anterior, se decidió tomar en cuenta a dos compuestos análogos al taxol que son la cefalomanina y la 10-desacetilbaccatina, que también pertenecen a la familia de los taxanos, y que pueden ser transformados a taxol. Actualmente algunos compuestos con estructura relacionada a la del taxol han cobrado gran interés debido a que se pueden obtener en mayor cantidad y no precisamente de la corteza sino de partes aéreas como el follaje evitando de esta manera la muerte del árbol y propiciando así la conservación de la especie.

Por lo anterior el presente trabajo de investigación, se enfocó principalmente en el estudio fitoquímico del follaje del Tejo Mexicano (*Taxus globosa*) como fuente potencial de taxol y/o algún análogo

OBJETIVO:

Valorar el potencial del follaje del Tejo mexicano *Taxus globosa* como fuente para la obtención de taxol y/o algún análogo.

I. ANTECEDENTES

1. ∞ EL ÁRBOL DEL TEJO ∞

A. DATOS HISTÓRICOS

En la antigüedad Griegos, Romanos, Druidas, la gente indígena de Japón, Rusia, China, Suroeste de Asia, Norte de América e India usaron el árbol del Tejo como propósito medicinal. Los Romanos utilizaron el jugo del Tejo como antídoto para piquete de víbora, además de que también les servía como poción para flechas en sus batallas. Los Chinos lo utilizaron para tratar la artritis. Nativos Americanos prescribieron el extracto de la corteza para muchas enfermedades, incluyendo enfermedades renales, estres digestivo, escorbuto y tuberculosis, también lo emplearon como abortificante.

En 1856 una mezcla alcaloidal llamada taxina fue extraída del Tejo Europeo, desde entonces casi 40 compuestos con estructura similar han sido descubiertos.

A principios de 1960 el National Cancer Institute (NCI) inicio un programa para el descubrimiento de nuevos fármacos con actividad antineoplásica; bajo éste programa, el botánico A. Barclay colectó muestras de la corteza del Tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* Nutt. Estas muestras fueron enviadas por el NCI a Monroe E. Wall y M.C. Wani, químicos del Research Triangle Institute en Carolina del Norte. En 1963 se revisaron las muestras encontrando que el extracto crudo de la corteza mostraba actividad citotóxica contra células leucémicas y acción inhibitoria contra una gran variedad de tumores de ratones. Pero no fue hasta 1969 cuando Wall y Wani lograron aislar el agente activo (taxol) por encontrarse a muy bajas concentraciones (0.02%). Dos años más tarde fue publicada la estructura del taxol, determinada mediante cristalografía de Rayos X. Un estudio de abundancia, distribución y actividad fue llevado a cabo con el Tejo del

Pacífico en 1969. El resultado más importante fue la diferencia en la actividad en las partes que conforman el árbol, por lo que se consideró alta actividad en la corteza, actividad moderada en la raíz y en el follaje.

De más de 110,000 compuestos de 35,000 especies de plantas probadas entre 1960 y 1981, el taxol resultó ser el más interesante, sin embargo, su investigación decayó casi una década, debido a problemas con el suministro del compuesto y a su baja solubilidad en agua para realizar pruebas clínicas, además de que se creía que el taxol era simplemente otro agente desestabilizante de microtúbulos, igual que la colchicina y los alcaloides de la vinca, sin embargo a finales de los 70's se observó que la actividad del taxol era más remarcada en células tumorales de humano que en células tumorales de ratón; esto aunado al gran descubrimiento de Horwitz, quien reportó el mecanismo de acción el cual resultó ser único, ya que en vez de desestabilizar el sistema de microtúbulos lo estabilizaba, impidiendo de esta manera la división celular. Debido a este inusual mecanismo de acción el taxol volvió a tomar interés reanudandose las pruebas clínicas, más tarde fue aprobado por la FDA.

Los datos clínicos sugieren que el taxol tiene efecto antineoplásico en diferentes tipos de cánceres, seno, pulmón, melanoma y principalmente cáncer ovárico. Esto representa un gran avance en cuanto a compuestos anticancerígenos ya que a causa del cáncer de ovario mueren 12,000 mujeres al año de 21,000 afectadas en los Estados Unidos.^{44, 5, 12, 33}

B. Descripción Botánica del árbol del Tejo

Se trata de un árbol bajo o arbusto, perene, de 6 a 12 metros de alto, el tronco tiene 30 a 40 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, la corteza es escamosa, de color café claro, las ramillas son también café y conservan las bases donde se insertaban las hojas que han caído, los renuevos son de color verde claro, las hojas jóvenes se distribuyen en espiral más tarde se distribuyen en forma dística o subdística, son planas, lineares ligeramente falcadas, de 1.59 a 3.5 cm. de largo por 2 a 2.5 mm. de ancho, las hojas maduras presentan un color verde oscuro. Contiene estrobilos masculinos y femeninos los primeros están ubicados en la parte inferior de las ramillas, solitarios o rara vez ubicados en espigas de 2 a 4 formados por 9 a 14 estambres con filamentos cortos, con 3 a 8 sacos polínicos, los femeninos están ubicados en las axilas de las hojas, dispuestos en la parte posterior de las ramas, rodeados por varias brácteas membranosas, verdes con el margen mescarioso. Las semillas son ovoides, de 6 a 7 mm. de largo por 4 mm de ancho, cubiertas parcialmente por un arillo rojo carnososo, maduran el primer año.⁴⁴

El árbol crece en el fondo de cañadas húmedas con bosque mesófilo de montaña, bosque de *Pinus patula*, bosque de *Abies religiosa* con una altitud de 1000-2850 m. y bosque mediano subperinifolio con *Quercus* y *Pinus* que ocupa las laderas entre 1500 y

1500 y 2800m. de altitud. Florece de diciembre a febrero y las semillas maduras se encuentran de septiembre a noviembre. Se distribuye en la Sierra madre Oriental y la Sierra de Juárez de Oaxaca, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Veracruz, Chiapas y Centroamérica.^{12, 44}

C. Clasificación Taxonómica

La familia Taxaceae pertenece al orden de los taxales de la clase corifeópsida, comprende 5 géneros: Amentotaxus, Austrotaxus, Pseudotaxus, Taxus y Torreya.

La clasificación del género Taxus es muy complicada, las diferentes especies son casi indistinguibles morfológicamente y para distinguirlas hay que considerar: la forma y persistencia de escalas en los brotes en el invierno así como la agudeza o nitidez de las hojas.^{44, 34, 12}

El género Taxus es el que muestra mayor interés debido a que tiene una gran trascendencia histórica en cuanto a su uso en la medicina tradicional.

En el cuadro 1 se agrupan las especies del género Taxus, su distribución geográfica y las sinonimias que comprende cada especie.

Cuadro 1

ESPECIES DE TAXUS	DISTRIBUCIÓN	SINONIMIAS
<i>T. baccata</i>	Inglaterra, Europa, Norte de Irán y África	<i>ssp. Cultivadas: Adpresa, Amerfoord, dovastoniana, Nana, Semperaures, Repandens, Washingtonii, Fructo-luteo</i>
<i>T. brevifolia</i>	Sur y Este de Alaska y Norte y Sur de Norteamérica	<i>Taxus baccata var brevifolia</i>
<i>T. cuspidata</i>	Japón y China	<i>Taxus cuspidata var nana</i>
<i>T. yunnanensis</i>	Yunan, Tibet, Este y Norte de la India	
<i>T. chinensis</i>	China	<i>Taxus wallichiana var chinensis</i>
<i>T. globosa</i>	México	<i>Taxus brevifolia var globosa</i>
<i>T. canadiensis</i>	Este de Canadá	
<i>T. willichiana</i>	China, Filipinas	
<i>T. floridana</i>	Florida	<i>Taxus brevifolia var floridana</i>
<i>T. marei</i>	Indonesia	<i>T. celebica, T. speciosa, T. sumatriensis</i>
<i>T. x media</i> *	-----	<i>T. baccata x T. cuspidata</i>
<i>T. x hunnewelliana</i> *	-----	<i>T. canadiensis x T. cuspidata</i>

*Indica que son especies híbridas

Las diferencias entre las especies no son fácilmente apreciables por lo que hay una creciente tendencia a considerar a los diferentes Tejos como especies individuales, descendientes del *Paleotaxus rediviva*, una angiosperma fósil que abundó en el triásico hace 2000 millones de años y que más tarde fue confinada a zonas templadas del hemisferio norte durante las diferentes glaciaciones.

Hay que mencionar que la clasificación también se complica por la existencia de variedades cultivadas (cerca de 100 sólo para *Taxus baccata*).¹²

D. Distribución Geográfica de *Taxus globosa*

La distribución del género *Taxus* se restringe al hemisferio Norte, en México sólo se registra la existencia de una especie: *Taxus globosa* (ver cuadro 1).

Las relaciones de la flora de las zonas montañosas mexicanas con las del Este de Norteamérica han sido de gran interés para los botánicos, debido a la naturaleza discontinua de la distribución geográfica de los elementos que establecen ésta afinidad, por lo general son especies más o menos ampliamente extendidas a través del bosque caducifolio del oriente de Estados Unidos. En México aparecen en forma esporádica en los sitios más húmedos de las cadenas montañosas, son frecuentes pero 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.^{44,12}

2. COMPUESTOS PRESENTES EN EL FOLLAJE DEL TEJO

Entre las sustancias que se derivan del árbol del Tejo se encuentran los compuestos diterpénicos tipo taxano a los cuales pertenece el taxol, sustancia que ha tomado importancia por su acción antitumoral.

Otro grupo de sustancias también derivadas del metabolismo secundario son los esteroides y aunque no existen antecedentes de su presencia se hace importante mencionarlos por la actividad biológica que presentan, antiinflamatoria principalmente.

A. COMPUESTOS TIPO TAXANO

A.1. Estructura

Los compuestos tipo taxano poseen un esqueleto totalmente original, descrito como un diterpeno de tres anillos, con una conformación altamente plegada, la cual no se aprecia en su representación en dos dimensiones. El anillo A, de seis miembros, es un bote distorsionado, con una fusión cis al anillo B, de ocho miembros, el cual tiene una conformación silla-bote. En el caso de los derivados de la baccatina, el anillo C, de seis miembros, presenta una conformación de silla distorsionada y tiene una fusión trans con el anillo B.^{17, 7} (Figura 1)

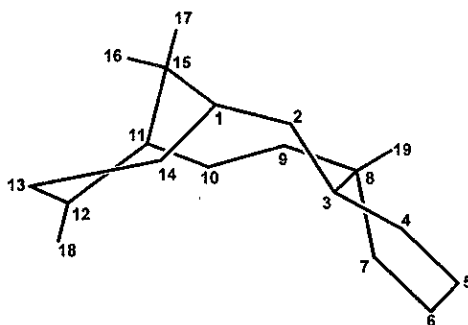


Figura.1

Existen 4 grupos principales de compuestos que han sido aislados de varias especies de *Taxus*:

- A) Compuestos que poseen un metileno exo en C - 4
- B) Compuestos que poseen un epóxido en posiciones 4 - 20
- C) Compuestos que poseen un anillo oxetano en C - 5
- D) Compuestos en los cuales C - 20 es parte del anillo B y con un doble enlace endo en 4 - 20.

En la figura 2 se muestran los cuatro grupos principales

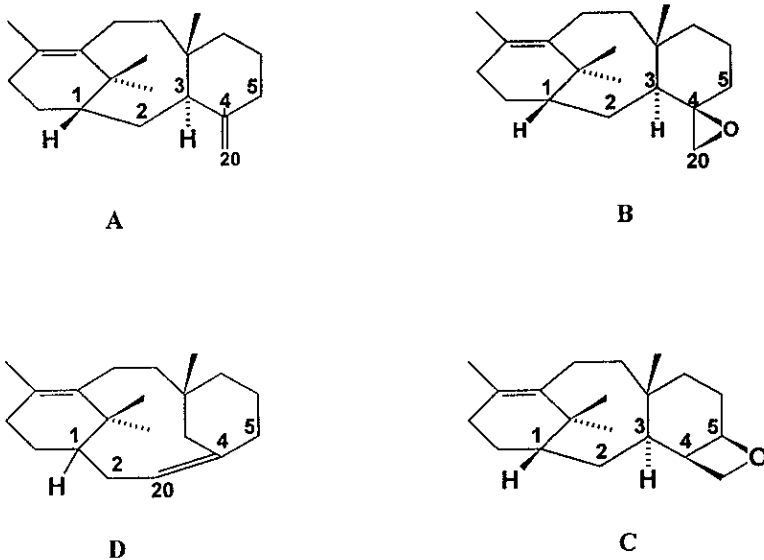


Figura.2

A.2. Biosíntesis (taxol)

La biosíntesis se enfoca generalmente al taxol (Figura.3), pero se puede tomar como parte de la biosíntesis de compuestos análogos.

- Se ha dividido a la molécula en tres regiones principales
 - a) El anillo de taxano
 - b) El anillo de oxetano
 - c) La cadena lateral

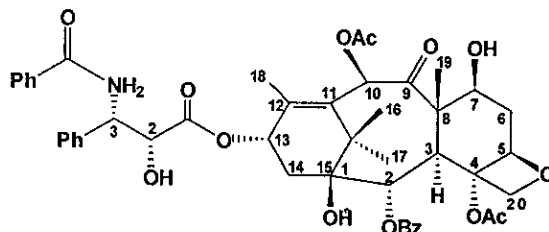


Figura.3 Taxol

A.2.a Biosíntesis de anillo tricíclico taxano y del anillo oxetano

Se ha sugerido que el sistema de anillos del taxano puede originarse biogénicamente del geranilgeraniol pirofosfato (ruta acetato-mevalonato), a través de una serie de reacciones de ciclización, donde el verticileno (Figura 4), parece ser el intermediario más probable entre el geranilgeraniol y el anillo de taxano.^{37, 7, 11, 28,29}

En la figura 5 se muestra la biosíntesis del anillo taxano.

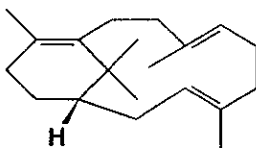


Figura.4 Verticileno

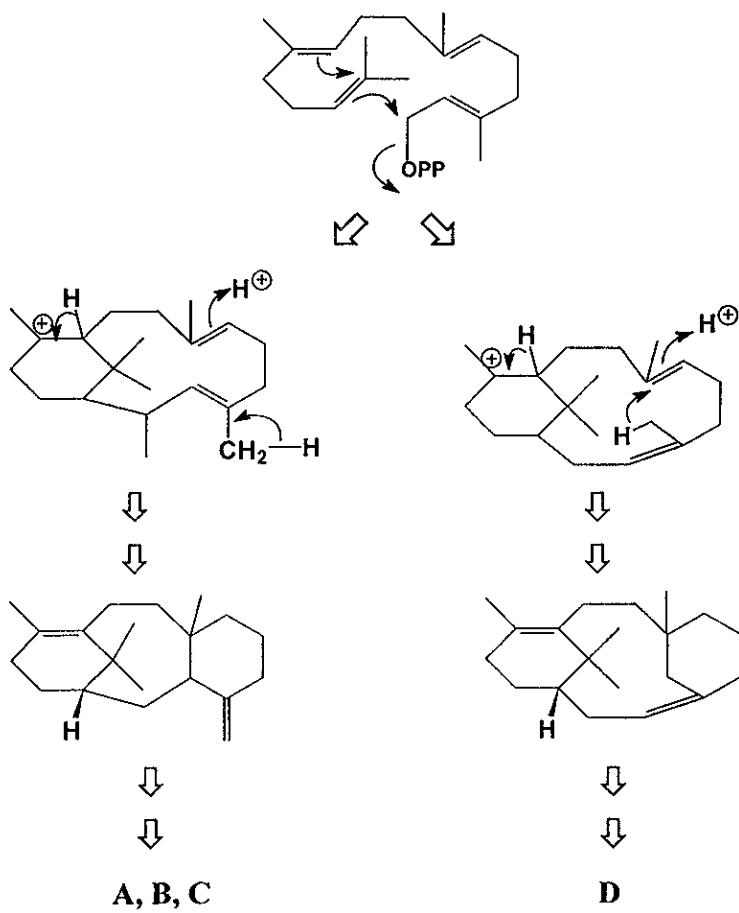
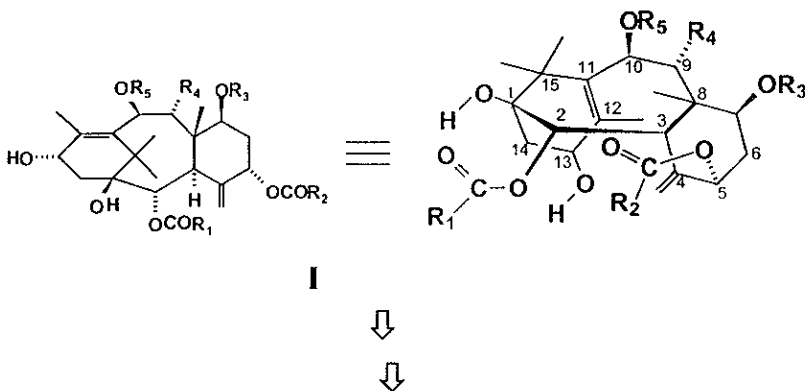


Figura.5 Biosíntesis del anillo taxano

Diferentes observaciones sugieren que los compuestos naturales del grupo C, podrían derivarse de compuestos del grupo A, a través de una esterificación intramolecular.

Por ejemplo, una de las conformaciones que puede tomar el compuesto I permite la formación de un ortoéster II como resultado de un proceso de transesterificación intramolecular entre C -13 y C - 5. Este intermediario permitiría la formación de III el cual nos daría la estructura correspondiente al grupo A, éste a través de una acetilación y epoxidación podría ser convertido a IV (grupo B) y por apertura del epóxido a V, para finalmente sufrir un ataque y la transferencia del grupo acetilo de C - 5 al ion carbonio en C - 4 para obtener el derivado VI que correspondería a la estructura del grupo C.²⁹ (Figura 6)



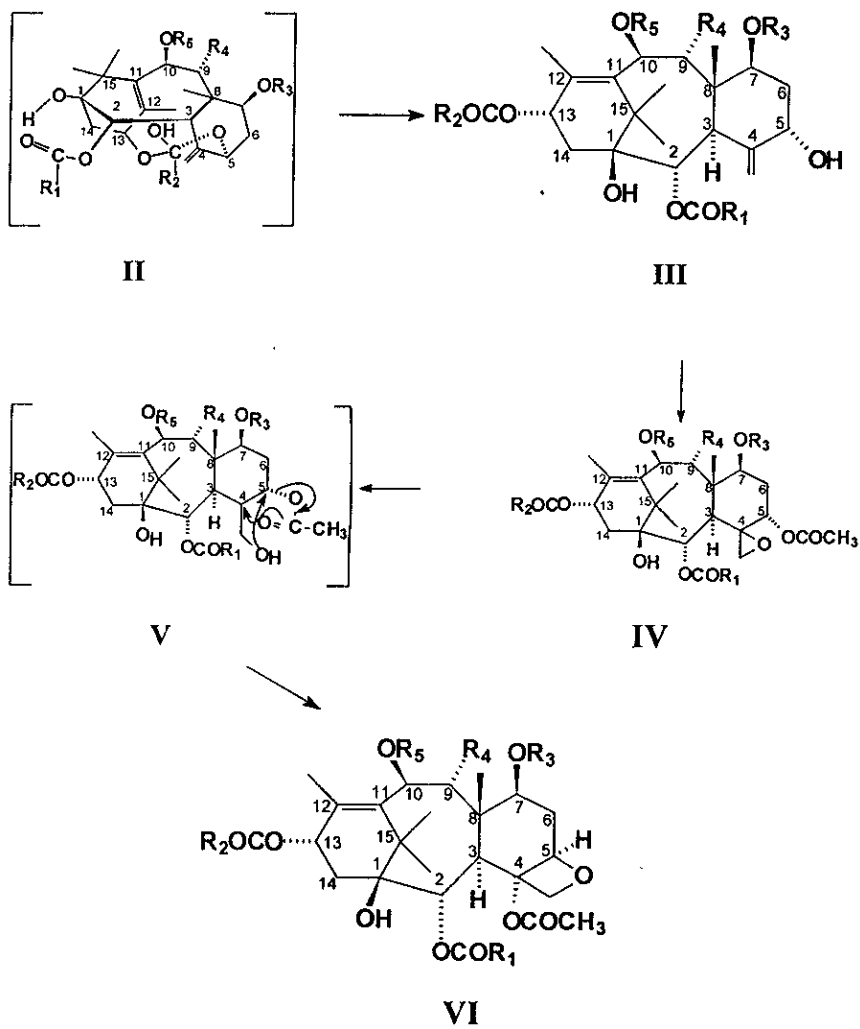


Figura.6

Otra propuesta para la biosíntesis del anillo oxetano sugiere que se origina a través del siguiente proceso solvolítico.⁷ (Figura 7).

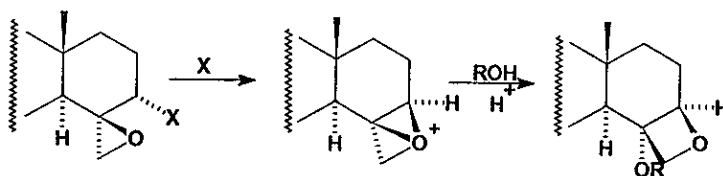


Figura.7

Recientemente se ha comprobado que la baccatina III es un precursor de taxol. (Figura 8).

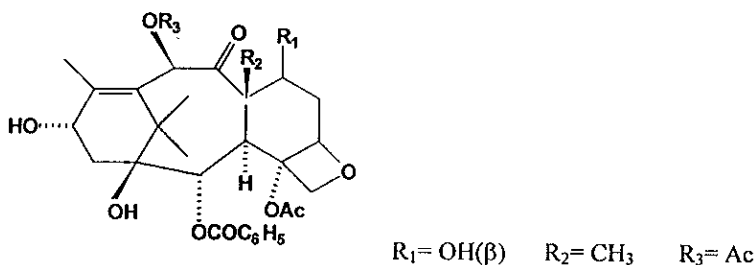


Figura.8

A.2.b. Biosíntesis de la cadena lateral

La cadena lateral fenilisoserina es muy importante en el taxol y sus análogos semisintéticos, pues es esencial para la actividad antitumoral de estos compuestos. Se ha comprobado que la cadena se origina de la β-fenilalanina y fenilisoserina.^{37, 7, 11, 28}

En estudios adicionales para comprobar si la cadena es enlazada como una unidad intacta o si es hidrolizada y luego benzoilada, se administró N-benzoilfenilisoserina (a) marcada con deuterio en ambos anillos, se obtuvo 1.7% de ($^2\text{H}_5$)taxol con solo una pequeña cantidad de ($^2\text{H}_{10}$)taxol, lo que sugiere una extensiva hidrólisis del grupo N-benzoilo. Para probar esta hipótesis, se administró ($^2\text{H}_8$)N-benzoiltaxol (b), marcado con tres átomos de deuterio en el grupo 10-acetilo y 5 en el anillo fenilo, observándose una alta incorporación de los 8 átomos de deuterio (5%) al taxol. (figura 9)

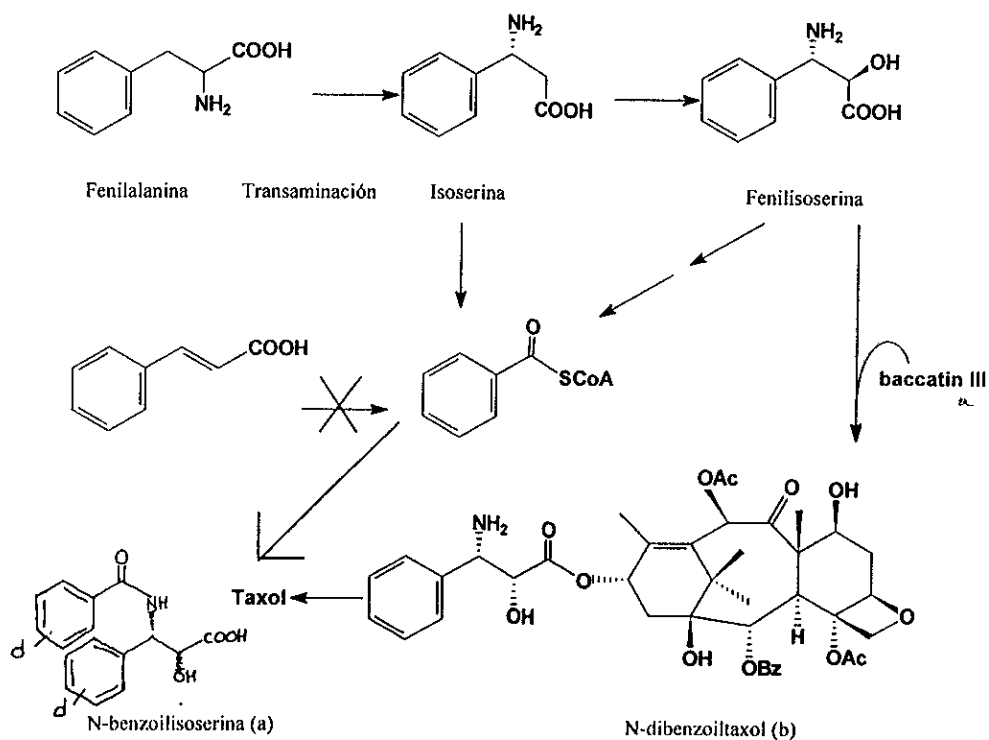


Figura 9

A.3. Mecanismo de acción del taxol^{38, 7, 28}

Horwitz, encontró un mecanismo de acción único para la actividad antitumoral del taxol que involucra estrechamente al sistema de microtubulos.

Los microtubulos están involucrados en la formación del citoesqueleto, responsable de la forma celular y posición de los organelos; las propiedades de los microtubulos son indispensables para la transmisión de señales celulares, movimiento celular y para la división celular.

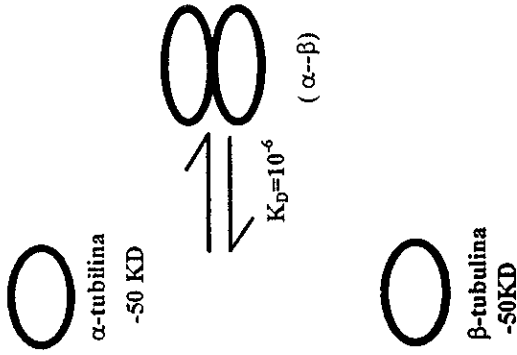
Los microtubulos están compuestos por dos subunidades α y β tubulina que son proteínas similares de 440 KD. Los dímeros de tubulina se unen a dos moléculas de guanosin 5 trifosfato (GTP), una molécula de GTP se une temporalmente a un sitio de la subunidad β denominado sitio E mientras que la otra molécula se une estrechamente en la subunidad α en el sitio N, el resto del microtubulo es formado por proteínas asociadas a microtubulos (PAM's). La polimerización de los microtubulos se inicia con la formación de un heterodímero formado por la unión de una molécula de α y una molécula de β tubulina, en presencia de iones de Mg^{2+} y GTP, estos heterodímeros se ensamblan para dar un centro de nucleación y posteriormente protofilamentos que a su vez se asociarán para formar un microtubulo con crecimiento a la izquierda y en triple hélice. Después de cierto periodo de crecimiento los microtubulos y la tubulina libre pueden alcanzar concentraciones relativas correspondientes a un equilibrio, en este punto el ensamblamiento y desensamblamiento están balanceados, si la concentración de tubulina se encuentra por debajo del valor requerido para este equilibrio la asociación espontanea no ocurre y el sistema de es capaz de realizar un rápido rearrreglo. Se ha propuesto que la unión de tubulina con GTP es capaz de aumentar el crecimiento

terminal de los microtubulos, los microtúbulos mantienen un "empuje" hacia el complejo GTP-tubulina. La hidrólisis de GTP se supone es modulador del proceso y entonces si el microtubulo pierde su "empuje" hacia el complejo, ocurre un rápido desensamblamiento.

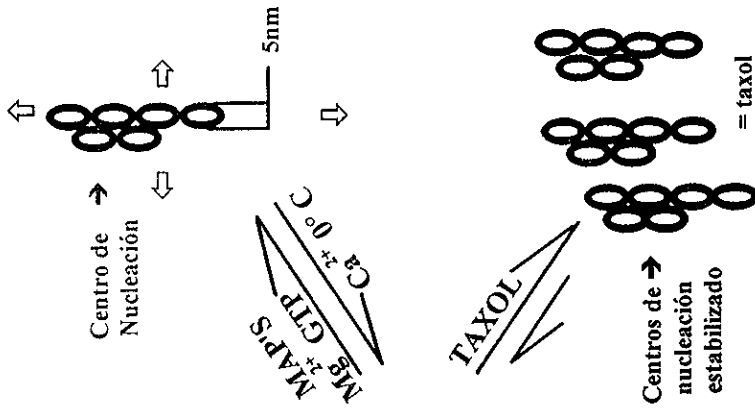
El taxol se une específica y reversiblemente a los microtubulos, a la subunidad β de la tubulina, específicamente con el N-terminal del aminoácido, afectando el equilibrio microtubulos-tubulina, disminuyendo la concentración crítica de tubulina y el tiempo de inducción para la polimerización en ausencia o presencia de GTP, PAM's y Mg^{2+} . Los microtubulos formados por la inducción del taxol, presentan un pequeño alargamiento típico y resistencia a la refrigeración y al Ca^{2+} los cuales en condiciones normales despolarizan a los microtubulos. Un microtubulo normal esta compuesto por 13 protofilamentos y tiene un diámetro aproximado de 24nm, la inducción por taxol produce túbulos con un diámetro inferior de 22nm y compuestos por 12 protofilamentos.

Dentro del ciclo celular el taxol interfiere en aquellos eventos que involucran la actividad de los microtubulos, las células se detienen en la transición de interfase y mitosis es decir entre la etapa G2 del ciclo celular y la profase, las células presentan asociaciones de microtubulos anormales " estrellas", la tubulina se presenta como una estructura estable y la ausencia de tubulina libre inhibe la formación del huso mitótico

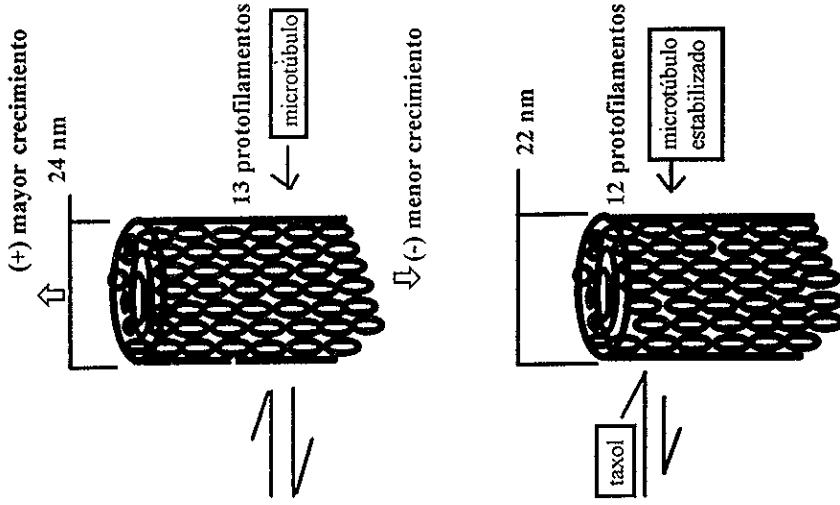
Formación Heterodímero



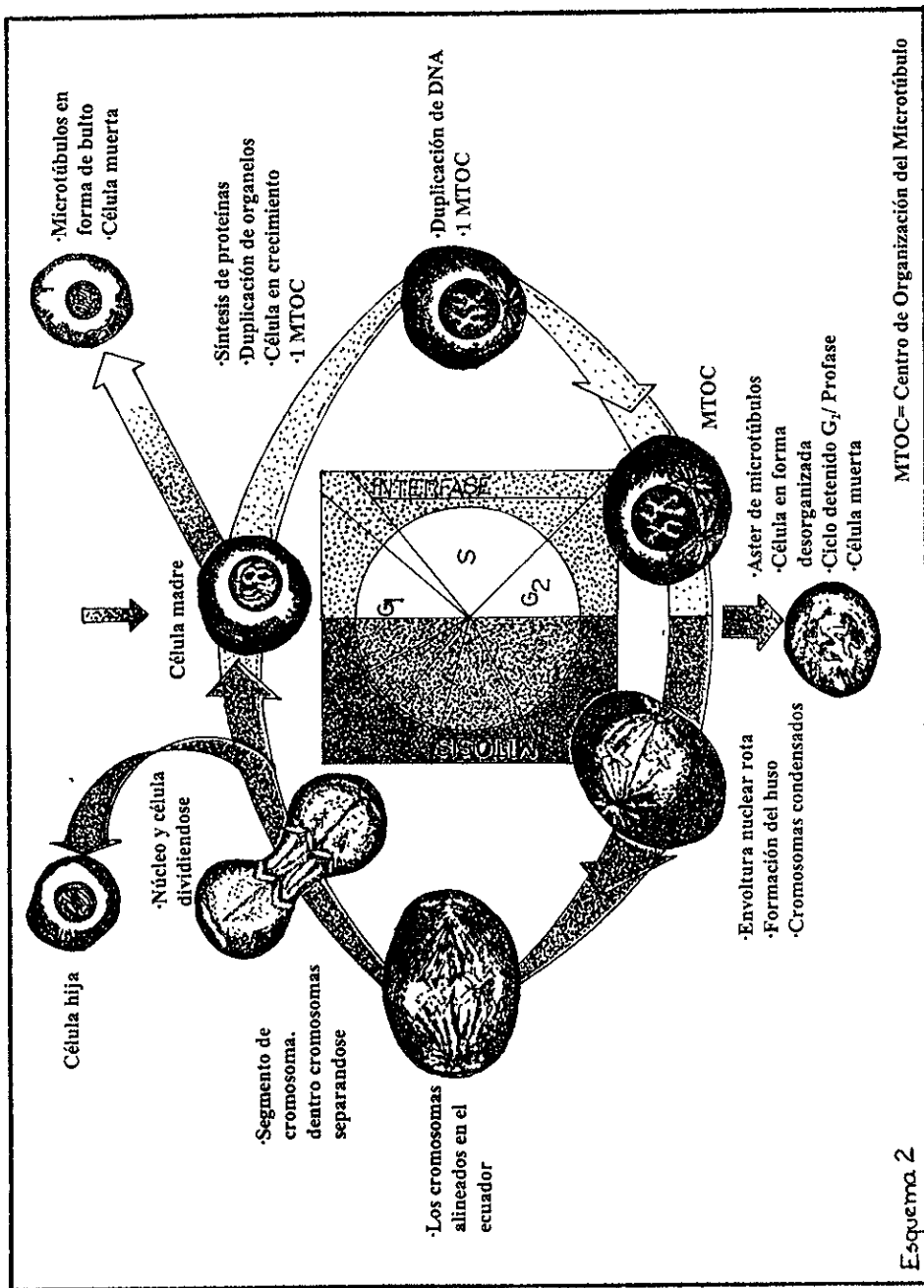
Iniciación



Polimerización / Elongación



Esquema 1



En los esquemas se ilustra la forma en la que el taxol actúa en la polimerización de los microtúbulos (esquema 1), así como también su intervención entre el ciclo celular y la mitosis (esquema 2)

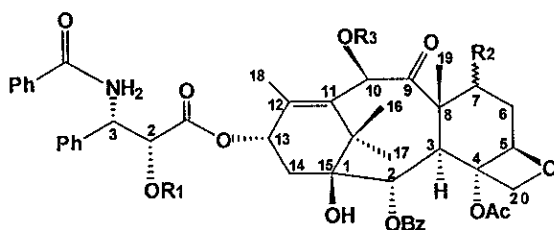
A.4. Relación estructura-actividad

De acuerdo con lo reportado por Kingston⁸ en 1990 en uno de sus estudios, la estructura-actividad fue evaluada en diferentes compuestos derivados del taxol, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Cuadro 4. Los datos obtenidos de una revisión hecha por el Kingston en 1990.⁸

COMPUESTO	DE ₅₀ (µg/ml) en cultivos de Células KB	DE ₅₀ (M) para Células J774.2 ^a
Taxol (1)	1×10^{-5} , 1.2×10^{-3b}	7×10^{-8}
Baccatina III (2)	2.0^b	$>1 \times 10^{-5}$
2',7-Diacetil-taxol (3)	3×10^{-2}	8×10^{-7}
2',7-Diacetil-10-desacetil-taxol (4)	$<1 \times 10^{-2}$	2×10^{-7}
Decinnamoiltaxinina J (5)	28	
10-Desacetilbaccatina III (6)	10	
7-epi-Taxol (7)	3×10^{-5}	
10-Oxotaxol (8)	2×10^{-2}	
Cefalomanina (9)	3.8×10^{-3b}	1.5×10^{-7}

^aDatos determinados por Parness *et al*¹⁹ ^bDatos de McLaughlin *et al*¹⁸

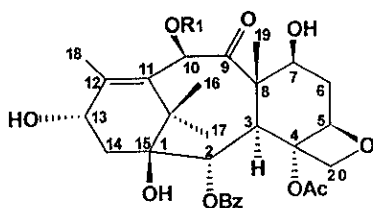


1 $R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = Ac$

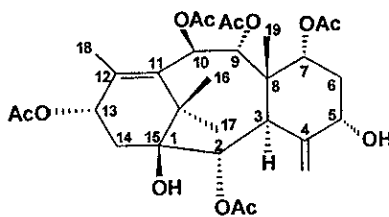
3 $R_1 = R_3 = Ac$, $R_2 = \beta-OAc$

4 $R_1 = Ac$, $R_2 = \beta-OAc$, $R_3 = H$

7 $R_1 = H$, $R_2 = \alpha-OH$, $R_3 = Ac$

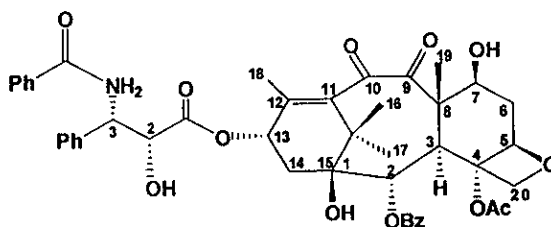


2 $R = Ac$



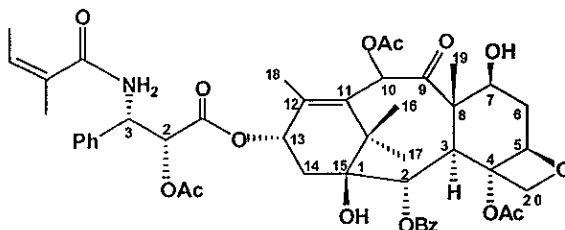
5

6 $R = H$



8

figura.10



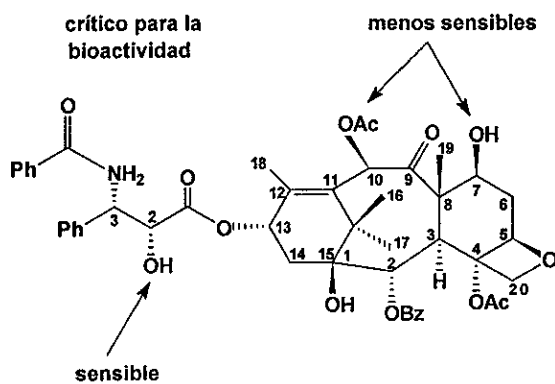
9

Cont. figura.10

Las conclusiones a las que se llegó son las siguientes:

- a) Es factible realizar modificaciones en C-10 y/o en C-7, provocando ligeros cambios en la actividad de los taxanos.
- b) Es esencial la cadena lateral en C-13 para la actividad.
- c) En la cadena lateral debe haber un OH libre en la posición del C-2'
- d) Los compuestos con un grupo éster en posición C-2' pueden considerarse profármacos.
- e) Se pierde la actividad en estructuras sin grupo benzoato en C-2.
- f) Es esencial el anillo oxetano para la actividad.
- g) Los compuestos 2'R/3'S son más activos, tales como taxol y taxotere.
- h) El sustituyente en el C-3' juega un papel muy importante en la preorganización de la cadena lateral del taxol para su unión con la tubulina.

En la figura 11 se ilustra la relación estructura actividad de la molécula de taxol.



Taxol

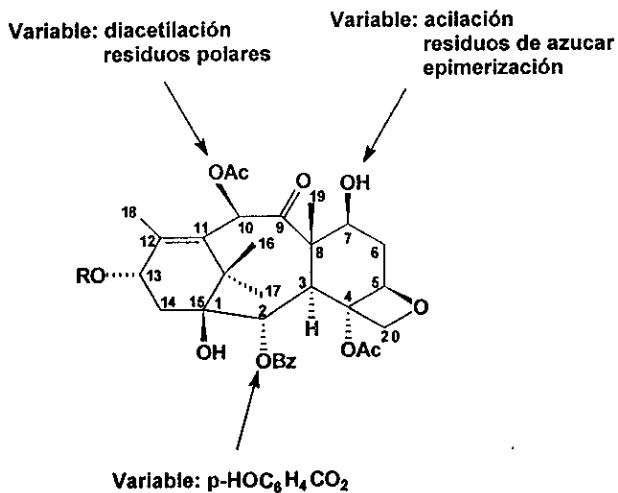


Figura.11

A.5. Aplicaciones Clínicas del taxol

El efecto antineoplásico de taxol *in vivo* se ha demostrado en diferentes tipos de neoplasias como cáncer de seno, pulmón, melanoma y ovario, además también funciona en el tratamiento de la leucemia. La dosis recomendada es de 200-250 mg/m² (de área superficial corporal), administrada en casi 3lts. de solución isotónica por un período de 6 a 24 hrs.

Aunque la principal actividad del taxol es la de ser un agente anticancerígeno, existen estudios acerca de otras actividades biológicas, como es bloquear las células del *Tripanosoma cruzi*, impidiendo la división celular, o bien también se ha encontrado que bloquea la síntesis de DNA de células estimuladas por el citomegalovirus humano, cuya infección se ha asociado con el cáncer.⁴⁴

A.6. Alternativas de obtención del taxol

Debido a que un árbol de unos 100 años rinde unos 3kg de corteza y de aquí se obtienen apenas 300mg de taxol, proceso que mata a la planta. Con estos antecedentes se hace necesario buscar nuevas rutas para obtener el compuesto, así por ejemplo:

-El taxol se ha obtenido por semisíntesis a partir de un precursor natural, 10-desacetilbaccatina III, aislado de hojas de *T. baccata*, así como el taxotere, el cual demuestra una actividad biológica superior a la del taxol y mejor disponibilidad debido a su mayor solubilidad. La 10-desacetilbaccatina es obtenida con altos rendimientos del follaje, lo cual representa un recurso renovable, sin tener que acabar con toda la planta.⁴⁵

-El taxol también se ha encontrado en hojas y madera de *T. brevifolia* en cantidad igual o menor que en la corteza.⁴⁴

-La producción mediante el cultivo de células en suspensión es otra fuente potencial. Esta se puede manejar para aumentar la producción de taxol, variando las condiciones de crecimiento.³²

-Recientemente, Han H.K., et. al. (1994) han reportado la primera transformación de *taxus* spp, utilizando *Agrobacterium* como sistema mediador de la transformación y detección de taxol en líneas celulares transgénicas en un rendimiento de 0.8-4.0 mg/g de peso seco.

La síntesis representa un reto debido a sus 11 centros quirales y a la complejidad de la molécula, sin embargo existen en la literatura algunos ejemplos de síntesis totales.^{7, 23, 45, 37}

-El taxol se ha obtenido a partir del hongo *Taxomyces andreanae* (microorganismo aislado de *T. brevifolia*) en un rendimiento de 24 a 50 ng de taxol por litro.²

B. ESTEROIDES

Los triterpenos al igual que los esteroides proceden de la ciclación del escualeno, poseen una estructura siempre policíclica. Casi siempre hidroxilados en C₃ presentan, al contrario de los demás terpenos, una unidad estructural bastante fuerte, siendo excepcionales las modificaciones profundas del esqueleto básico.

No existe una diferencia fundamental entre los triterpenos y los esteroides, considerándose estos últimos triterpenos tetracíclicos (relacionados con la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno) que han perdido, como mínimo, tres metilos. Aún en este caso, la unidad estructural es fuerte.

Se conoce la importancia biológica con la que cuentan los esteroides; el reino animal elabora sus esteroides hormonales a partir del lanosterol y colesterol o, en el caso de los Insectos y Crustáceos que no pueden utilizar la ruta acetato mevalonato, a partir de fitosteroles (triterpenos tetracíclicos) que ingieren en su alimentación, en el caso de los vegetales el papel de los fitosteroles es principalmente en la constitución de las paredes celulares. En la figura 12 se muestran algunos ejemplos de esteroides.

Uno de los intereses principales de los esteroides es el que son materias primas reemplazables para cubrir las necesidades de la industria farmacéutica en hormonas esteroídicas (anticonceptivos, antiinflamatorios, anabolizantes...).

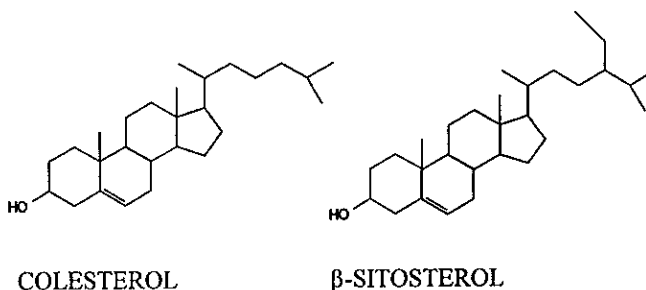


Figura.12

BIOSÍNTESIS

Biogénicamente, se derivan de la ruta acetato mevalonato, los triterpenos como los esteroides tienen un precursor común, el escualeno, la diferenciación se realiza precozmente en función de impedimentos estéricos impuestos por un enzima (escualeno epoxidasa).

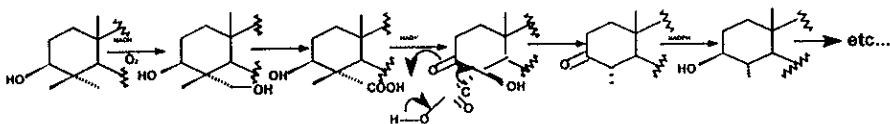
La existencia de un hidroxilo en la posición 3, constante en los esteroides y raramente ausente en los triterpenos, permite suponer que la ciclación se inicia por la ruptura ácido-catalizada de un oxirano: se demuestra con ayuda de ^{18}O que el escualeno forma un epóxido en una de sus extremidades, con el oxígeno del aire. La apertura del oxirano ocasiona la ciclación (sin duda) ajustada: para que esta pueda tener lugar, el enzima de ciclación debe estabilizar la conformación del poliisopreno, de tal forma, que los imperativos estereoelectrónicos de la ciclación en cadena sean respetados. De esta

conformación inicial del 2,3-epóxido escualeno sobre la superficie de la enzima, depende la orientación de la biosíntesis hacia los esteroides y los triterpenos tetracíclicos.

En el caso de los esteroides, el precursor se mantiene sobre la zona activa de la enzima en una conformación silla-bote-silla-bote, lo que da lugar a la formación del carbocatión "protostano", precursor de los esteroides (fig.14), sin embargo si el precursor mantiene la conformación silla-silla-silla-bote, se forma un carbocatión "dammarano", que puede o no sufrir una ciclación suplementaria, precursor de los triterpenos.^{17,10, 31}

En ambos casos, los protones y los metilos que se suceden en 17, 13, 14 y 8 son antiparalelos dos a dos, lo que permite las migraciones 1,2 en serie. Las recombinaciones terminan generalmente por la expulsión de un protón.

El paso del triterpeno de C₃₀ (cicloartenol) al esqueleto esteroídico básico de C₂₇ implica una desmetilación progresiva en 4 y 14. El metilo en 14 se elimina en forma de ácido fórmico, los metilos en 4 en forma de dióxido de carbono: la descarboxilación se ve facilitada por la oxidación del hidroxilo en 3. Observar la siguiente figura. (fig 13)



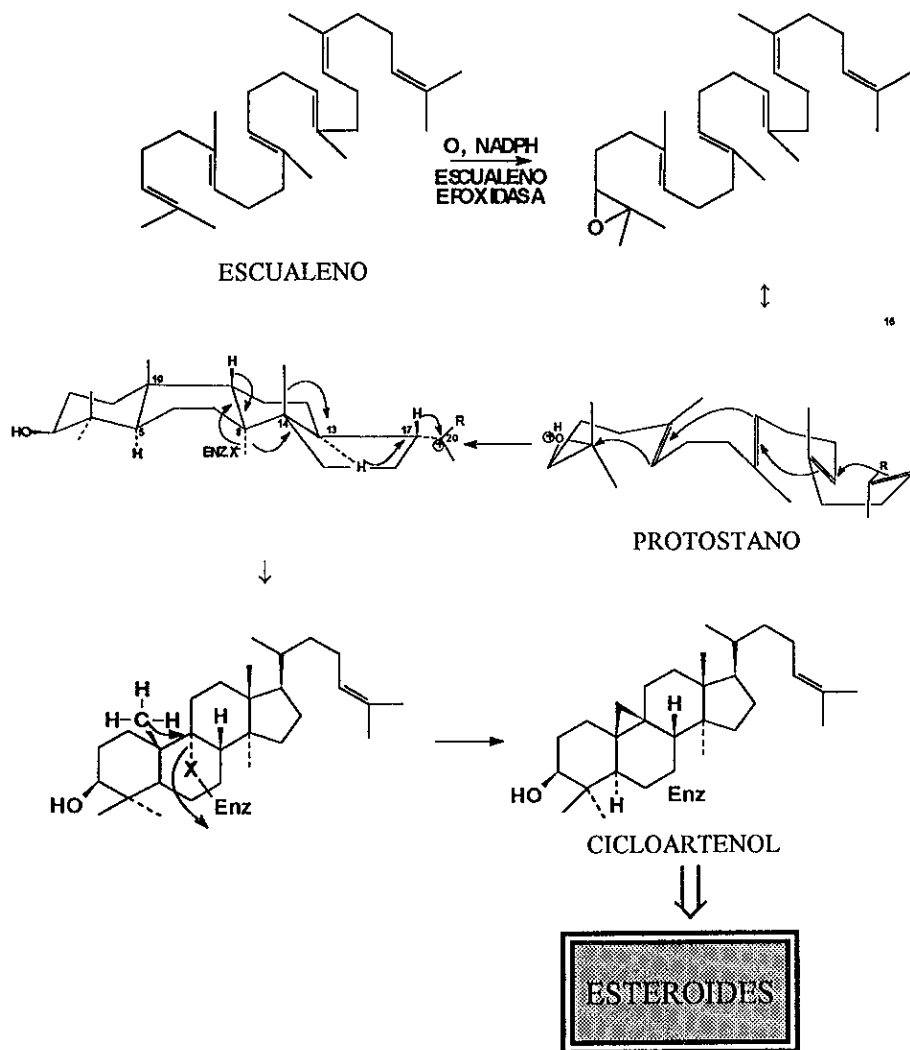


Figura. 14 Biosíntesis de esteroides.

II
DESARROLLO
EXPERIMENTAL

1. APARATOS Y MATERIAL QUÍMICO

A) Material químico

- Disolventes: hexano, CH_2Cl_2 , acetona, AcOEt, MeOH.
- Para preparar los agentes cromógenos de sulfato cérico y H_2SO_4 al 10%, se utilizó, H_2SO_4 conc. sulfato cérico, hielo y H_2O destilada.
- Para empacar las columnas se utilizó gel de sílice 60 GF₂₅₄, 2mm, para cromatoplaques y gel de sílice 60, para cromatografía en columna, de la marca MERCK.
- El proceso cromatográfico se siguió por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios AL TLC sílica gel 60 F₂₅₄, de la marca MERCK.

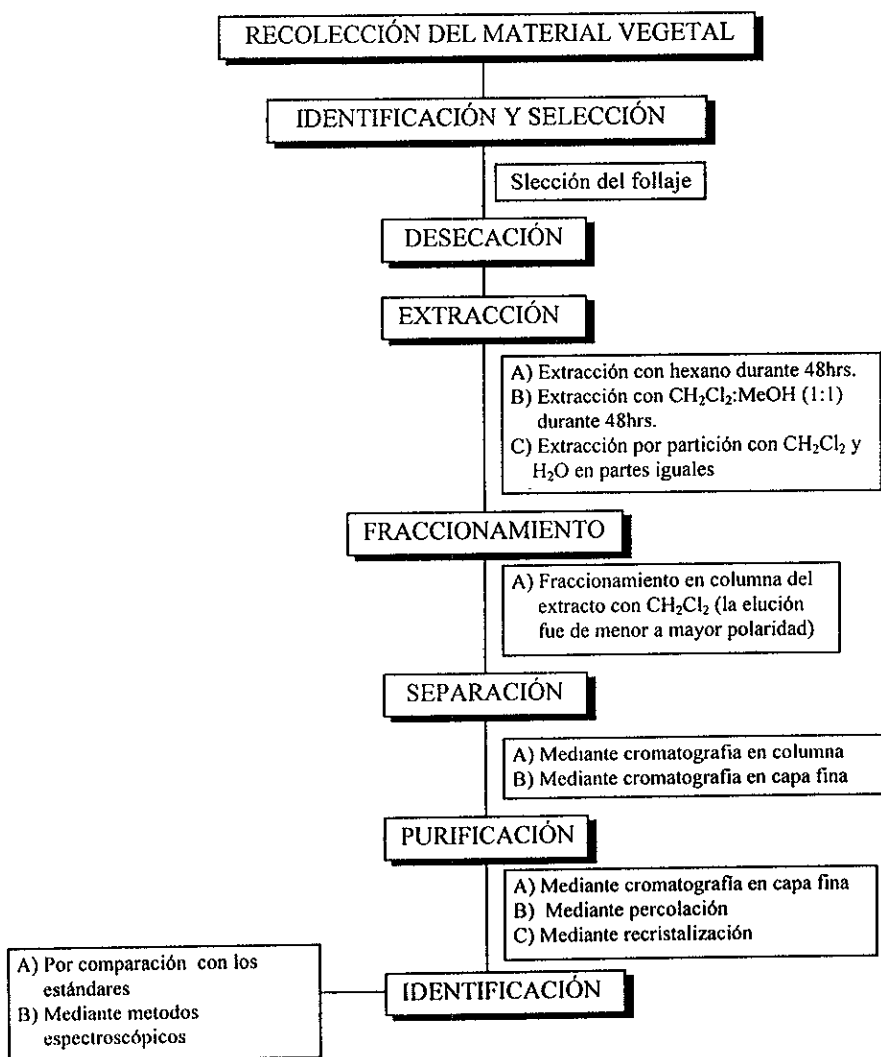
B) Estándares

- Taxol: Taxol (paclitaxel) de T. brevifolia SIGMA CHEMICAL CO.
- Cefalomannina y 10-desacetilbaccatina fueron proporcionados por el Dr. Kingston del Politécnico de Virginia, E. U.

C) Aparatos

- Para determinación del punto de fusión se utilizó el aparato de Fisher- Johns.
- Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotómetro de IR Nicolet 55x.
- Los espectros de masas fueron determinados en un espectrómetro de masas Helwelett Packard 5945 a 70 eV mediante la técnica de impacto electrónico.
- Los espectros de RMN^1H y RMN^{13}C de 300Hz se obtuvieron en un espectrofotómetro Varian VXR-300s. Los desplazamientos químicos están en ppm, tomando como referencia al tetra-metil-silano (TMS).

2. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



3. ∞ PRIMERA PARTE ∞

3.A.- Material vegetal

El material vegetal (follaje) de *Taxus globosa* se recolectó a 10Km de Pachuca, en el Parque Nacional el Chico Hidalgo en febrero de 1994 y fue identificado por el Dr. F. Zavala Chavez de la Universidad Autónoma de Chapingo. Una muestra de referencia se depositó en la colección botánica del herbario del Colegio de Postgraduados.

La planta se secó a temperatura ambiente y se fragmentó en un molino de cuchillas, modelo 560999 Thomas Wiley.

3.B.- Métodos de extracción y fraccionamiento

3.B.1.- Extracción con hexano

El material vegetal molido (548.0g) se maceró dos veces con un volumen de 2 litros de hexano, dejando para cada extracción un periodo de 24hrs. al término de cada una de las cuáles el extracto se filtró y se concentró al vacío a una temperatura de 50°C.³¹

3.B.2.- Extracción con CH₂Cl₂:MeOH (1:1)

El material vegetal desengrasado (545g) se maceró con un volumen de 3.5 litros de una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (1:1) por un periodo de 48 hrs., cada 24 hrs. el extracto se filtró y se concentró al vacío a una temperatura de 45-50°C.^{4, 7}

3.B.3.- Fraccionamiento por partición

El extracto anterior (53.939g) se fraccionó por el método de partición en un embudo de separación, se utilizó H₂O desionizada y CH₂Cl₂ en partes iguales, agitación vigorosa y posteriormente centrifugación a 5000 r.p.m., la fracción en diclorometano se concentró al vacío a 40-45°.⁴

3.B.4.- Fraccionamiento por cromatografía en columna

El extracto en diclorometano (7.3g) se fraccionó mediante cromatografía en columna, se utilizó gel de sílice como soporte, el proceso de elución se efectuó con CH₂Cl₂ en un 100% y una mezcla de CH₂Cl₂:Acetona en diferentes proporciones. Se obtuvieron 335 fracciones de 50ml. cada una, combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares. En el cuadro 3 se resume el fraccionamiento.

Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto en diclorometano de *Taxus globosa*

ELUYENTE	PROPORCIÓN %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE IDENTIFICACIÓN
CH ₂ Cl ₂	100	1-15	I
CH ₂ Cl ₂	100	16-132	II
CH ₂ Cl ₂ Acetona	95:05, 90:10, 85:15	133-182	III
CH ₂ Cl ₂ :Acetona	80:20, 75:25, 70:30	183-228	IV
CH ₂ Cl ₂ Acetona	80:20, 75:25, 70:30	229-335	V

3.B.5.- Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de las fracciones se realizó conjuntamente con los estándares por cromatografía en capa fina, se utilizaron placas de aluminio de 2 por 5cm. recubiertas de gel de sílice; dos sistemas de eluyentes fueron empleados así como detección por luz U.V. Como agente cromógeno se utilizó ácido sulfúrico al 10% *. En el cuadro 4 se resumen los sistemas eluyentes empleados.

Cuadro 4. Sistemas de eluyentes

SISTEMAS DE ELUYENTES	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
A	CH_2Cl_2	100
B	CH_2Cl_2 :Acetona	70:30

*Para desarrollo de color calentar por dos minutos aproximadamente a 110°C .

3C.- Separación y purificación

La fracción V(1.28g) fue la única que se sometió a separación ya que presentó similaridad con el estandar. Se realizó una cromatografía en columna, se utilizó gel de sílice como soporte, el sistema de elución fue CH_2Cl_2 :Acetona (7:3), el análisis cromatográfico fue igual que en 4 pero con el sistema de eluyente B. Se obtuvieron 70 fracciones de 50 ml. cada una. Las fracciones 8-70 identificadas como VII(0.977g) se fraccionaron nuevamente por cromatografía en columna de la misma manera que V; se obtuvieron 78 fracciones de

25ml. cada una, las cuales se juntaron de acuerdo con sus características cromatográficas y a la presencia de un precipitado, el cual se formó conforme la columna era eluida.

En el cuadro 5 se resumen las fracciones obtenidas de fraccionar VII, peso y punto de fusión de los precipitados.

Cuadro 5. Resumen de las fracciones obtenidas de fraccionar VII, peso y punto de fusión

FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE IDENTIFICACIÓN	PESO(mg)	PUNTO DE* FUSIÓN °C
5 - 6	VIII	11.9	73 - 75
7 - 25	IX	83.8	245 - 248
26 - 55	X	45	95 - 100
56 - 78	XI	73	90 - 95

* Los puntos de fusión corresponden a sustancias muy impuras

De las muestras anteriores sólo IX se tomó para ser purificada ya que fue la única que presentó similitud con uno de los estándares, 10-desacetilbaccatina III, tanto en el punto de fusión como en el análisis cromatográfico.

La purificación se realizó mediante percolación con hexano en un 100% y posterior recristalización. La muestra final fue analizada mediante RMN, E.M.E. e I.R. para su identificación (espectros del 1-9).

4.-∞ SEGUNDA PARTE ∞

4.A. Fraccionamiento

El extracto diclorometanólico (20.4g) de *Taxus globosa* se fraccionó mediante cromatografía en columna a baja presión, se utilizó como soporte gel de sílice, el proceso de elución se efectuó con hexano, hexano:CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, MeOH , se obtuvieron 253 fracciones de 125ml. cada una, combinandose aquellas que presentaron características cromatográficas similares. En el cuadro 6 se resume el fraccionamiento.

Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto en diclorometano de *Taxus globosa*

ELUYENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE IDENTIFICACIÓN
Hexano	100	1 - 17	I
CH ₂ Cl ₂ :Hexano	50:50	18 - 41	II
CH ₂ Cl ₂ :Hexano	50:50	42 - 77	III
CH ₂ Cl ₂ :Hexano	50:50	78 - 92	IV
CH ₂ Cl ₂ :Hexano	50:50	93 - 127	V
CH ₂ Cl ₂ :Hexano	50:50	128 - 165	VI
CH ₂ Cl ₂	100	166 - 221	VII
MeOH	100	222 - 253	VIII

4.B. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se realizó mediante cromatografía en capa fina se utilizaron placas de aluminio de 2 por 5cm. recubiertas de gel de sílice; los sistemas de eluyente se agrupan en la cuadro 7. Se utilizó la luz UV para detectar las muestras así como sulfato cérico como agente cromógeno.[‡]

Los estándares se utilizaron pocas veces.

Cuadro 7. Resumen de los sistemas de eluyentes empleados en el análisis cromatográfico

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
B	CH ₂ Cl ₂ :Acetona	7:3
C	AcOEt:Hexano	2:1

[‡]calentar aproximadamente a 110°C para revelar

4.C. Separación y Purificación

-En la fracción IV se precipitó con hexano un producto amorfo, el cual fue recristalizado de CH₂Cl₂/hexano. Los cristales de color blanco mostrarán un punto de fusión de 132-135°C el cual correspondió al β-sitosterol, cuya identidad fue confirmada por los análisis espectroscópicas correspondientes, (espectros del 15-19).

4.C.1. Cromatografía en columna I

Las fracciones restantes así como las aguas madres de la fracción IV se reunieron, produciendo un residuo aceitoso el cual fue sometido de nuevo a

fraccionamiento mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice como soporte, y mezclas con hexano:AcOEt, AcOEt y MeOH de polaridad ascendente.

-Las fracciones X (6 -10) presento formación de cristales muy pequeños y escasos. Después de varias recrystalizaciones la muestra se redujo demasiado, sólo se pudo obtener el punto de fusión. DAB III⁺

-Las fracciones XIII (25 - 29), XV(52 - 116) presentaron la formación de un sólido muy fino, verdoso, insoluble en hexano, CH₂Cl₂ y MeOH. Se efectuaron variós lavados, posteriormente se tomo el punto de fusión y se analizó por RMN, E.MIE e I.R. (espectros del 10-14). DAB II⁺

-Las fracciones XVIII (176 - 207) y XIX (208 - 233) presentaron formación de cristales escasos , se recrystalizarón con AcOEt, debido a que la cantidad era muy pequeña se obtuvo el punto de fusión y un espectro de RMN¹H de la sustancia impura. (espectro 22) DAB VI⁺

☆- Fracciones metanólicas

-Las fracción XXI (240 - 249) se llevo a una columna cromatográfica empacada con gel de sílice, el sistema de elución fue CH₂Cl₂:Acetona (9:1 y 8:2). Se obtuvieron 80 fracciones de 75ml. cada una. El análisis cromatográfico se efectúo igual que en 4.B sólo que se utilizó el sistema eluyente B.

-De las 80 fracciones sólo de la 48 a la 80 (XXIX), se obtuvo un sólido blanco muy escaso del cual se obtuvo el punto de fusión y un espectro de RMN¹H de la sustancia impura. (espectro 21) DAB V⁺

-La fracción XXII (250 - 262) se fraccionó nuevamente por cromatografía en columna, como sistema de elución se utilizó hexano, hexano:AcOEt (2:1 y 1:1) y

MeOH. Se obtuvieron 104 fracciones de 75ml. cada una. El análisis cromatográfico se realizó igual que en 4.B, el sistema eluyente fue C.

-La fracción XXXIV (17 - 47) presentó un sólido cristalino, verdoso, insoluble en hexano; se realizó una percolación con hexano, posteriormente se efectuó una separación mediante cromatografía en capa fina, se utilizaron placas cromatográficas de 20 x 20 recubiertas de gel de sílice de 0.5mm de espesor y el sistema eluyente B.

-De la cromatografía anterior se obtuvieron dos sustancias sólidas cristalinas de las cuales se obtuvo el punto de fusión y un espectro de RMN de cada una de las sustancias impuras. (espectros 23 y 24) DAB VII Y DAB VIII*

-Las fracciones metanólicas presentaron un precipitado oscuro insoluble en hexano, CH_2Cl_2 , y MeOH; se lavo varias veces con metanol, posteriormente se tomo el punto de fusión y se analizó por R.M.N e I.R. (espectros del 10-14). DAB II*

4.C.2. Cromatografía en columna 2

Las fracciones y las aguas madres restantes se sometieron a una cromatografía en columna, el sistema de elución fue CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 :Acetona en proporción (8:2 y 7:3) y MeOH. Se obtuvieron 99 fracciones de 100ml cada una. El análisis cromatográfico fue igual a 4.B, pero con el sistema de eluyente B.

-Las fracciones XXXVIII (38 - 44) y XXXIX (45 -50) presentaron un sólido blanco, insoluble en hexano, se purifico mediante recrystalización, posteriormente se tomo el punto de fusión y se analizó mediante RMN, E.M.IE. e I.R. (espectros del 1-9). DAB IV*

-La fracción XL (51 - 58) presentó un sólido blanco muy escaso, se lavo con hexano, más adelante se obtuvo el punto de fusión y un espectro de R.M.N de la sustancia impura. (espectro 21) DAB V*

-Las fracciones restantes se trataron de separar mediante cromatografía de capa fina pero debido a que fueron demasiado impuras no hubo separación.

*Clave de identificación de las sustancias.

III
RESULTADOS
Y
ANALISIS

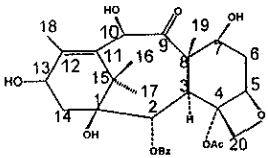
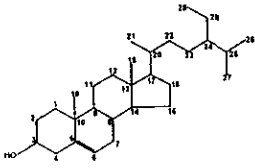
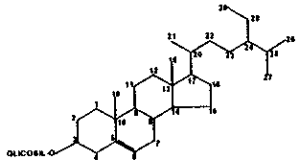
A pesar de que se obtuvieron una serie de sustancias, durante el transcurso del desarrollo experimental, desafortunadamente no fue posible la identificación de la mayoría ya que la cantidad y la pureza en la que se obtuvieron fue pobre, sin embargo se pudo determinar el punto de fusión y la cantidad respecto a la planta seca. A la mayoría de las sustancias obtenidas se les realizó su análisis de RMN¹H identificándose solamente a tres ellas.

El análisis de resultados comprobó que los compuestos identificados son: 10-desacetilbaccatina III (83.8mg[⊕], 30mg[⊕]), O-β-D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol (1200mg) y β-sitosterol (850.0mg).

En cuanto a las sustancias no identificadas, no se descarta la posibilidad de que algunas de estas puedan ser compuestos análogos de taxol ya que los espectros de RMN¹H (espectros 20-24) así lo indican, se evidenciaba que estas sustancias no corresponden a taxol, cefalomanina y 10-desacetilbaccatina III.

En el cuadro 8 se resumen los resultados de los compuestos identificados y en el cuadro 9 se incluyen los puntos de fusión y el % respecto a la planta seca de las sustancias no identificados.

Cuadro 8. Resumen de los resultados de los compuestos identificados

NOMBRE Y CLAVE DE IDENTIFICACIÓN Y FRACCIONES DE DONDE SE OBTUVO	ESTRUCTURA	P.F. °C	% PESO RESPECTO A LA PLANTA SECA
10-desacetilbaccatina DAB-IV IX, XXXVIII y XXXIX		245-248	0.0153 ^a 0.0015 ^a
β -sitosterol TX IV		135-136	0.0425
O- β -glucopiranosido del stigmast-5en-3ol DAB-II XIII y Fracc. MeOH		283-286	0.06

^a Los puntos de fusión no están corregidos ^b Obtenido en la primera parte experimental ^c Obtenido en la segunda parte experimental.

cuadro 9. Puntos de fusión, % respecto a la planta seca y cantidad obtenida de las sustancias no identificadas.

CLAVE DE LA SUSTANCIA Y FRACCIONES DE DONDE SE OBTUVO	P.F. °C	% EN PESO RESPECTO A LA PLANTA SECA CANTIDAD OBTENIDA (mg)
DAB-III X	148-152	0.00060, 12mg
DAB-V XXIX y XL	278-280	0.00052, 10.4mg
DAB-VI XVIII y XIX	263-270	0.00049, 9.8mg
DAB-VII XXXIV*	145-155	0.00070, 14 mg
DAB-VIII XXXIV*	133-138	0.00065, 13mg

* Se obtuvieron por cromatografía en capa fina

1. 10-desacetilbaccatina III

La 10-desacetilbaccatina III se aisló de la fracción IX en la primera columna y de las fracciones XXXVIII Y XXXIX en la segunda, obteniéndose en forma de un sólido blanco muy fino.

A. Análisis del espectro de RMN¹H

El análisis de los espectros 1 y 2 de RMN¹H con ayuda de los experimentos COSY y HETCOR (espectros 3, 4, 7 y 8)

En la zona comprendida entre δ 1.00-2.056 se observa tres singuletes los cuáles corresponden a metilos terciarios, entre estas señales existe una a δ 1.00 (s) que integra para seis hidrógenos, ésta señal es muy común observarla en los compuestos tipo taxano ya que representa al Me-16 y Me -17. Las señales a δ 1.72 y δ 2.05 (s), corresponden a los metilos terciarios, Me-19 y Me-18 respectivamente.

La señal localizada a δ 2.217 (s), corresponde al metilo del acetato, esta señal integra solo para 3 hidrógenos por lo tanto existe sólo un grupo acetato.

En δ 2.40 y δ 1.77 ppm se observan dos señales, que integran cada una para un hidrógeno, las cuáles son asignadas a los protones en posición α y β respectivamente en el C₆. La señal asignada al hidrógeno del C₃ se observa claramente como un doblete a 3.96 ppm.

Las señales a δ 4.45 y δ 4.19 se asignaron a los hidrógenos en posición α y β del C_{20}

Entre las señales anteriores se encuentra una a δ 4.25 (s), asignada al hidrógeno del C_7 .

A campo bajo se encuentran varias señales, una de ellas esta situada a δ 4.791 (s) que se asigno al hidrógeno en C_{13} que interacciona con los hidrógenos del C_{14} los cuales tienen su señal a δ 2.67 y corresponde a dos multipletes. A δ 4.98 se encuentra un dd que corresponde al hidrogeno del C_5 , la multiplicidad de esta señal es debida por la interacción con los hidrógenos en C_6 . También a campo bajo se encuentra una señal a δ 5.30 (s) correspondiente al hidrógeno del C_{10} , así mismo se observa otra señal a δ 5.60 que corresponde al hidrógeno del C_2 .

Las señales que van de δ 7.47 - 8.03 corresponden a los hidrógenos del anillo bencenico: δ 7.47 (m) corresponde a los hidrógenos en posición meta, δ 7.40 (m) a los hidrógenos en posición para y δ 8.03 (d) a los hidrógenos en posición orto.

A continuación en la tabla 1 se agrupan los datos obtenidos del espectro de RMN^1H en comparación con los obtenidos para la muestra estándar de 10-desacetilbaccatina III. (espectro 25).

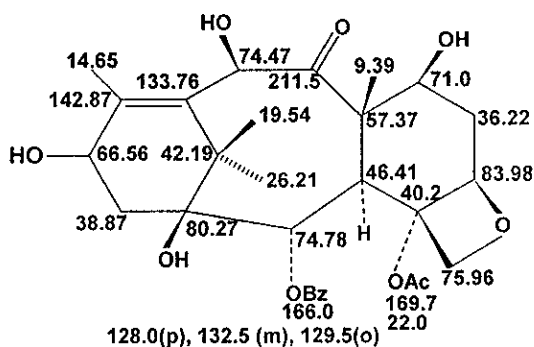
TABLA I.

No.de Carbono	10-desacetilbaccatina III (δ)	10-desacetilbaccatina III (δ)
	Estandar	
C-2	5.53 (d)	5.6 (d, J=7.2)
C-3	3.88 (d)	3.96 (d, J=7.2)
C-5	4.99 (dd)	4.98 (d, J=8.1)
C-6α	2.52 (m)	2.40 (d, J=13)
C-6β	1.77 (m)	1.77 (dd, J=8 y 13)
C-7	4.18 (m)	4.25 (br s)
C-10	5.23 (s)	5.30 (s)
C-13	4.73 (dd)	4.79 (br s)
C-14α	2.23(dd)	2.67 (m)
C-14β	2.23 (dd)	2.67 (m)
C-16-Me	1.08 (s)	1.00 (s)
C-17-Me	1.08 (s)	1.00 (s)
C-18-Me	1.98 (s)	2.05 (s)
C-19-Me	1.64 (s)	1.72 (s)
C-20α	4.44 (d)	4.45 (d, J=7)
C-20β	4.13 (d)	4.19 (d, J=7)
Obz (orto)	8.03 (dd)	8.03 (d, J=8.2)
Obz (meta)	7.52 (m)	7.47 (m)
Obz (para)	7.40 (m)	7.40 (m)
OAc	2.217 (s)	2.217 (s)

B. Análisis del espectro de RMN¹³C

El espectro 5 de RMN¹³C se analizó junto con el espectro 6 de RMN¹³C (DEPT) y el espectro obtenido del experimento HETCOR (espectros 7 y 8). En la tabla 2 se agrupan los datos obtenidos en comparación con el estándar. (espectro 26)

A continuación se presenta la estructura de la 10-desacetilbaccatina III con los valores de RMN¹³C correspondientes a cada uno de los carbonos.



10-desacetilbaccatina III con los valores de RMN^{13}C correspondientes.

TABLA 2. Datos obtenidos del espectro de RMN^{13}C para 10-desacetilbaccatina III en comparación con los del estándar.

No. de Carbono	10-desacetilbaccatina III (δ) Estándar	10-desacetilbaccatina III (δ)
C-1	80.13	80.27
C-2	79.65	74.78
C-3	46.30	46.41
C-4	40.05	40.20
C-5	83.89	83.98
C-6	36.12	36.22
C-7	70.89	71.01
C-8	57.24	57.37
C-9	211.42	211.50
C-10	74.36	74.47
C-11	133.60	133.76
C-12	142.83	142.87
C-13	66.40	66.56
C-14	38.78	38.87

C-15	42.09	42.19
C-16	20.48	19.54
C-17	26.11	26.21
C-18	14.59	14.65
C-19	9.31	9.39
C-20	75.86	75.96
C=O del Bz	165.84	166.0
Benz.	127.8-132.64	128.0-132.50
C=O del Ac	169.63	169.7
Ac-CH ₃	21.99	22.06

HETCOR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$: 5.60/74.78, 3.96/46.41, 4.98/83.98, 2.40 y 1.77/36.22, 4.25/71.01, 5.30/74.47, 4.79/ 66.50, 2.67/38.87, 1.00/19.54 y 26.21, 2.05/14.65, 1.72/9.39, 4.45 y 4.19/75.96, 8.03/129.50, 7.45/132.50, 7.40/128.0 y 2.28/22.6.

C. Análisis del espectro de IR

Según lo reportado en la literatura⁴ el espectro de IR casi no aporta información ya que este tipo de moléculas casi no muestran absorción en el rango del IR (400 a 4000 nm).

En el espectro 9 de IR que se observa una banda ancha entre 3400-3500 puede pensarse que corresponde a grupos -OH ya que la molécula cuenta con varios de estos. Entre 1700-1750 se observa una señal de intensidad fuerte que seguramente corresponde algún grupo carbonilo. Existen otro tipo de señales las cuáles no se pueden analizar debido a la falta de información en el espectro.

El peso molecular es de 543g/mol, el cual corresponde con el reportado para 10-desacetilbaccatina III.

2. O- β -D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol y β -sitosterol

Se decidió analizar a estas dos sustancias en conjunto debido a que comparten estructuras similares, se trata de compuestos pertenecientes al grupo de los esteroides los cuales cuentan con un esqueleto fundamental correspondiente al ciclopentano perhidrofenantreno y una cadena lateral a la cuál se le pueden insertar grupos metilo o etilo particularmente en C₂₄, además casi todos cuentan con un grupo OH en C₃.

El O- β -D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol se aisló de las fracciones XIII, (segunda parte) y de las fracciones metanólicas, se presentó como un sólido verdoso amorfo insoluble en hexano y en metanol por lo que no fue posible obtenerlo puro.

El β -sitosterol se aisló de la fracción IV (segunda parte), se presentó como cristales en forma de aguja, insoluble en hexano y soluble en CH₂Cl₂.

Estas sustancias ya habían sido aisladas de otras plantas lo que facilitó su identificación gracias a los datos reportados en la bibliografía ^{16, 24, 39}.

A. Análisis de los espectro de RMN¹H (espectros 10 y 15)

Si se observa en el espectro 15 del β -sitosterol a campo bajo existe una señal a δ 5.31 (dd, 4.8) la cual integra para un protón, y que de acuerdo con su desplazamiento, es un protón vinílico. Esta señal también aparece en el espectro 10 del O- β -D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol sólo que su desplazamiento es de δ -4.20 (dd, 7.69) por la presencia del azúcar.

En el espectro del compuesto glicosilado aparecen una serie de señales que van de δ 2.84- 3.64 (m), estas señales pertenecen a los hidrógenos que son base de los grupos hidroxilo de la glucosa. En el espectro del β -sitosterol sólo aparece una señal a δ 3.54 (m) la cual corresponde al hidrogeno base del grupo hidroxilo.

En ambos espectros de δ 0.69-1.02 aproximadamente aparece una serie de señales que se supone son para metilos que se pueden asignar a un estero.

En el espectro del O- β -D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol aparece una señal ubicada a δ 5.31 parece ser un singulete que integra para un protón el cual pertenece al carbono anomérico por el desplazamiento que presenta.

En el caso del β -sitosterol las señales concuerdan con las reportadas en la bibliografía¹⁶ para la molécula de β -sitosterol, tabla 3

TABLA 3.

Hidrógeno	β -sitosterol (reportado) ¹⁶	β -sitosterol (obtenido)
H-18	0.680	0.697
H-19	1.007	1.025
H-21	0.919	0.927
H-26	0.833	0.841
H-27	0.813	0.819
H-29	0.842	0.863
H-3	4.520	3.54
H-5	5.350	5.31

B. Análisis de los espectros de RMN¹³C (espectros 11, 12, 16 y 17)

Las señales que aparecen en el espectro del β -sitosterol son similares a las del espectro del O- β -D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol, las diferencias que se observan entre un espectro y otro son que para el espectro del compuesto glucosilado aparece una señal a δ 100.83 que corresponde al carbono anomérico además de las señales δ 61.07, 70.07, 73.45, 76.73, 76.95 que corresponden a carbonos de la unidad glucosídica.

En la tabla 4 se agrupan los desplazamientos químicos para el β -sitosterol y para el O- β -D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol comparados con los valores reportados para el β -sitosterol.^{41, 39, 13, 26}

TABLA.4

No de C	β -sitosterol (reportados) ^{26, 13}	β -sitosterol	O- β -D- glucopiranosido del stigmast-5en-3ol
C-1	37.33	37.22	36.81
C-2	31.69	31.64	31.68
C-3	71.73	71.78	70.07
C-4	42.20	42.3	45.13
C-5	140.71	140.79	140.47
C-6	121.63	121.70	121.18
C-7	31.96	31.87	31.38
C-8	31.91	31.87	31.38
C-9	50.13	50.12	49.59
C-10	36.43	36.47	35.46
C-11	21.09	21.03	20.57
C-12	39.79	31.75	38.30
C-13	42.37	42.28	41.83
C-14	56.75	56.75	56.17
C-15	24.15	24.25	23.82
C-16	28.25	28.18	28.69
C-17	56.02	56.05	56.06
C-18	11.84	11.8	11.62
C-19	19.46	19.33	19.66
C-20	36.07	36.09	36.17
C-21	18.68	18.72	18.58
C-22	33.95	33.92	33.34
C-23	26.10	26.07	25.42
C-24	45.82	45.82	45.13
C-25	29.15	29.15	29.24
C-26	19.77	19.75	19.05
C-27	19.21	18.98	18.90
C-28	23.13	23.07	23.82
C-29	11.9	11.91	11.73
C'-6			61.07
C'-1			100.83

C. Análisis de los espectros de IR (espectros 13 y 18)

En ambos espectros se observa una banda ancha que va de 3650-3200, que indica la presencia de grupos -OH la cuál se confirma al ver la señal que aparece en 1100-1020, también en los dos espectros aparece una banda entre 3000-2850 que indica que hay CH saturado esto se confirma con las señales que van de 1350-1470 señales probables para CH_3 - y $-\text{CH}_2$ -.²⁶

Por lo que respecta a l espectro de masas del β -sitosterol (espectro 19) sobresale una señal a 414, es el ion molecular (m/z) que corresponde al peso molecular en la literatura.⁹

En lo que corresponde al O- β -D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol (espectro 14) tiene un peso molecular de 576.855 el cual corresponde al reportado en la literatura^{26, 25}

Los puntos de fusión también fueron comparados ver la tabla 5

Tabla 5.

Sustancia	P.f. reportado °C	P.f °C de las sustancias obtenidas
β -sitosterol	135-137 ²⁶	134-137
O- β -D-glucopiranosido del stigmast-5en-3ol	280-286 ²¹	283-286

²⁶ Devon 1972, ²¹ Martha I

V. CONCLUSIONES

Se logró aislar 8 sustancias de las cuales sólo fueron identificadas tres: el β -sitosterol, el o- β -glucopiranosido del stigmast-5en-3ol y la 10-desacetilbaccatina III, estas tres sustancias ya han sido aisladas de otras fuentes^{4, 44, 7, 36, 3, 26, 25, 42, 21} sin embargo es la primera vez que se aíslan de *T. globosa*, por lo que este trabajo representa un gran avance en el estudio de la especie.

Es conocida la actividad farmacológica del β -sitosterol, un compuesto con actividad antiinflamatoria^{1, 36, 15, 14} además de que existen otros trabajos en los cuales dan a conocer la actividad antipirética¹⁴, antibacteriana⁴², así como la inhibición de la agregación plaquetaria.³⁶

Revisando lo reportado para el estigmast-5en-3ol-3 β -o-glucopiranosido se encontro que posee actividad antiinflamatoria^{1, 15}, además de que es usado en el tratamiento de hipertrofia prostática bajo el nombre de ipuranol. Por otro lado se encontro que el stigmast-7,22-dieno-3 β -O-glucosido tiene actividad diurética⁴³ por lo que podría pensarse que el compuesto aislado cuente con la misma actividad, esto explicaría su uso en la medicina tradicional en lo que se refiere a enfermedades renales.

En cuanto a la 10-desacetilbaccatina III fue el único compuesto análogo al taxol que se pudo aislar, considerando su importancia se tiene que cuenta con poca actividad antineoplásica, $DL50 (\mu g/ml) = 1.0$,⁸ la ventaja es que esta sustancia se encontro en cantidades razonables en el follaje (83.8mg para 548g y 30mg para 2kg) lo que concuerda con lo reportado para otras especies de *taxus*^{4, 7}, con este resultado se puede presumir que a futuro esta sustancia pueda emplearse para obtener taxol a

partir de semisíntesis como se hace con las cantidades obtenidas de *T. Baccata*^{4, 7, 6}, lo que no causaría daños ecológicos en la especie.

Respecto a las cantidades obtenidas de 10-desacetibaccatina III se puede justificar si se toma en cuenta el tiempo de preparación de uno y otro extracto, el extracto usado en la primera parte experimental se fraccionó enseguida de su preparación y el extracto usado en la segunda parte se fraccionó después de 1 año de su preparación; esta diferencia de tiempo pudo haber causado degradación de los compuestos contenidos en el extracto luego de su preparación, otra causa que no hay que descartar es la posición en la que se encontraba el material vegetal antes de ser cortado del árbol ya que según estudios^{44, 33} existen diferencias en el contenido de Taxol que dependen de la cantidad de luz que reciba un árbol y otro, esta causa podría suceder también en el caso de la 10-desacetilbaccatina III.

Desafortunadamente no fue posible aislar taxol, anteriormente ya se habían hecho algunos estudios previos de un extracto de *T. globosa* como parte del comienzo de esta investigación, los estudios consistieron en analizar extractos (uno a partir de follaje y otro de corteza) en paralelo con el estándar de taxol mediante HPLC para tener una idea de si la especie lo contenía, esto dio como resultado la presencia de taxol en ambos extractos sólo que la concentración en la corteza fue más alta que en el follaje, ésto marcó la pauta para aislarlo del follaje. Después de haber valorado el follaje en cuanto al contenido de sus metabolitos secundarios resulta que no se encontro taxol debido a la baja concentración en la que se encuentra, esto concuerda

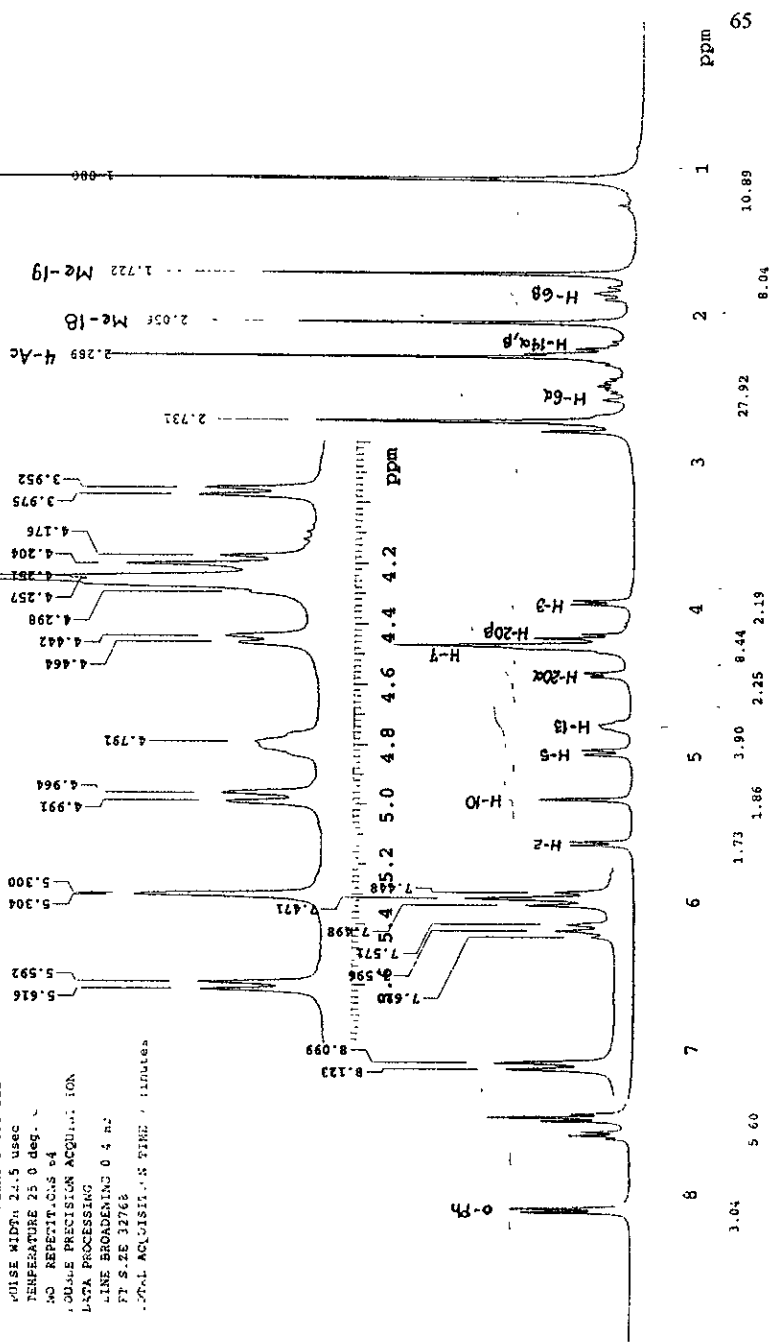
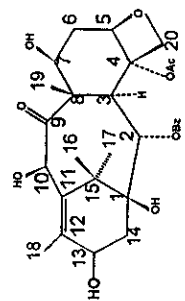
con el estudio previo, o tal vez no está realmente contenido en la especie ya que durante el desarrollo del estudio fitoquímico nunca se encontro algún indicio de este.

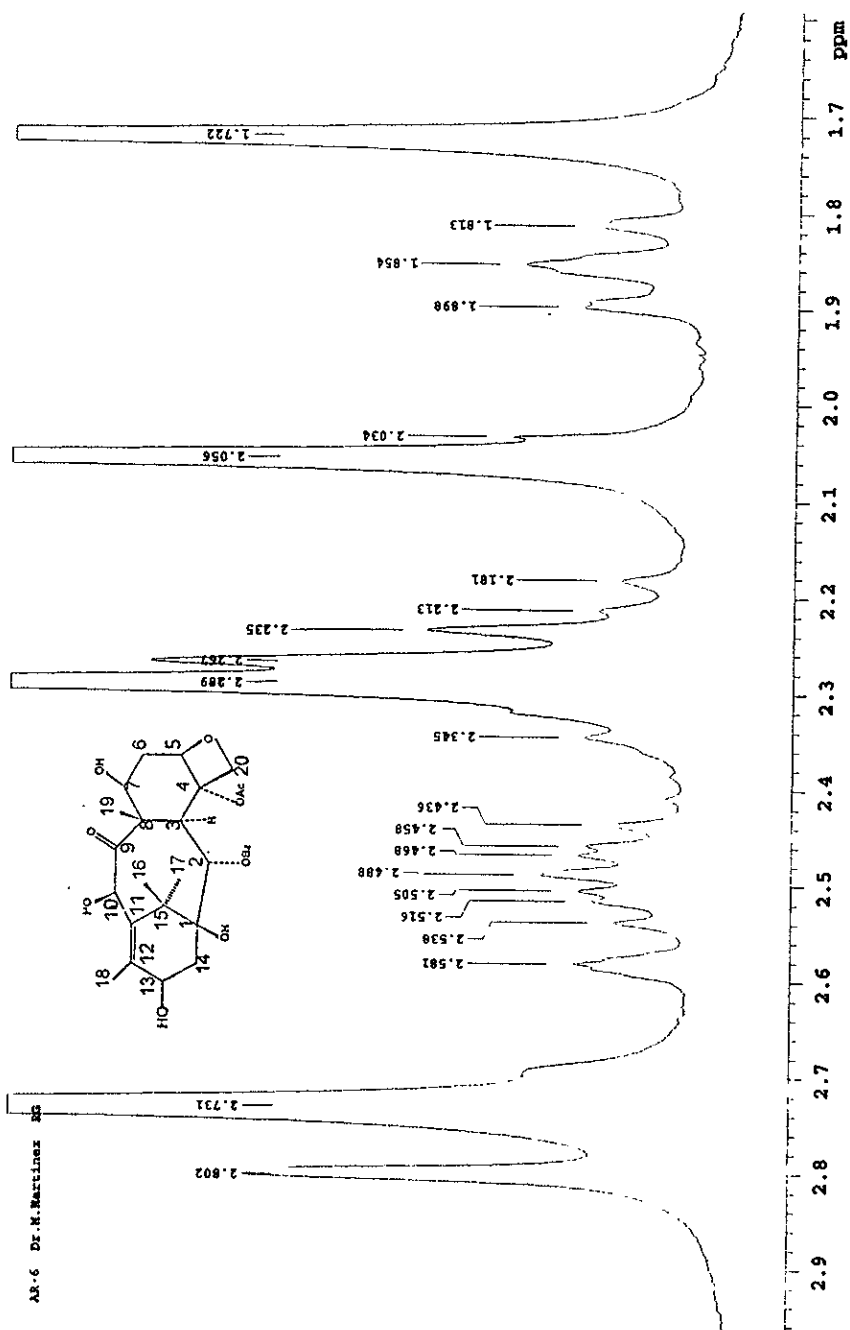
Aunque no se pudieron aislar taxol y cefalomannina si se aislaron otras sustancias de las cuales, por la minima cantidad obtenida sólo fue posible tomar el punto de fusión y obtener un espectro de RMN¹H (espectros del 20-24) de algunas de las sustancias impuras, con lo que no fue posible su identificación solo se compararon los espectros con los de de taxol⁷ (espectro 27) y 10-desacetilbaccatina III (espectro 25) lo que hace pensar de que en algunos casos se trata de compuestos análogos a estos pero que de acuerdo con los puntos de fusión que presentan no se trata de ninguno de los ya aislados.⁷ Posiblemente pueda tratarse de productos de degradación de otras sustancias.

Con este trabajo se da un gran avance en el estudio de la especie de *T globosa* lo que ayuda a enriquecer la escasa literatura que existe sobre la especie. También este estudio contribuyo con la sociedad ya que con el análogo encontrado se puede obtener taxol y taxotere (medicamento semisintetizado a partir de 10 desacetilbaccatina III^{6, 4}) esto gracias a que se encuentra en concentraciones razonables en el follaje.

IV. ESPECTROS

P. 6 Dr. A. Karimzadeh AG
 GUSEVE R1
 FREQUENCY 299.348 MHz
 SPECTRAL WIDTH 2998.5 Hz
 ACQUISITION TIME 4.001 h.c
 RELAXATION DELAY 3.000 sec
 PULSE WIDTH 22.5 usec
 TEMPERATURE 25.0 deg. C
 NO. REPEATS 64
 GADOLINUM PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.4 Hz
 FT SIZE 32768
 TOTAL ACQUISITION TIME 1 minute





AR-6 Dr. M. Martinez RG
PULSE SEQUENCE relay/h
OBSERVE H1

FREQUENCY 299.949 MHz
SPECTRAL WIDTH 2998.5 Hz
2D SPECTRAL WIDTH 3998.5 Hz
ACQUISITION TIME 0.342 sec
RELAXATION DELAY 1.000 sec
PULSE WIDTH 45.0 usec
FIRST PULSE WIDTH 45.0 usec
TEMPERATURE 25.0 deg. C.

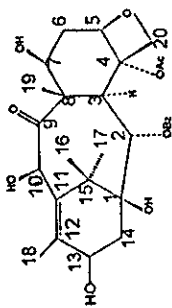
NO. REPEATS 8
NO. INCREMENTS 156

DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING

SINE BEL 0.171 sec
FT SIZE 2048

F1 DATA PROCESSING
SINE BEL 0.043 sec
FT SIZE 2048

TOTAL ACQUISITION TIME 51 minutes

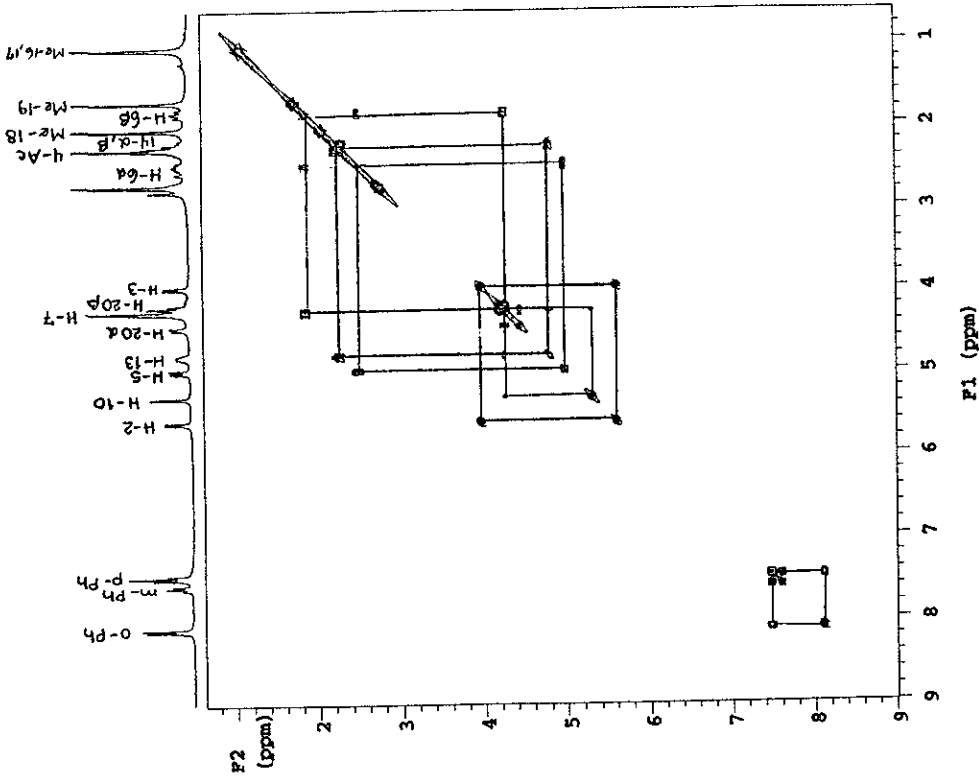


O-Ph
m-Ph
p-Ph

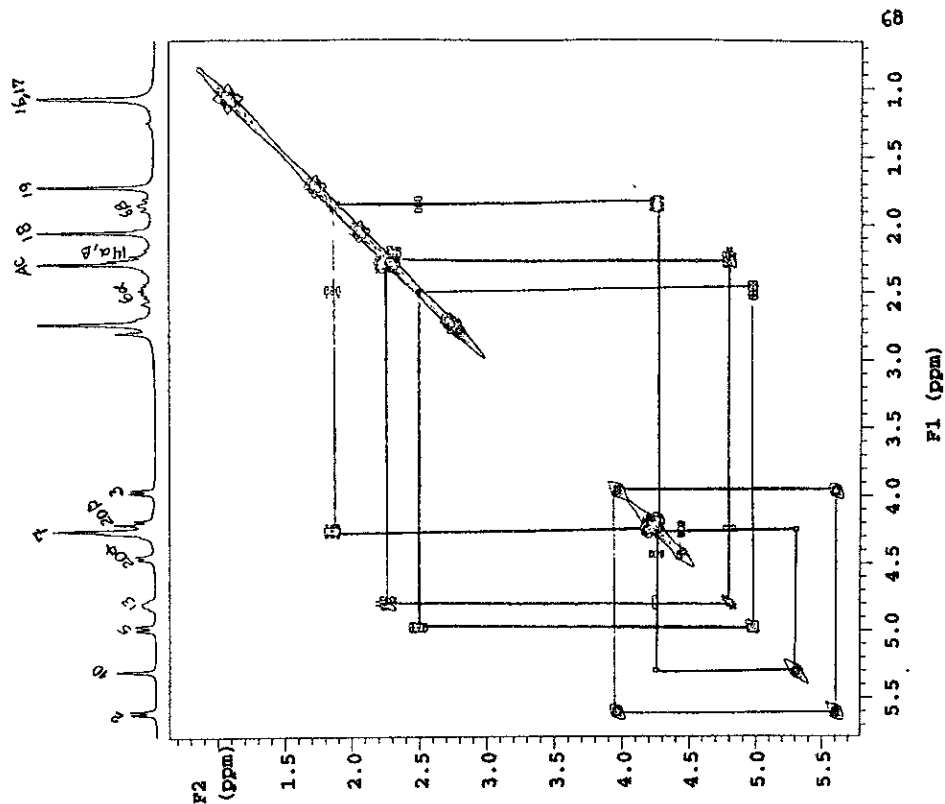
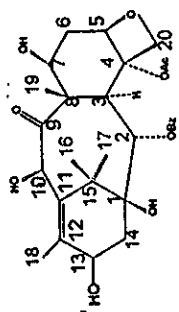
20 α
13
5
10
2
4
20 β
3

14 α, β
16
19

16, 17



16,17



AR-6 Dr. N. Martinez RG

OBSERVE C13

FREQUENCY 75.429 MHz

SPECTRAL WIDTH 18001.8 Hz

ACQUISITION TIME 0.400 sec

RELAXATION DELAY 0.600 sec

PULSE WIDTH 7.8 usec

TEMPERATURE 25.0 deg. C.

NO. REPEATITIONS 5280

DECOUPLE H1

HIGH POWER 38

DECOUPLER CONTINUOUSLY ON

MULTI6 MODULATED

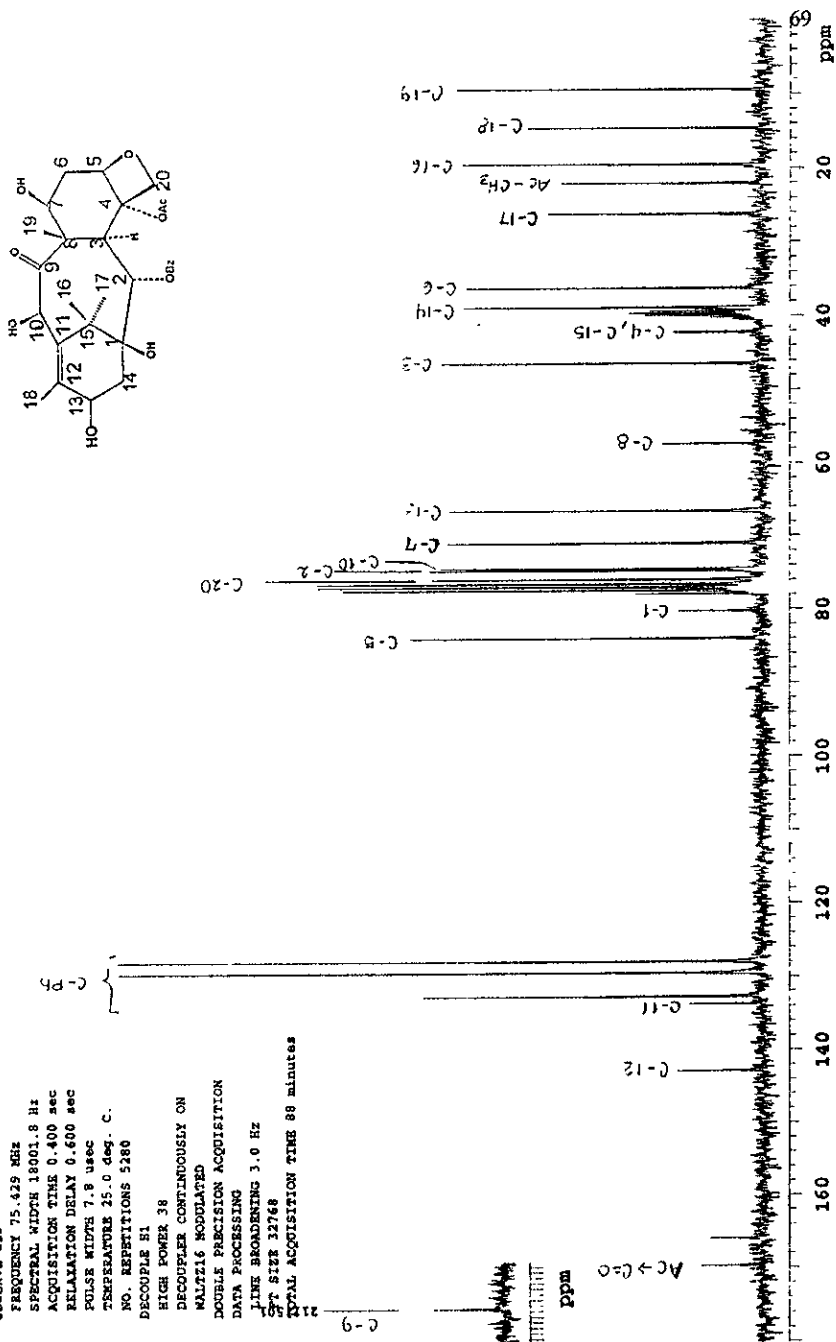
DOUBLE PRECISION ACQUISITION

DATA PROCESSING

LINE BROADENING 3.0 Hz

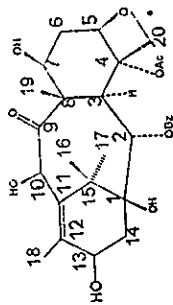
FFT SIZE 32768

TOTAL ACQUISITION TIME 88 minutes

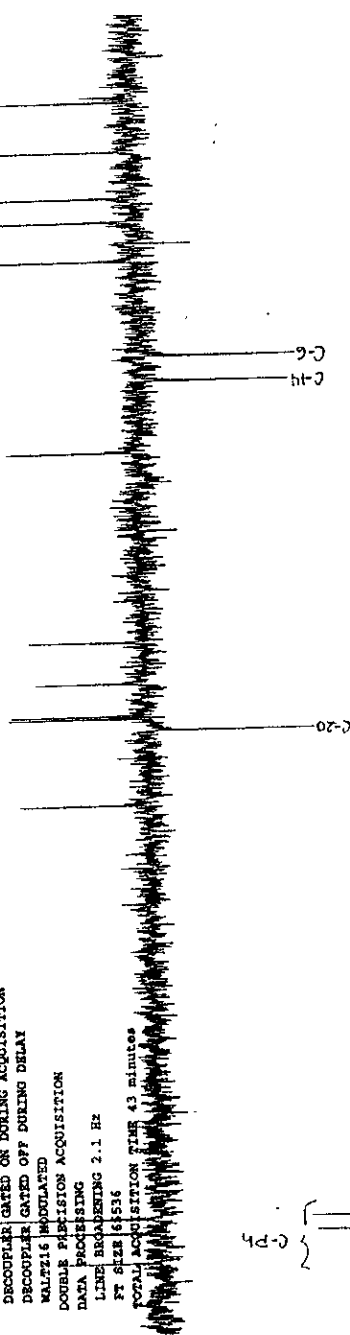


AR-6 Dr. M. Martinez RG
 PULSE SEQUENCE de'vt
 OBSERVE C13
 FREQUENCY 75.428 MHz
 SPECTRAL WIDTH 12266.2 Hz
 ACQUISITION TIME 0.605 sec
 RELAXATION DELAY 2.000 sec
 PULSE WIDTH 7.8 usec
 TEMPERATURE 25.0 deg. C.
 NO. REPTITIONS 496
 DECOUPLE H1

HIGH POWER 38
 DECOUPLE GATED ON DURING ACQUISITION
 DECOUPLE GATED OFF DURING DELAY
 MALZIS MODULATED
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE RESOLVING 2.1 Hz
 FT SIZE 16536
 TOTAL ACQUISITION TIME 43 minutes



C-19
 C-18
 C-16
 Ac-CH₃
 C-17



C-15

AL-6 Dr. M. Martinez RG

PULSE SEQUENCE hetero

OBSERVE C13

FREQUENCY 75.428 MHz

SPECTRAL WIDTH 12266.2 Hz

2D SPECTRAL WIDTH 2998.5 Hz

ACQUISITION TIME 0.083 sec

RELAXATION DELAY 1.000 sec

PULSE WIDTH 7.8 usec

TEMPERATURE 25.0 deg. C.

NO. REPTITIONS 289

NO. INCREMENTS 128

DECOUPLE H1

HIGH POWER 38

DECOUPLER GATED ON DURING ACQUISITION 9-D

DECOUPLER GATED OFF DURING DELAY 11-D

MAGNETIC MODULATED

DOUBLE PRECISION ACQUISITION 2-D

DATA PROCESSING

GAUSSIAN APODIZATION 0.041 sec

FT SIZE 2048

F1 DATA PROCESSING

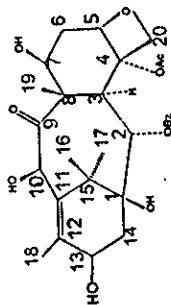
GAUSSIAN APODIZATION 0.024 sec

FT SIZE 4096

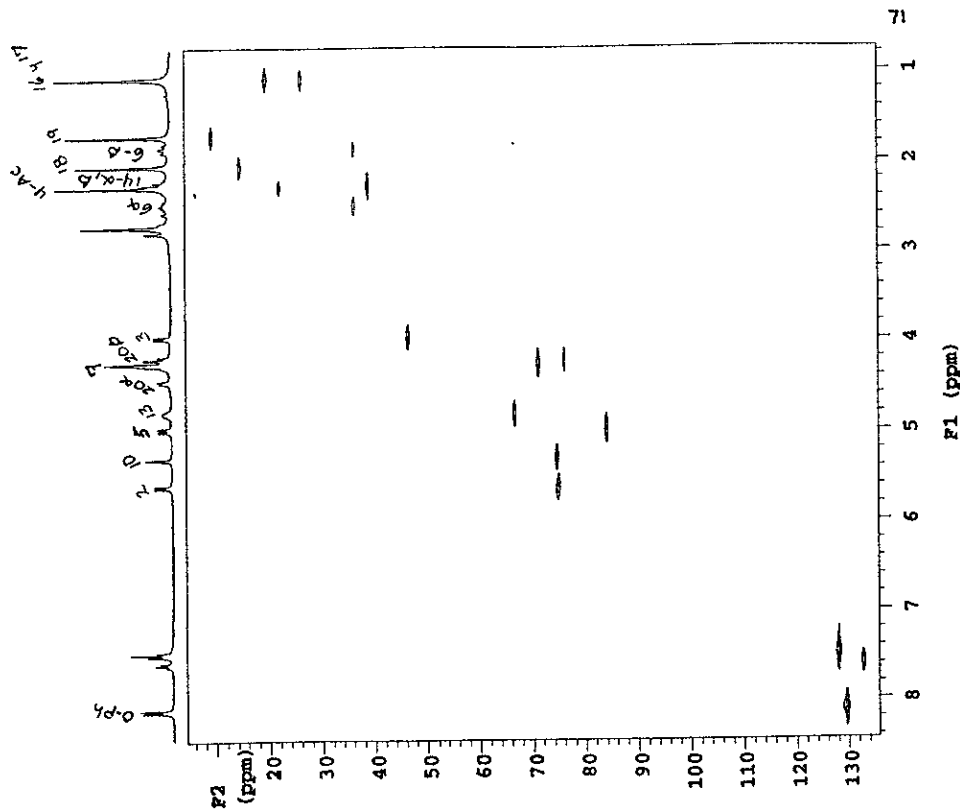
TOTAL ACQUISITION TIME 11.5 hours

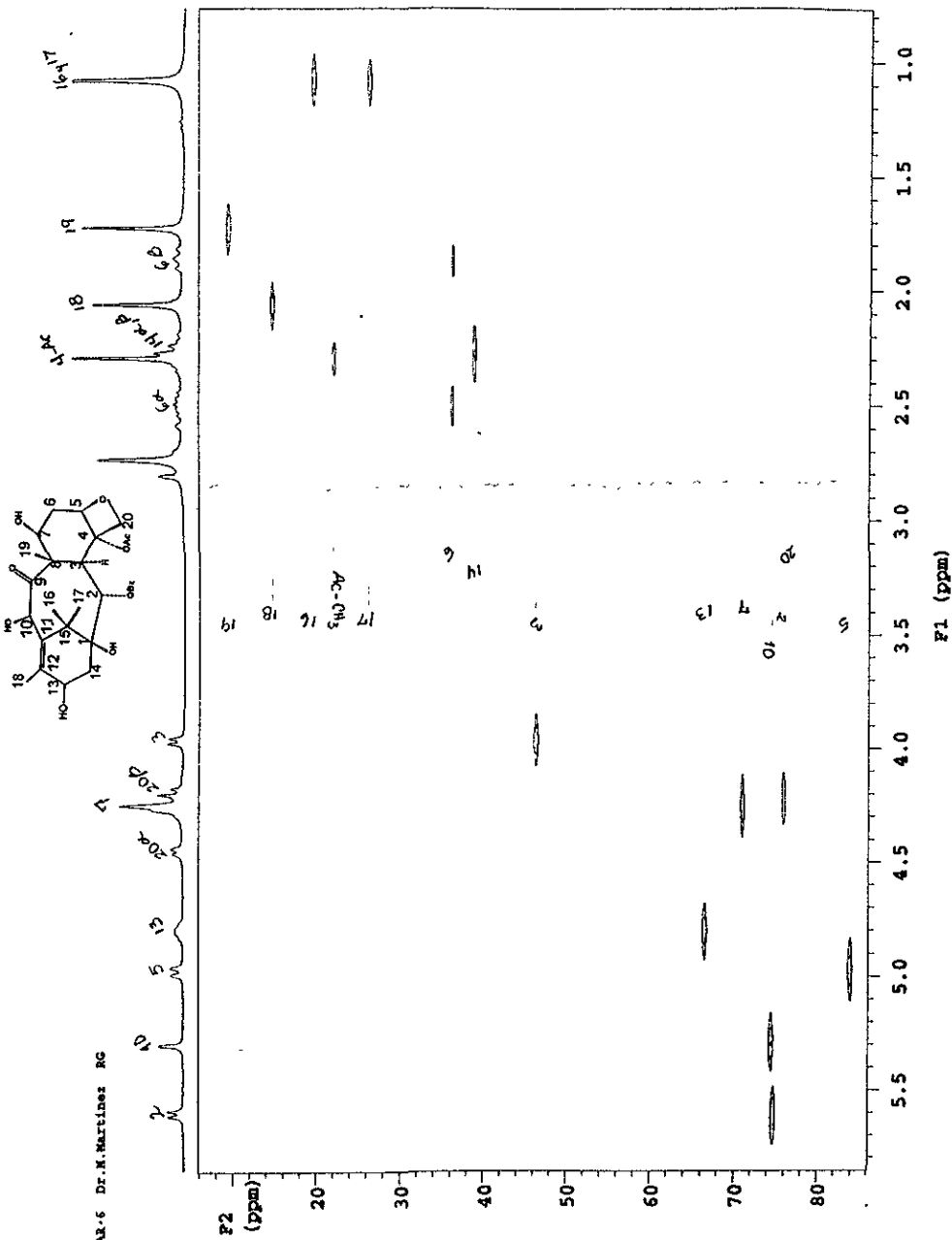
6-7 2-3 01-D 2-3 02-D

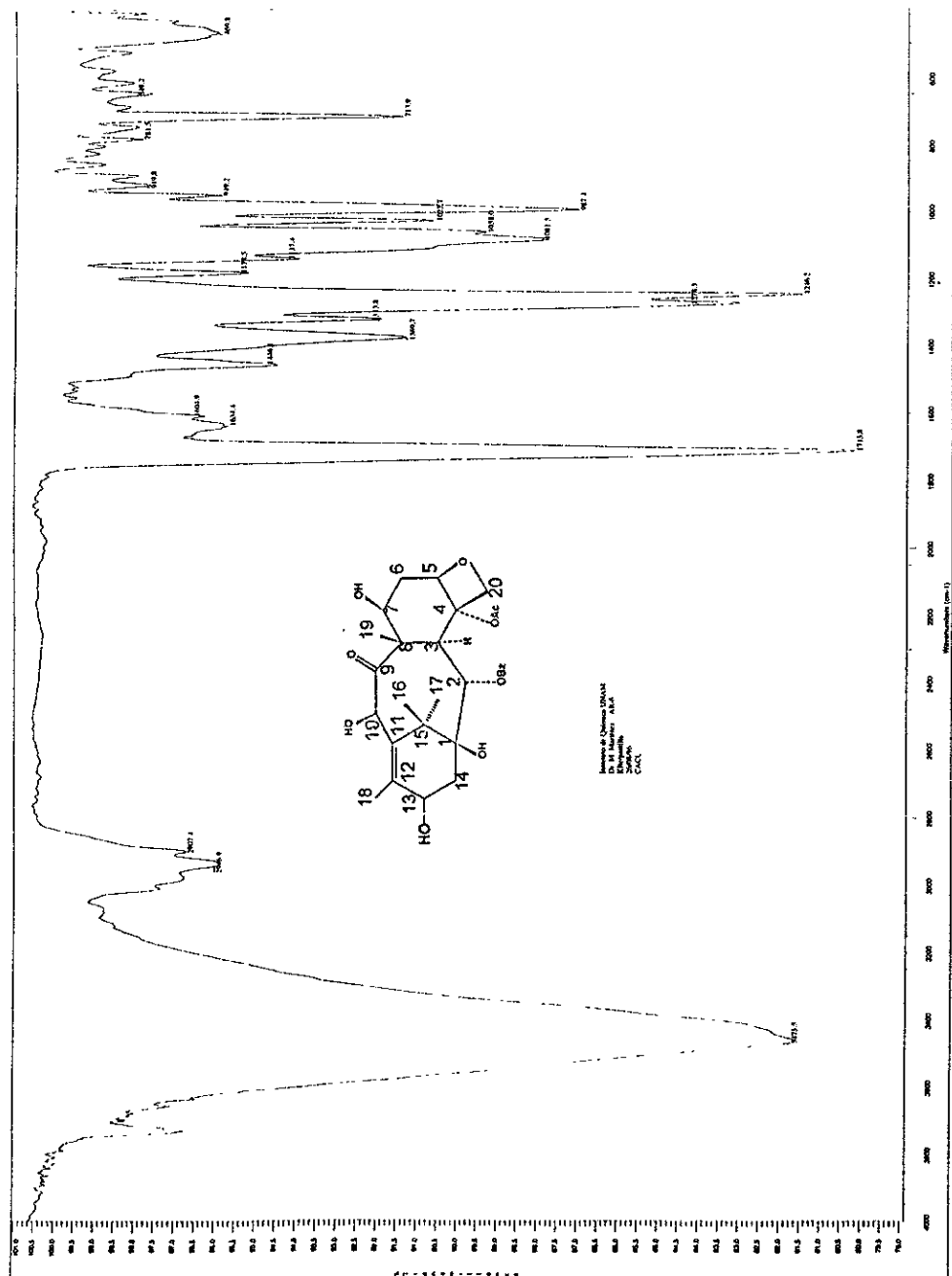
S-D



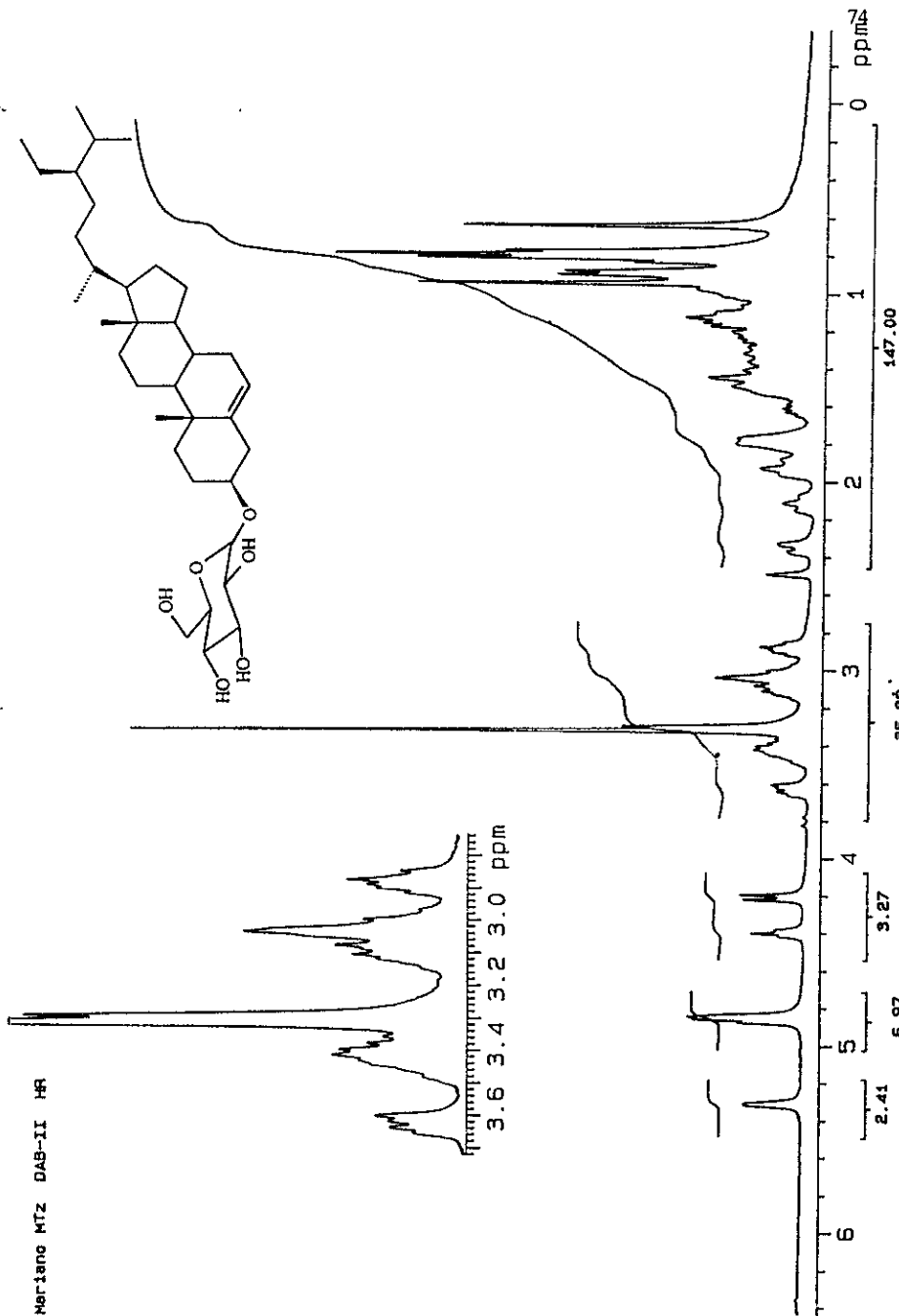
4D-D



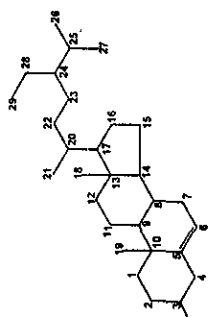




Merlane MTZ DAB-II HR

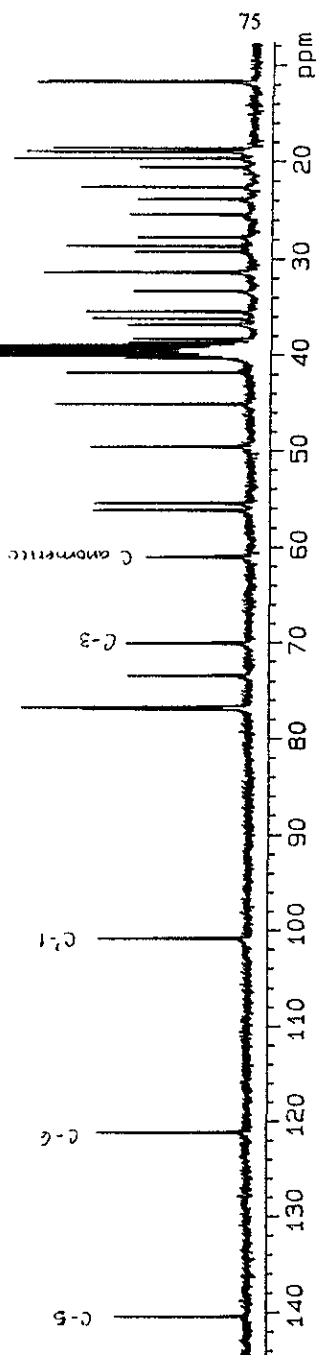


Mariano MTz DAB-II HH

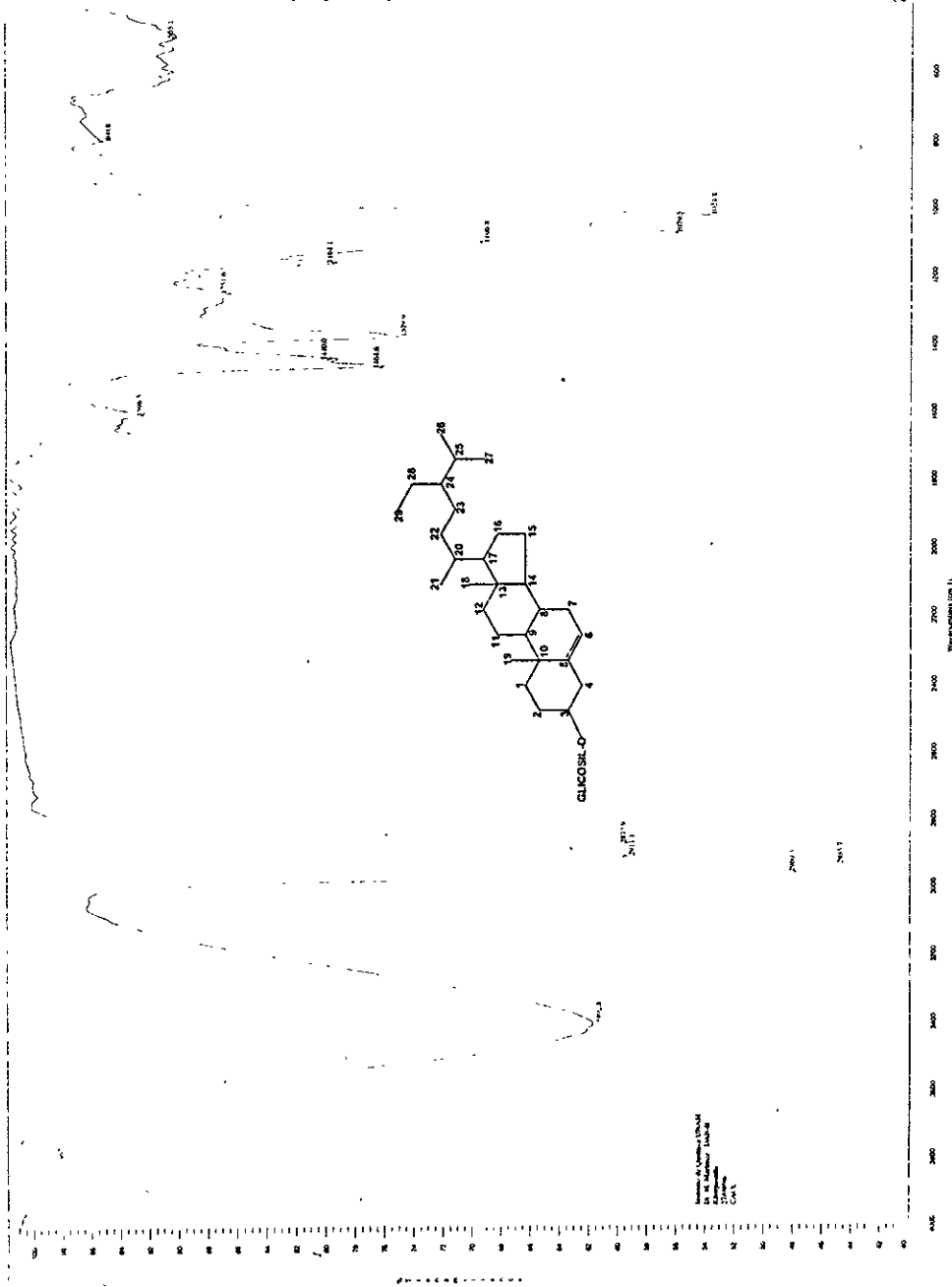


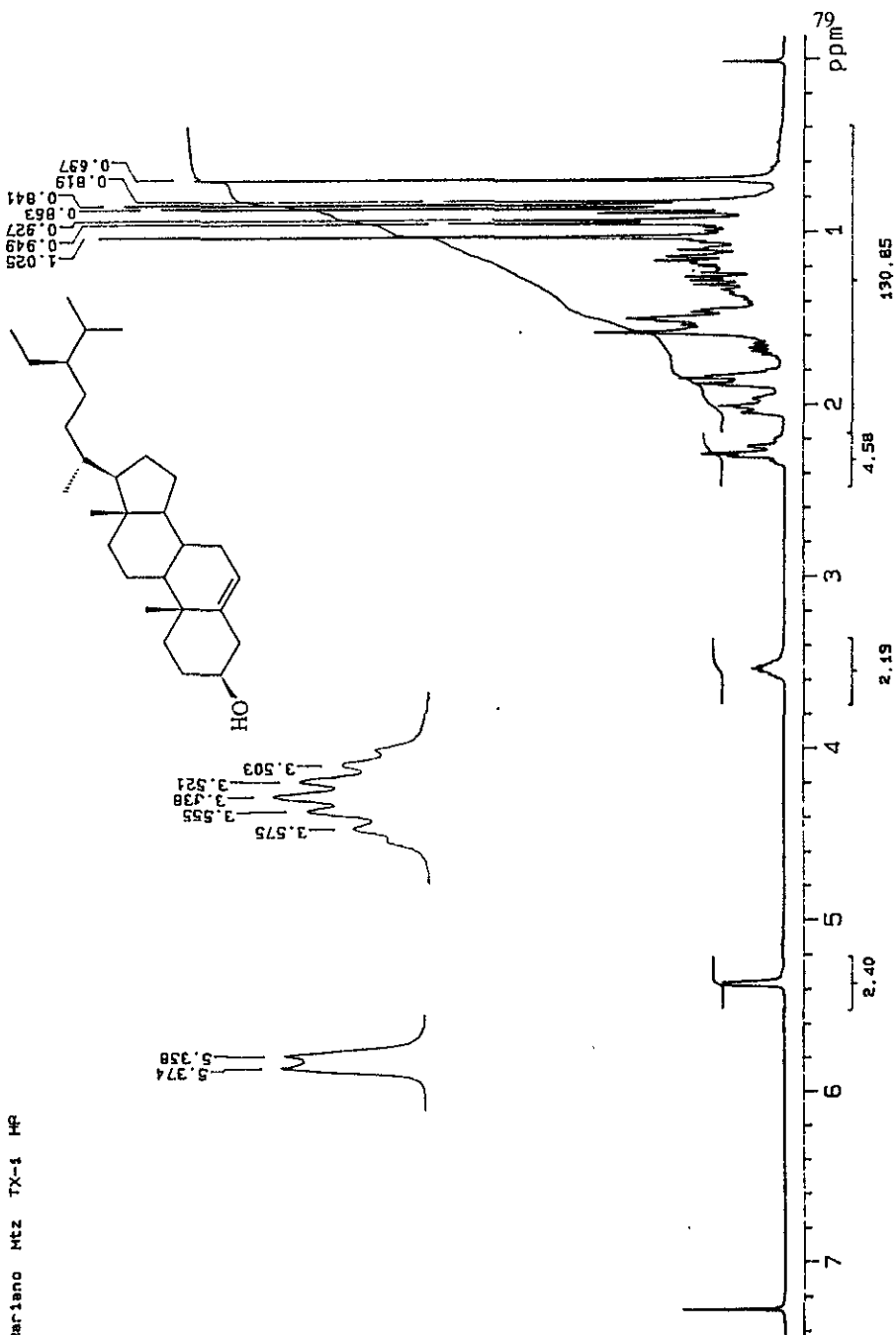
19.049
18.904
18.583

76.949
76.731

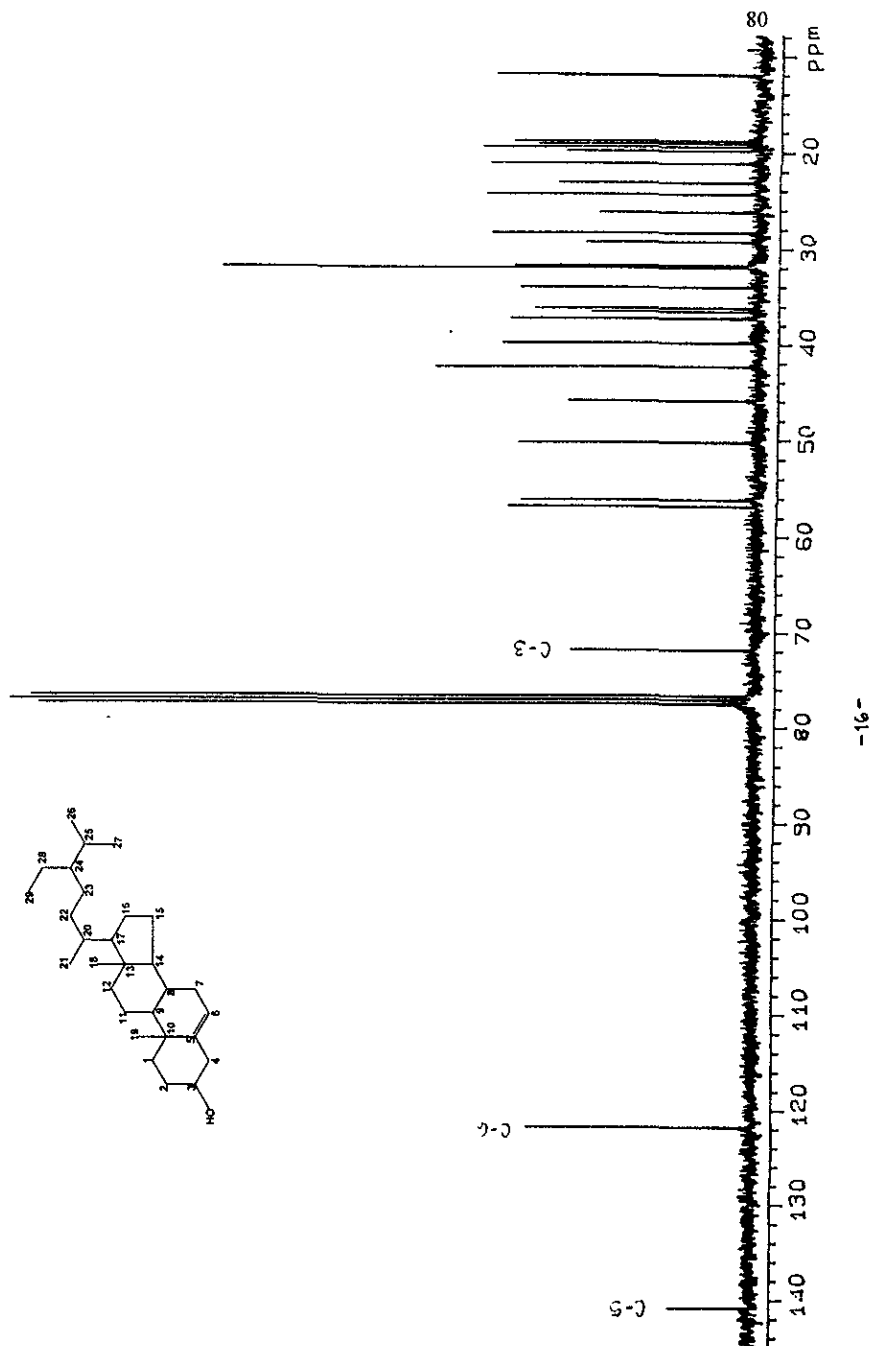


-11-

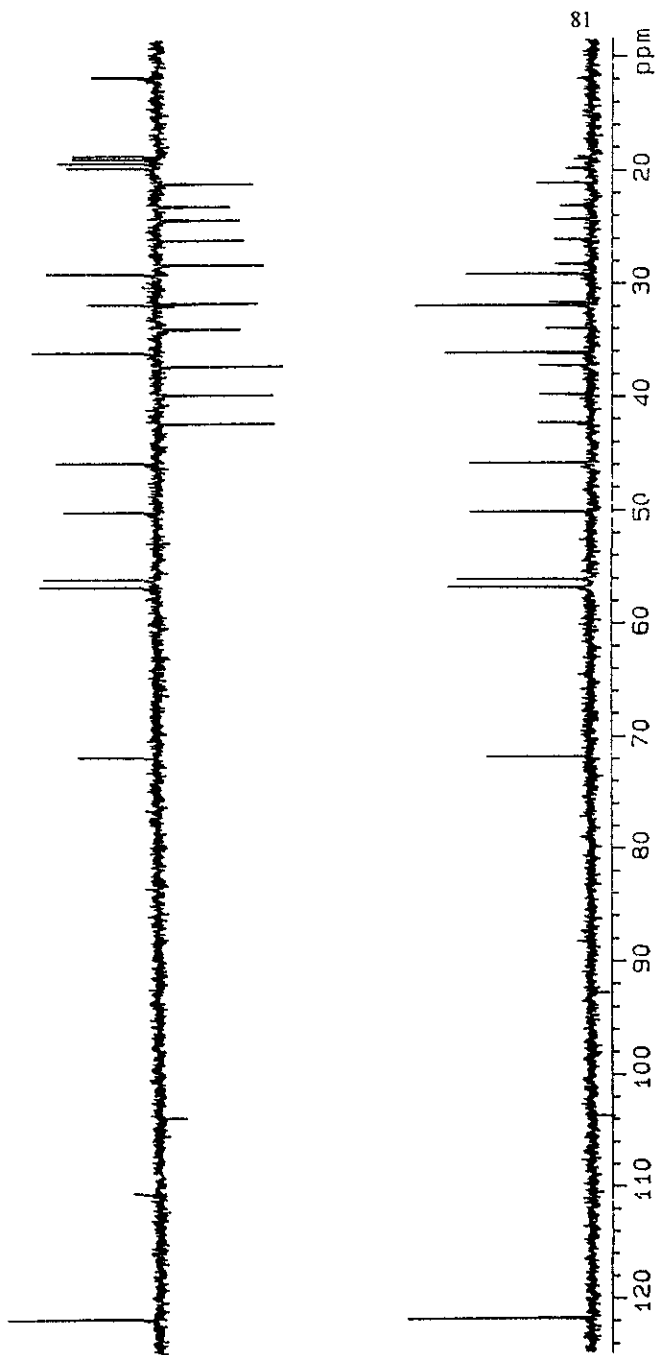
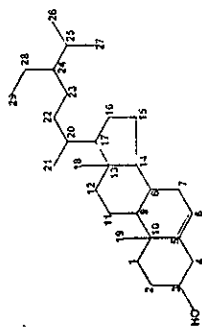


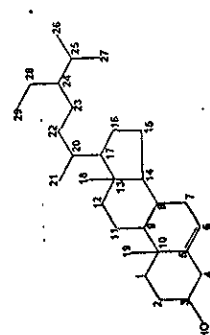


Mar 18 00 Mtz TX-1 HR



Mar18nc Mtz TX-1 HR





Structure of Compound 10 (Methyl 17-
hydroxy-5 α -pregnen-20-one
acetate)
C₂₇H₄₄O₃

Peak 1
3000

Peak 2
3000

Peak 3
3000

m/z	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000	2100	2200	2300	2400	2500	2600	2700	2800	2900	3000	3100	3200	3300	3400	3500	3600	3700	3800	3900	4000																																							
Intensity	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400

[Mass Spectrum]

Data : Martinez-M

Sample: Tx-1

Note : Dr-Mariano-Mtz-RX505

Inlet : Direct

Spectrum Type : Regular (MF-Linear)

RT : 1.20 min Scan# : (30,39)

BP : m/z 414.0000 Int. : 204.89

Output m/z range : 33.0000 to 468.0430

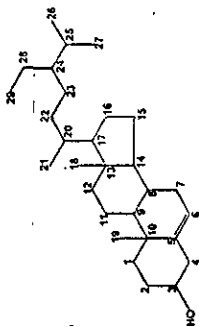
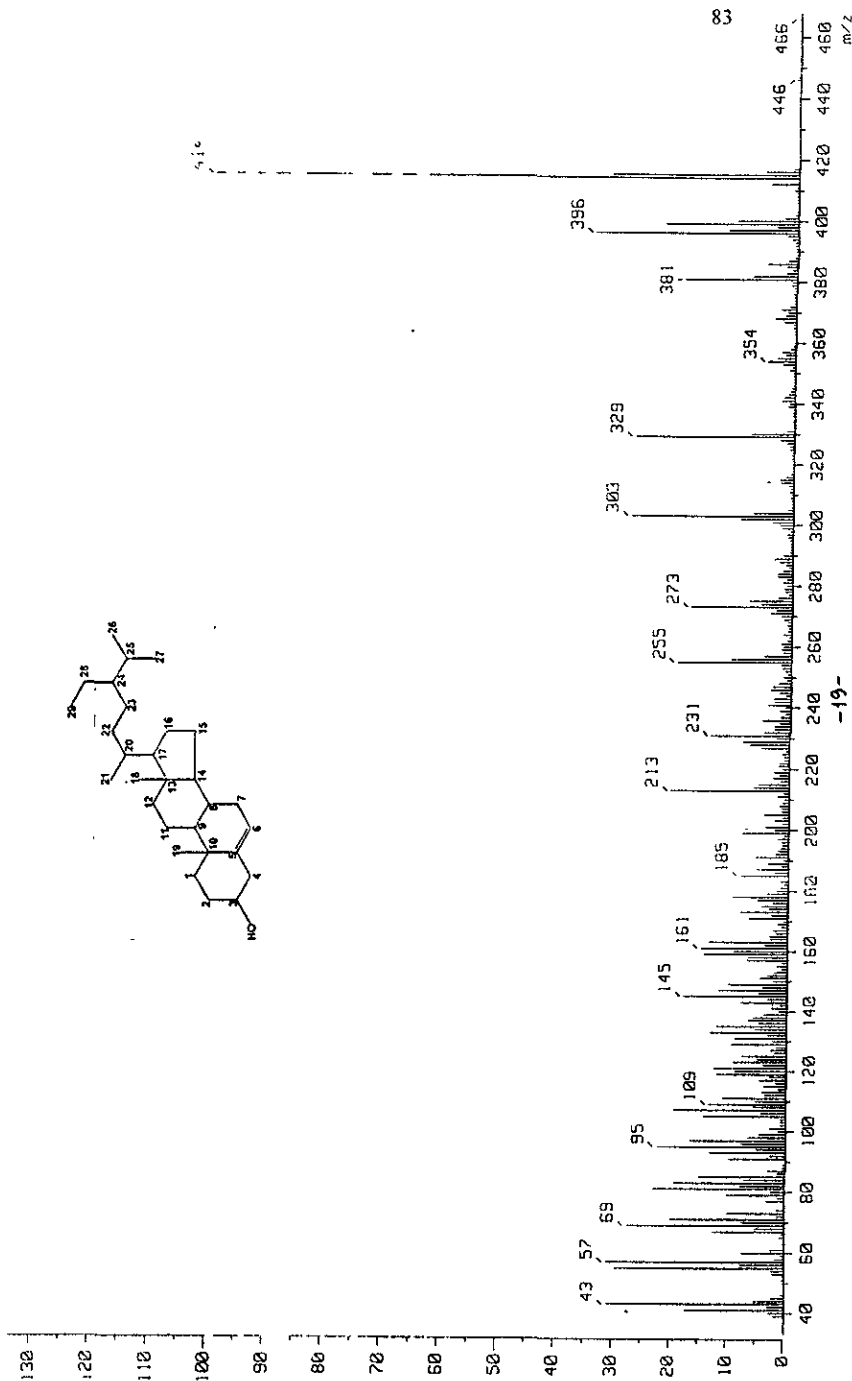
2873647

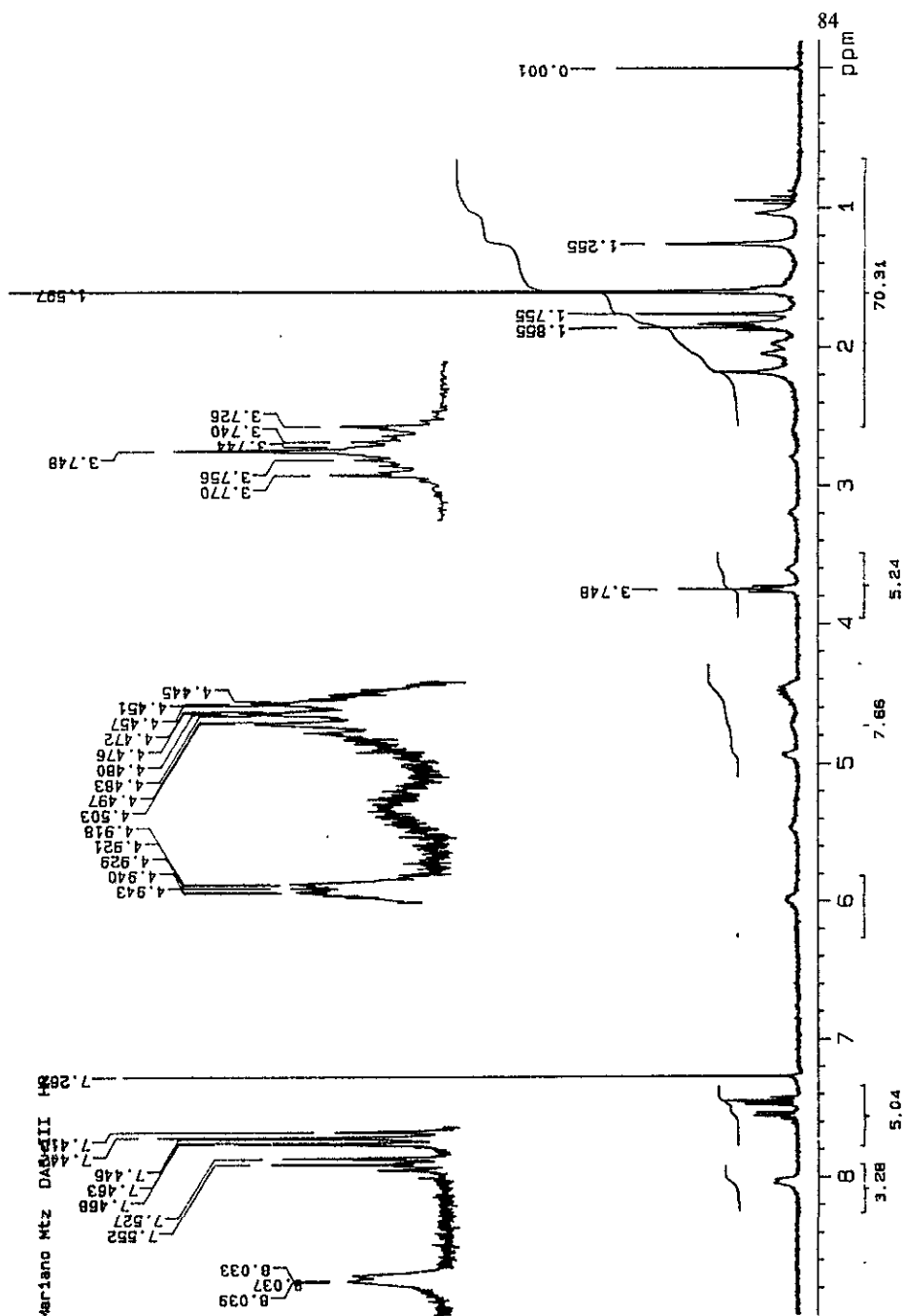
Date : 07-Aug-96 23:22

Ion Mode : EI+

Temp. : 37.4 deg. C

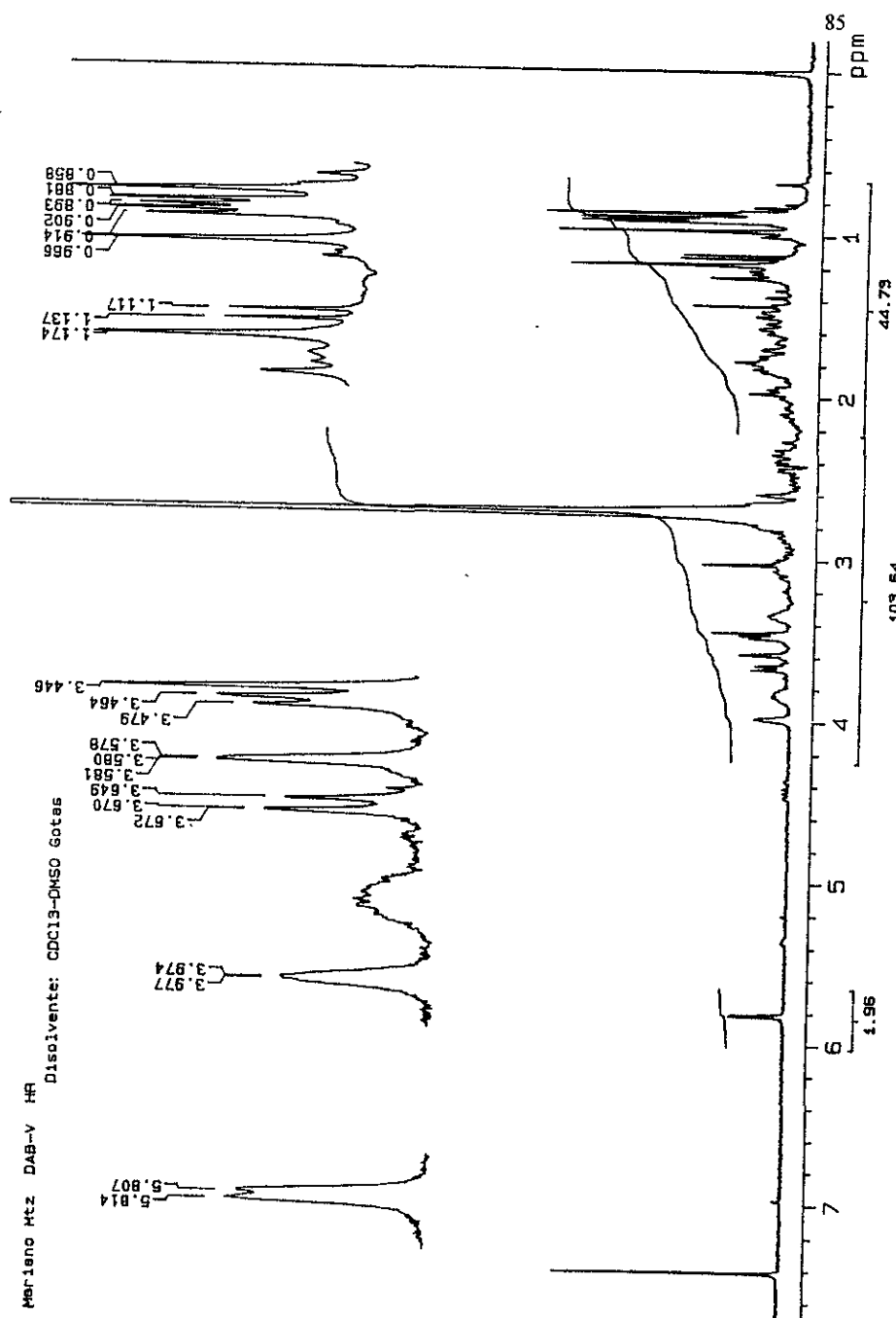
Cut level : 0.00 %

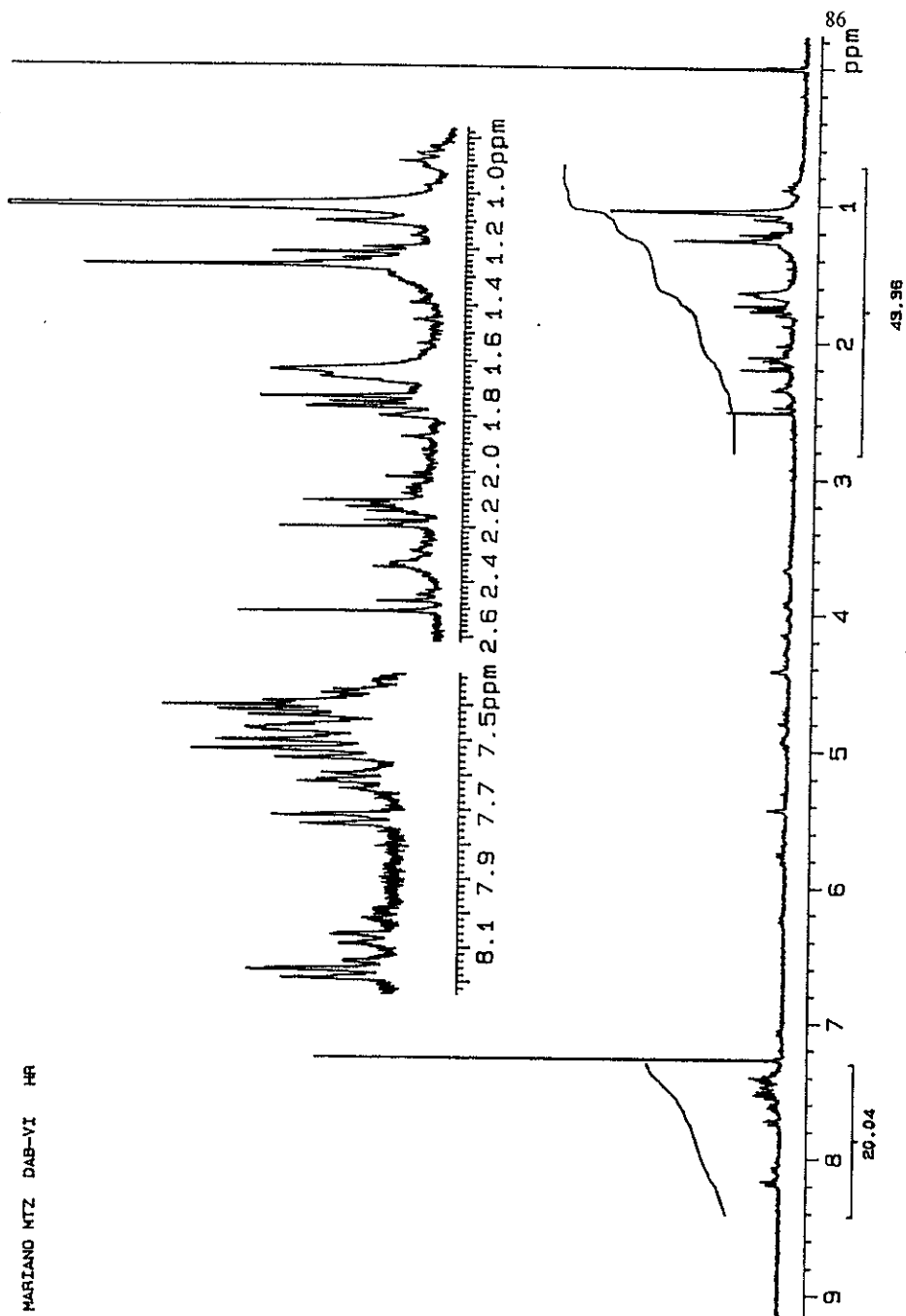


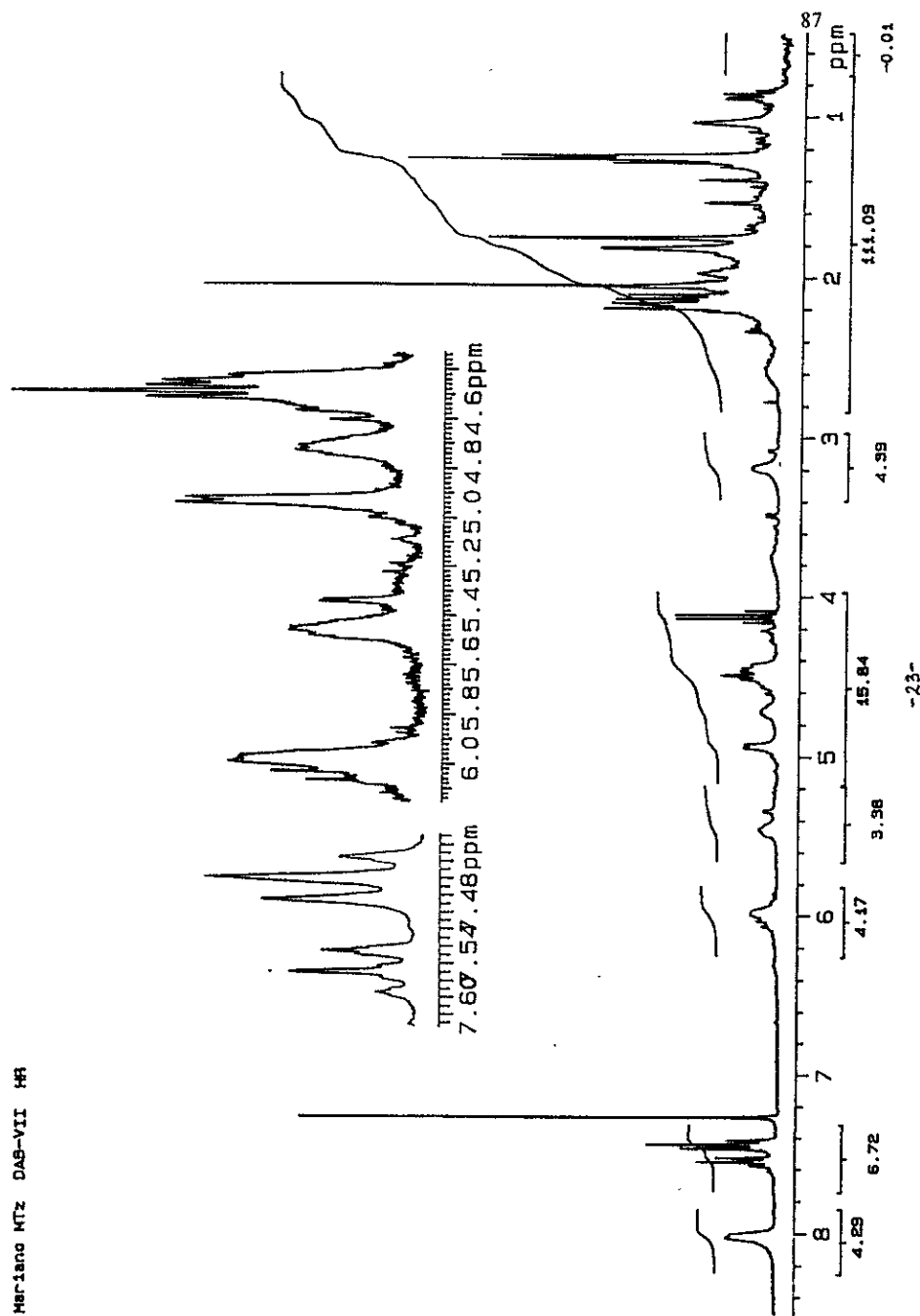


Mariano Htz DAB-V H¹H

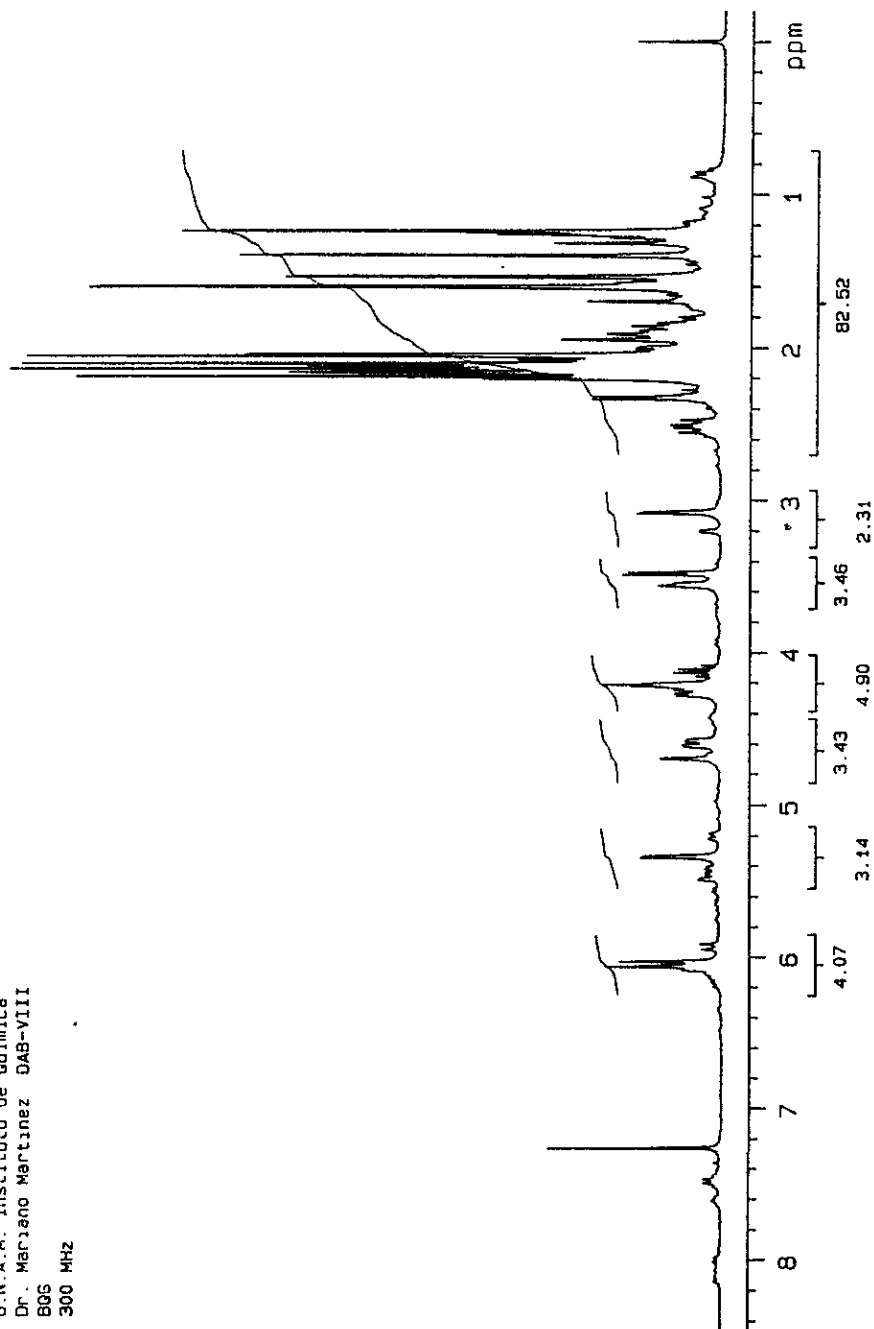
Disolvente: CDCl₃-DMSO Gotas

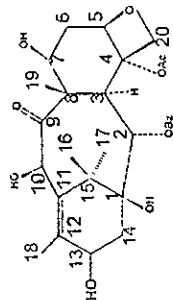




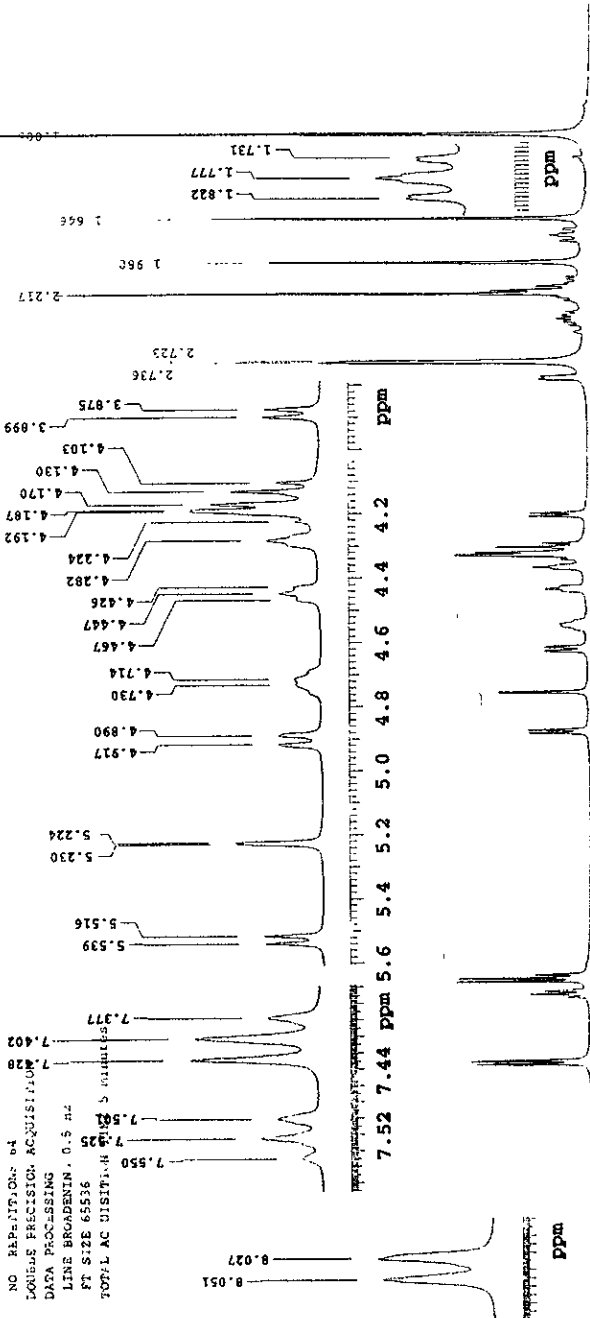


U.N.A.M. Instituto de Quimica
Dr. Mariano Martinez DAB-VIII
BQS
300 MHz





100MB111 DI-X-MARTINEZ NG
 OBSERVE 1,
 FREQUENCY 295.15 MHz
 SPECTRAL WIDTH 4000.0 Hz
 ACQUISITION FILE 3 000 Hz
 RELAXATION DELAY 2.000 sec
 PULSE WIDTH 11.1 usec
 TEMPERATURE 20.6 deg. C
 NO HAP-IT-OR e4
 LORUS PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.5 Hz
 FT SIZE 65536
 TOTAL ACQUISITION 5 minutes



9 8 7 6 5 4 3 2 1 ppm
 4.06 7.38 2.04 4.50 2.47 14.42 23.21 10.09 13.17 68

100ABIII Dr. N. Martinez NG

OBSERVE C13

FREQUENCY 75.429 MHz

SPECTRAL WIDTH 18001.8 Hz

ACQUISITION TIME 0.400 sec

RELAXATION DELAY 0.600 sec

PULSE WIDTH 2.3 usec

TEMPERATURE 20.0 deg. C.

NO. REPEATITIONS 10672

DECOUPLE H1

HIGH POWER 38

DECOUPLE CONTINUOUSLY ON

MULTIS MODULATED

DOUBLE PRECISION ACQUISITION

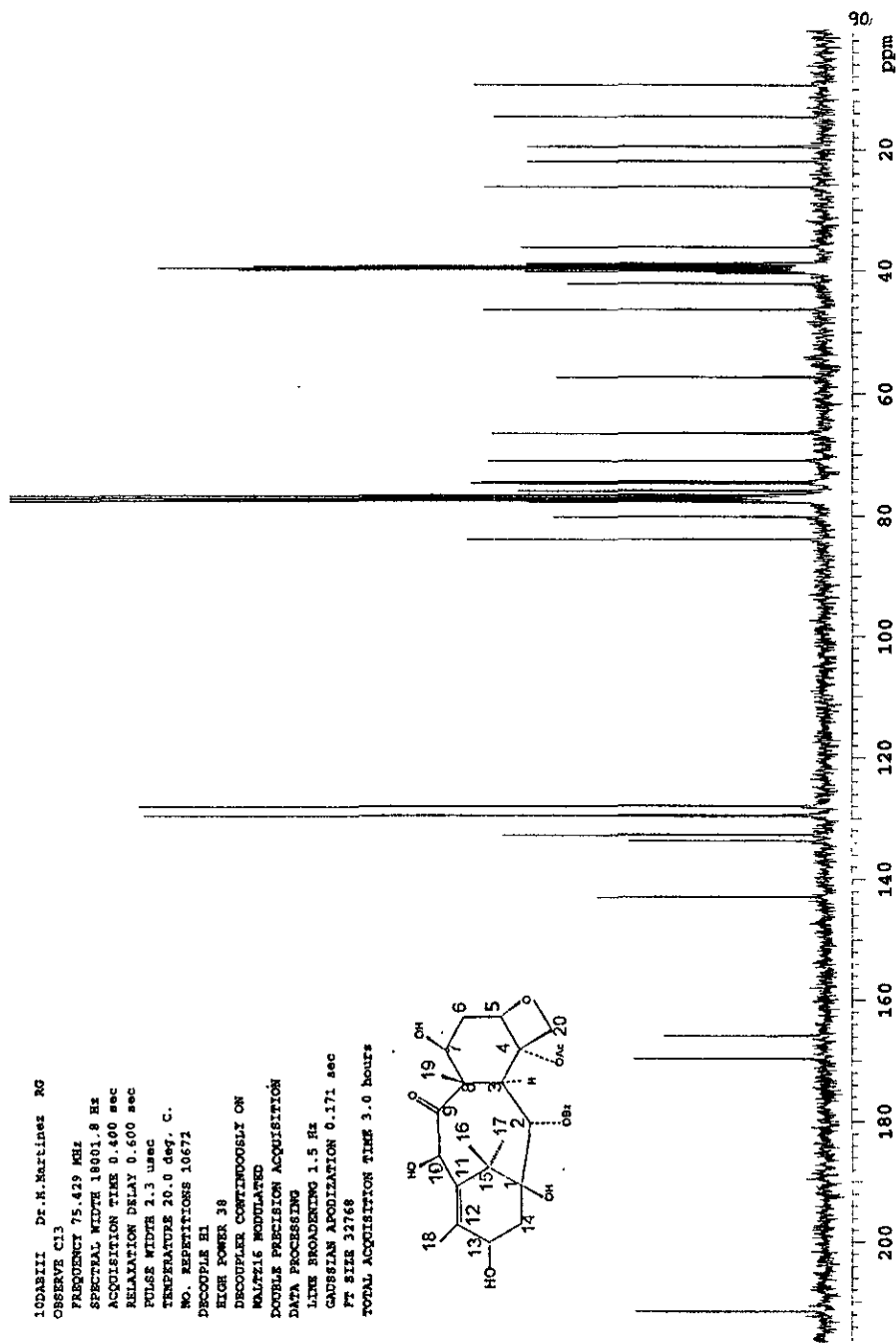
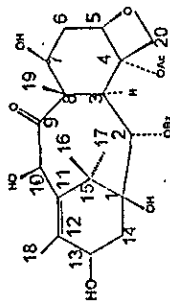
DATA PROCESSING

LINE BROADENING 1.5 Hz

GAUSSIAN APOILATION 0.171 sec

FT SIZE 32768

TOTAL ACQUISITION TIME 3.0 hours



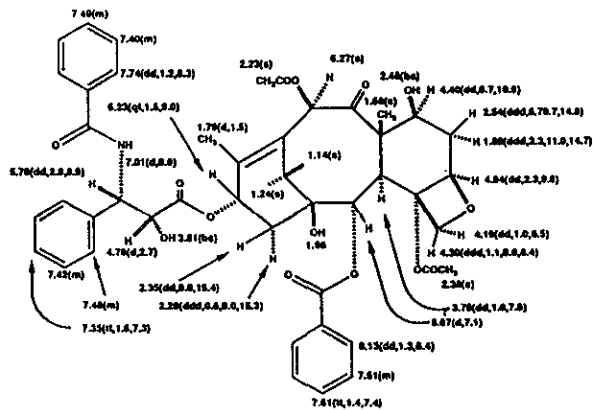
 $7.40/m^3$ 

Fig. 3. ^1H -NMR assignments for taxol

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Agnihotri V. K., Srivastava S. D., Pitre s. Constituents From the Seeds of *Cordia obliqua* as Potential Antiinflammatory Agents. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 49, 2, pp 66-69, (1987).
- 2.- Andrea Stierle, Gary Strobel, Donald Stierle. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andrenae*, and Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*, Vol. 260, pp 214-216, (1993).
- 3.- Bhacuni R. S., Shukla Y. N., Thakur R. S. Constituents of *Cornus capitata*. *Journal of Natural Products*, Vol. 94, 4, pp 714, (1986).
- 4.- Bruno Gabetta, Paolo Bellis, Roberto Pace. 10-Deacetylbaccatin III Analogues from *Taxus baccata*. *Journal of Natural Products*, Vol. 58, 10, pp 1508-1514, (1995).
- 5.- Christopher Joyce. Taxol: Search for a Cancer Drug. *BioScience*, Vol. 43, 3, pp 133-136, (1993).
- 6.- Daniel G  nard, Fran  oise Gu  ritte. Taxol and Taxotere: Discovery, Chemistry, and Structure-Activity Relationships. American Chemical Society, Vol. 26, 4, pp 160-167, (1993).
- 7.- D.G.I. Kingston, A.A. Molinero. The Taxane Diterpenoids. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. (1993).
- 8.- D. G. I. Kingston, G. Samaranayake. The Chemistry of Taxol, A Clinically Useful Anticancer Agent. *Journal of Natural Products*, Vol. 53, 1, pp 1-12, (1990).

- 9.- Devon. Handbook of Naturally Occurring Compounds, Vol 12, pp 399, (1972).
- 10.- Eduardo G Gross, Alicia Pomilio. Introducción al Estudio de los Productos Naturales. Programa Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (1985).
- 11.- F. Guèritte, Danuel Guénard and Pierre Potier. Taxol and Derivatives: a Biogenetic Hypothesis. *Journal of Natural Products*, Vol. 50, 1, pp 9-18, (1987).
- 12.- Giovanni Appendino. Taxol (Paclitaxel): Historical and Ecological Aspects. *Fitoterapia*, 1, (1993).
- 13.- Greca M., Molinaro A., Monaco P. Acylglycosyl Sterols from *Pistia stratiotes*. *Phytochemistry*, Vol. 30, pp 2422 (1991).
- 14.- Gupta M. B., Nath R., Srivastava N. Antiinflammatory and Antipyretic Activities of β - Sitosterol. *Planta Medica*, Vol. 39, 2, pp 157-163 (1980).
- 15.-Hiemann A. About Contents of Sabal Fruits their Antiinflammatory Effect. *Archiv der Pharmazie* (Weinheim), Vol. 322, 2, pp 111-114, (1989).
- 16.- Ian Rubinstein, L. John Goad. The 220 Mhz NRM Spectra of Phytosterols. *Phytochemistry*, Vol. 115, pp 195-200, (1976).
- 17.- Jean Bruneton, Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia; 1a edición 1991.
- 18.- J. L. McLaughlin, R. W. Miller. *Journal of Natural Products*, Vol,44, pp 312, (1981).

- 19.- J. Parness, D. G. I. Kingston, R. G. Powell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 105, pp 1082 (1982).
- 20.- Keith M. Witherup., Sally A. Look., Michael W. Stasko. Taxus spp. Needles Contain Amounts of Taxol Comparable to the Bark of *T. brevifolia*: Analysis and Isolation. *Journal of Natural Products*, Vol. 53, 5, pp 1249-1255, (1990).
- 21.- Konoshima T., Matsuda T., Takasaki M. Constituents of the Bark of *Euptelea polyandra*. *Journal of Natural Products*, Vol. 48, 4, pp 683-684, (1985).
- 22.- Koppakva V. Rao., Rajendra S. Bhakuni. A Large Scale Process for Paclitaxel and other Taxanes from the Needles of *Taxus x media* Hicksii and *Taxus Florida* Using Reverse Phase Column Chromatography. *Journal Liquid Chromatography & Rel. Technol*, Vol. 19, 3, pp 427- 447, (1996).
- 23.- K. C. Nicolaou, Z. Yang. Total Synthesis of Taxol. *Nature*, Vol. 367, pp 630-634, (1994).
- 24.- Marina Della Greca, Pietro Monaco. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *Journal of Natural Products*, Vol. 53, 6, pp 1430-1435, (1990).
- 25.- Martha L. Macias., Irma S. Rojas., Metabolitos Secundarios de *Chamaesyce prostrata* (AIT) MILLISP. (EUPHORBIACEAE). Tesis de Licenciatura, Mex. 1994.

26.- Nelly N. Castro T. Aislamiento y Determinación de la Estructura Molecular de los Constituyentes Presentes en *Lopezia racemosa* (Organaceae). Tesis de Licenciatura, Mex. 1995.

27.- Paul E. Fleming, Ursula Mocek and Heinz G. Floss. Biosynthesis of Taxoids. Mode of Formation of the Taxol Side Chain. *American Chemical Society*, Vol. 115, pp 805-807, (1993).

28.- P. F. Heinsteins and C.-J. Chang. Taxol. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, Vol.45, pp 663- 674, (1994).

29.- P. E. Fleming, Andrew R. Knaggs. Biosynthesis of Taxoids. Mode of Attachment of the Taxol Side Chain. *Journal American Chemical Society*, Vol. 116, pp 4137-4138, (1994).

30.-Paul Jenkins and Nicholas L. Taxol Branches Out *Chemistry in Britain*. pp 43-46, (1996).

31.- Rachel Mata E. Curso Teorico de Farmacognosia. Depto. de Farmacia. Facultad de Química, UNAM, 1995.

32.- Raymond E. B. Ketchum and Donna M. Gibson. A Novel Method of Isolating Taxanes from Cell Suspension Cultures of Yew (*Taxus* spp.). *Journal of Liquid Chromatography*, Vol. 18, 6, pp 1093-1111, (1995).

- 33.- Rick G. Kelsey and Nan C. Vance. Taxol and Cephalomannine Concentrations in the Foliage and Bark of Shade-Grown and Sun Exposed *Taxus brevifolia* Trees. *Journal of Natural Products*, Vol. 55, 7, pp 912-917, (1992).
- 34.- Roger W. Meller. A Brief Survey of Taxus Alkaloids and other Taxane Derivatives. *Journal of Natural Products*, Vol. 43, 4, pp 425- 437, (1980).
- 35.- R. Vanhaelen- Fastre, B. Diallo. High-Speed Countercurrent Chromatography Separation of Taxol and Related Diterpenoids From *Taxus baccata*. *Journal of Liquid Chromatography*, Vol. 15, 4, pp 697-706, (1992).
- 36.- Saeed S. A., Farnaz S., Simjee R. U. Triterpenes and Beta Sitosterol from *Piper betle*: Isolation, Antiplatelet and Antiinflammatory Effects. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 21, 4, (1993).
- 37.- Siegfried Blechert. Taxus Alkaloids. *The Alkaloids*, Vol. 39, 6, (1990).
- 38.- Schiff P.B., Fant J., Horwitz S. B. Promotion of Microtubule Assambly in Vitro by Taxol. *Nature*, Vol. 277, pp 665-667, (1979).
- 39.- Shibnath Ghosal. Steryl Glycosides and Acyl Steryl Glycosides from *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry*, Vol. 24, 8, pp 1807-1910, (1985).
- 40.- Stanley H. Pinc. Química Orgànica. 4a. edició, 1990.

- 41.- Toshihiro Akihisa, Parthasarathi Ghosh. 24 β -Methylcholesta-5,22E,25-trien-3 β -ol and 24 α -Ethyl-5 α -Cholest-22E-En-3 β -ol from *Cleroderum fragans*. *Phytochemistry*, Vol. 27, pp 241-144, (1988).
- 42.- Ulubelen A., Gorenz N. Constituents of *Achiella spirokensis*. *Fitoterapia*, Vol. 60, 1, pp 93-94, (1989).
- 43.- Wagner H., Wolff P., New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological Biological or Therapeutic Activity Proceedings in Life Sciences. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, N.Y.
- 44.- H. Hartzell, Jr. The Yew Tree A Thousand Whispers (1991). Hulojosi, Oregon.
- 45.- Thirty Steps to Taxol. Chem. Brit. (1994).