

00573

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

24

FACULTAD DE QUIMICA

“ESTRUCTURA MOLECULAR DE TAXANOS Y
OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES
EN *Taxus globosa*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(QUIMICA ORGANICA)
P R E S E N T A :
Q. MARIA DEL CARMEN CRUZ LOPEZ



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

00235



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Gloria Pérez Cendejas
Vocal	Dr. Eugene Bratoef Titeff
Secretario	Dr. Leovigildo Quijano
Primer Suplente	Dr. Carlos Rius Alonso
Segundo Suplente	M. en C. José Manuel Méndez S.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Química, UNAM

Sustentante Q. María del Carmen Cruz López



Asesor Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

La presente investigación fué realizada en el Instituto de Química con apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) como parte del proyecto IN212195-FQ bajo la supervisión del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas por la dirección del presente trabajo.

Al Dr. Leo Quijano por la paciencia e interés en la revisión de este trabajo.

A las M en C María Isabel Chávez y Beatriz Quiroz por la obtención de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear, que constituyen una parte importante de esta tesis.

A las Q. Rocío Patiño y Claudia Contreras por la realización de los análisis de infrarrojo.

Al Q. Javier Pérez y el I.Q. Luis Velasco por la obtención de los espectros de masas.

Al personal de la biblioteca "Jesús Romo Armería", especialmente a Guadalupe Antúnez. (güerita).

Al Instituto de Química.

A mis compañeros del laboratorio 1

RESUMEN

Desde tiempos remotos las fuentes naturales han sido utilizadas para combatir padecimientos humanos y en las últimas décadas parece haberse incrementado el interés por los productos de origen vegetal de manera que se evalúa el potencial como fuentes de fármacos o prototipos de estos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y el sida.

El cáncer es la segunda causa de muerte en nuestro país y a nivel mundial. Este padecimiento que representa uno de los principales problemas de salud pública es objeto de numerosas investigaciones encaminadas al conocimiento de las causas y a la búsqueda de tratamientos más específicos.

En la década de los 60's en un programa desarrollado por el National Cancer Institute se aisló de un extracto de *Taxus brevifolia* (Taxaceae), un compuesto denominado taxol que demostró actividad sobre ciertas líneas celulares y en 1992 fue aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer ovárico. El potencial terapéutico del taxol desencadenó la búsqueda de fuentes alternativas de este compuesto para suplir la creciente demanda. Aun cuando se ha informado la síntesis total y biosíntesis a partir de cultivos celulares para la obtención en gran escala, la fuente principal de taxol son las especies pertenecientes al género *Taxus*. Por tal motivo en el presente trabajo se realizó el estudio de la especie mexicana *Taxus globosa* con el fin de determinar su contenido de taxanos y evaluar su potencialidad como fuente de taxol.

Mediante diversas técnicas de análisis se estudiaron poblaciones de *Taxus globosa* colectadas en Chiapas e Hidalgo. Como resultado del análisis se obtuvieron diversos compuestos que fueron identificados por métodos espectroscópicos como: 1-deshidroxibaccatina III, yunnanxano, 10-desacetilbaccatina III, 1 β -hidroxibaccatina I, el biflavonoide ginkgetina, ponasterona A, *epi*-catequina y betulósido.

INDICE

Introducción.	1
Objetivos.	4
Antecedentes.	5
1. Género <i>Taxus</i> . <i>Taxus globosa</i> . Descripción botánica de <i>T. globosa</i> .	
2. Estudios químicos sobre el género <i>Taxus</i> . Taxanos. Clasificación. Biosíntesis. Química Otros metabolitos. Estudios químicos de <i>T. globosa</i> .	
Parte experimental.	32
Análisis del extracto diclorometánico de la corteza de <i>T. globosa</i> (población 1). Análisis del extracto diclorometánico de hojas de <i>T. globosa</i> (población 1). Análisis del extracto butanólico de la corteza de <i>T. globosa</i> (población 1). Análisis mediante HPLC de <i>T. globosa</i> (población 2).	
Discusión de resultados.	54
Elucidación estructural de: 2 α ,5 α ,10 β -triacetoxi-14 β (2'-metil,3'-hidroxi)-butiriloxi-taxa-4(20),11(12)-dieno (yunnanxano, 53). 2 α -benzoiloxi-4 α -acetoxi-1 β ,7 β ,10 β ,13 α -tetrahidroxi-4 β (20),5 β -oxetan-tax-11(12)-en-9-ona (10-desacetilbaccatina III, 7). 2 α -benzoiloxi-4 α ,10 β -diacetoxi-7 β ,13 α -dihidroxi-4 β (20),5 β -oxetan-tax-11(12)-en-9-ona (1-deshidroxibaccatina III, 54). 1 β -hidroxi-2 α ,5 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13 α -hexaacetoxi-4(20)-epoxi-tax-11(12)-eno (1 β -hidroxibaccatina I, 55).	

2 β ,3 β ,14 α ,21 β ,22 β -pentahidroxi-5 β -colest-7-en-6-ona (ponasterona, **41**).

7,4'-O-dimetil amentoflavona (Gingketina, **49**).

3 α ,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavano (*Epi*-catequina, **56**).

2- β -D-glucopiranosil, 4-(*p*-hidroxifenil)-butano (betulósido, **57**).

Conclusiones.

88

Espectros.

Espectro 1. IR (CHCl₃) de yunnanxano (**53**).

Espectro 2. RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) de yunnanxano (**53**).

Espectro 3. RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de yunnanxano (**53**).

Espectro 4. DEPT (CDCl₃, 125 MHz) de yunnanxano (**53**).

Espectro 5. COSY H - H (CDCl₃, 500 MHz) de yunnanxano (**53**).

Espectro 6. HMQC (CDCl₃, 500 MHz) de yunnanxano (**53**).

Espectro 7. HMBC (CDCl₃, 500 MHz) de yunnanxano (**53**).

Espectro 8. RMN¹H (DMSO- *d*₆, 500 MHz) de 10-desacetilbaccatina III (**7**).

Espectro 9. RMN¹³C (DMSO- *d*₆, 125 MHz) de 10-desacetilbaccatina III (**7**).

Espectro 10. DEPT (DMSO- *d*₆, 125 MHz) de 10-desacetilbaccatina III (**7**).

Espectro 11. COSY H - H (DMSO- *d*₆, 500 MHz) de 10-desacetilbaccatina III (**7**).

Espectro 12. HMQC (DMSO- *d*₆, 500 MHz) 10-desacetilbaccatina III (**7**).

Espectro 13. HMBC (DMSO- *d*₆, 500 MHz) 10-desacetilbaccatina III (**7**).

Espectro 14. RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) de 1-deshidroxibaccatina III (**54**).

Espectro 15. IR (CHCl₃) de 1 β -hidroxibaccatina I (**55**).

Espectro 16. EMIE de 1 β -hidroxibaccatina I (**55**).

Espectro 17. RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) de 1 β -hidroxibaccatina I (**55**).

Espectro 18. RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de 1 β -hidroxibaccatina I (**55**).

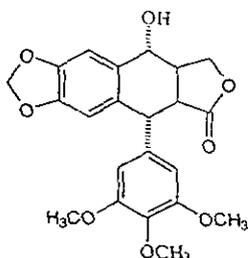
- Espectro 19. DEPT (CDCl₃, 125 MHz) de 1β-hidroxiabacatina I (55).
- Espectro 20. COSY (CDCl₃, 500 MHz) de 1β-hidroxiabacatina I (55).
- Espectro 21. RMN ¹H (DMSO- d₆, 300 MHz) de ponasterona (41).
- Espectro 22. RMN ¹³C (DMSO- d₆, 75 MHz) de ponasterona (41).
- Espectro 23. DEPT (DMSO- d₆, 75 MHz) de ponasterona (41).
- Espectro 24. HETCOR (DMSO- d₆, 75 MHz) de ponasterona (41).
- Espectro 25. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) derivado acetilado de ponasterona (41a).
- Espectro 26. RMN ¹H (DMSO- d₆, 300 MHz) de Gingketina (49).
- Espectro 27. RMN ¹³C (DMSO- d₆, 75 MHz) de Gingketina (49).
- Espectro 28. DEPT (DMSO- d₆, 75 MHz) de Gingketina (49).
- Espectro 29. COSY (DMSO- d₆, 300 MHz) de Gingketina (49).
- Espectro 30. RMN ¹H (MeOH- d₄, 300 MHz) de *Epi*-catequina (56).
- Espectro 31. RMN ¹³C (MeOH- d₄, 75 MHz) de *Epi*-catequina (56).
- Espectro 32. DEPT (MeOH- d₄, 75 MHz) de *Epi*-catequina (56).
- Espectro 33. IR (MeOH) de betulósido (57).
- Espectro 34. EM (IE, 70 eV) de betulósido (57).
- Espectro 35. RMN ¹H (MeOH- d₄, 300 MHz) de betulósido (57).
- Espectro 36. RMN ¹³C (MeOH- d₄, 75 MHz) de betulósido (57).
- Espectro 37. DEPT (MeOH- d₄, 75 MHz) de betulósido (57).
- Espectro 38. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del derivado acetilado de betulósido (57a).
- Espectro 39. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del derivado acetilado de betulósido (57a).
- Espectro 40. DEPT (CDCl₃, 75 MHz) del derivado acetilado de betulósido (57a).
- Espectro 41. COSY (CDCl₃, 300 MHz) del derivado acetilado de betulósido (57a).

1870

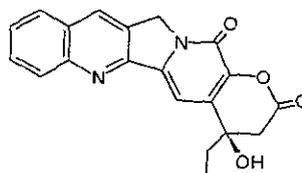
Desde el inicio de la humanidad se han utilizado las plantas para tratar diversos padecimientos y el cáncer, una de las enfermedades que causa mayor preocupación en la actualidad, no ha sido la excepción. Este padecimiento representa la segunda causa de mortalidad en nuestro país y a nivel mundial, por lo que numerosas investigaciones sobre la etiología y tratamiento del mismo se realizan continuamente. Hoy día las alternativas de tratamiento para los pacientes con cáncer incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.

Dentro de la quimioterapia se debe reconocer el papel de los recursos naturales como fuente de fármacos o prototipos para el desarrollo de los mismos. Se tienen informes de que aproximadamente 3000 especies presentan actividad antitumoral¹ y sin embargo sólo se conocen algunas decenas de sustancias utilizadas clínicamente derivadas de productos naturales tales como la podofilotoxina (1)² aislada de la resina de raíces y rizomas de *Podophyllum peltatum*. La camptotecina (2)³ un compuesto antineoplásico aislado de *Camptotheca acuminata*, que muestra amplia actividad en una variedad de sistemas tumorales y es un potente inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos, los alcaloides vinblastina (3)⁴ y vincristina (4)⁴ aislados de *Catharantus roseus* y más recientemente el taxol (5).⁵

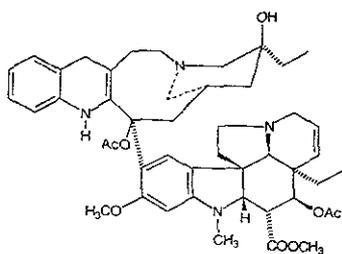
El taxol (5) muestra efectividad en el tratamiento de cáncer ovárico y de mama y recientemente se han obtenido resultados promisorios sobre otros tipos de cáncer.⁶ A diferencia de otros agentes antimetabólicos como la colchicina o los alcaloides de la vinca (3, 4) que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina en microtúbulos, el taxol promueve el ensamblamiento de estas unidades que juegan un papel determinante en la división celular.⁷



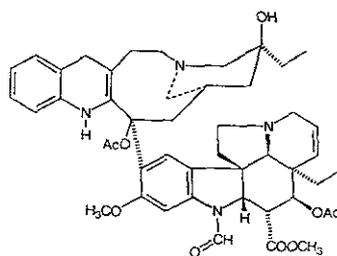
podofilotoxina (1)



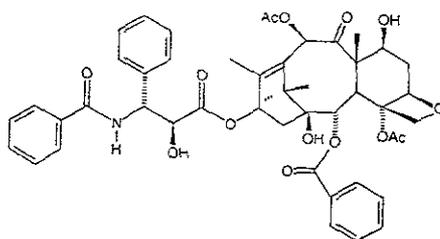
camptotecina (2)



vinblastina (3)



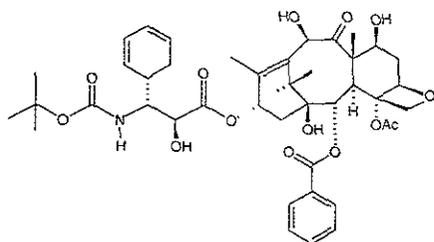
vincristina (4)



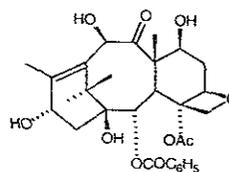
taxol (5)

Originalmente el taxol (5) fue obtenido por extracción de la corteza del 'tejo' del Pacífico (*Taxus brevifolia* Nutt., Taxaceae), un árbol pequeño distribuido en toda la costa e interior de la montaña del noroeste de Estados Unidos. Pero al descubrir el potencial terapéutico, se hizo necesaria la evaluación de fuentes alternas. Nicolau,⁸ Holton⁹ y otros han realizado la síntesis total por dos rutas diferentes, sin embargo, el alto costo implicado en estos procesos no hacen comercialmente viable esta forma de obtención.

Actualmente el taxol y un análogo el taxotere® (6) que presenta actividad similar son obtenidos sintéticamente por acilación de la 10-desacetilbaccatina III (7)¹⁰⁻¹³ y compuestos relacionados aislados de las diferentes especies de *taxus*. Si bien esta fuente de materia prima presenta bajo rendimiento, es renovable ya que se usa principalmente el follaje y además se ha informado el cultivo a gran escala. Otras opciones exploradas para suplir la demanda de taxol es el cultivo de tejidos¹⁴ o microorganismos como *Taxomyces andreae*, un hongo endofítico de *T. brevifolia*,¹⁵ aunque se ha notado que tampoco resultan ser comercialmente factibles.



taxotere® (6)



10-desacetilbaccatina III (7)

En resumen, las especies de *Taxus* constituyen actualmente la fuente principal de taxol ya sea como producto natural o bien por semisíntesis. Por tal motivo en el presente trabajo se realizó el estudio químico del "tejo" mexicano (*Taxus globosa* Schlecht).

Objetivo General:

Establecer el contenido metabólico del "tejo" mexicano (*Taxus globosa*) con el fin de evaluar su potencialidad como fuente de taxol y/o sustancias análogas.

Objetivos particulares:

1. Realizar el aislamiento y la determinación estructural de las sustancias presentes en diferentes poblaciones de la especie vegetal bajo estudio, aplicando diversas técnicas de análisis.
2. Comparar los constituyentes químicos presentes en las diferentes poblaciones y evaluar si existe una correlación entre el contenido químico y la ontología de la misma.

Autocatalytic
Reactions

Género *Taxus*.

Generalmente se acepta que la familia Taxaceae comprende los géneros *Torreya* y *Taxus*, aunque algunos autores consideran a esta familia dividida en dos tribus: Taxeae y Torreyaee. La primera incluye a los géneros *Austrotaxus*, *Taxus* y *Pseudotaxus*. Mientras que la subtribu Torreyaee comprende a los géneros *Amentotaxus* y *Torreya*.¹⁶

El género *Taxus* es el más importante de esta familia, hay datos de que habita el planeta desde hace más de 200 millones de años¹⁷ y desde el inicio de la humanidad ha sido apreciado por el hombre. Se distribuye en las regiones húmedas y de bosque templado en el hemisferio norte del planeta. También se localiza en las regiones tropicales y subtropicales del sureste de Asia y América central y en el hemisferio sur en Sumatra y Celebes.¹⁸ Puede crecer en forma de arbusto o bien de árbol pequeño.¹⁹

Hay discrepancia entre el número de especies de este género, algunos suponen que el taxus o "tejo" como se le denomina comunmente, es una sola especie con varias subespecies geográficas²⁰ y otros aceptan la existencia de siete a nueve especies claramente diferenciables²¹ las cuales se resumen en la tabla 1.

Especie	Localización
<i>Taxus brevifolia</i> , Nuttall	Canadá, Estados Unidos, Alaska.
<i>Taxus globosa</i> , Schlecht.	México, El Salvador, Honduras, Belice, Guatemala
<i>Taxus floridana</i> Nuttall	Florida
<i>Taxus canadensis</i> Marshall	Iowa, Tennessee, Carolina del norte
<i>Taxus baccata</i> Linn	Europa, Asia menor, Africa del norte
<i>Taxus cuspidata</i> Sieb y Zucc.	China, Japón, Corea
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc	Afganistan, Tibet, China
<i>Taxus yunnanensis</i> Cheng	Yunan, China

Tabla 1. Especies de *Taxus* y localización.

Cabe mencionar que en algunos casos la pérdida de caracteres taxonómicos claramente distintivos provoca el uso de sinónimos para una misma especie.

El género *Taxus* ha sido apreciado desde la antigüedad por el hombre y ha impactado nuestra historia, literatura y arte. Para ilustrar este punto se puede mencionar que civilizaciones antiguas como egipcios, romanos y celtas utilizaron diversas herramientas y armas elaboradas con madera de "tejo" que hoy día son exhibidas en museos Europeos. Así mismo Homero describió que los arqueros postrados en la muralla de Troya utilizaron flechas de madera de *Taxus*.²² A través de la historia se ha remarcado el hecho de la toxicidad de las especies de este género asociandolo con deidades, muerte y cuestiones mágicas, lo que ha servido como fuente de inspiración para algunos literatos sobre todo ingleses como Shakespeare, Elliot y Agatha Christi.

El tejo también ha sido asociado con el alfabeto y el nombre científico *Taxus*, fué probablemente derivado de la palabra griega τοξος similar a τοξον (flecha) y τοξιχον (veneno)²³

Además del uso como fuente de madera y preparaciones tóxicas, en el folklore europeo hay indicios de la elaboración de tónicos y preparaciones diversas para el tratamiento de enfermedades, por ejemplo en Alemania se mezclaba polvo de corteza con manteca para tratar la tuberculosis y las infusiones del follaje eran utilizadas para el tratamiento de enfermedades nerviosas y epilepsia²⁴. También fué utilizado como abortivo, para el tratamiento de cáncer de piel y como remedio contra el reumatismo por los nativos americanos.²⁵

Taxus globosa.

La única especie perteneciente al género *Taxus* que se localiza en nuestro país es *Taxus globosa*, y se ha identificado en los estados de Hidalgo, Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro y Nuevo León. Esta distribución (figura 1) supone la migración de la especie a través de la sierra madre oriental y por ello se había considerado como una subespecie de *T. floridana* o *T. baccata*.²⁶



Figura 1.  Distribución geográfica de *Taxus globosa* Schlecht en México.

 Sitios de colección (Chiapas e Hidalgo).

Algunos de los nombres comunes con los que se conoce a *T. globosa* en ciertas regiones de México son romerillo (Oaxaca), tatscal, granadillo o chuchún (Chiapas). El uso principal es como árbol maderable, curtiente y para elaborar carbón.²⁶

Descripción botánica de *Taxus globosa*.

Taxus globosa Schlecht (figura 2), es un arbusto o árbol pequeño perennifolio de menos de 20 m de alto, de tronco recto de 30 a 50 cm de diámetro, muy ramificado. Generalmente posee una copa redondeada. La corteza es escamosa de color claro y el tamaño de las hojas es variable con anchos de 1.5 a 2.0 mm y longitud de 20 a 30 mm, son claramente falcadas. El ápice es más agudo y el mucrón termina en forma triangular.

La superficie de las hojas presenta una capa ligeramente más oscura en el haz, mientras que la superficie dorsal es de un verde medio con un ligero tinte rojizo.

Presenta estróbilos masculinos axilares ubicados en la parte interior de las ramillas, solitarios o en espigas, formados por estambres con filamentos cortos; estróbilos femeninos solitarios en las axilas de las hojas, dispuestos en la parte posterior de las ramas; semillas ovoides cubiertas parcialmente por un arilo carnoso de color rojo mucho más redondo que el de las otras especies de " tejo". Florece de diciembre a febrero y las semillas maduras se encuentran de septiembre a noviembre. Su crecimiento es lento aunque su vida media es larga. Tiene muy pocas plagas naturales debido a que todas sus partes, excepto el arilo, son tóxicas.²⁶

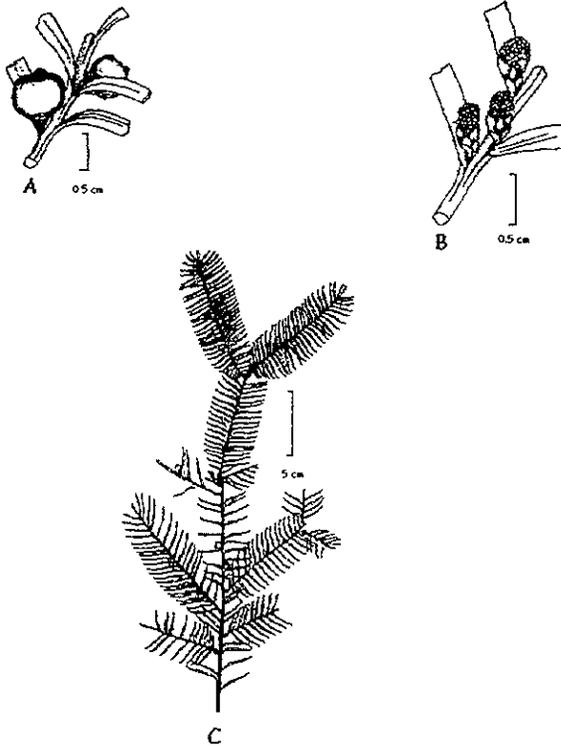
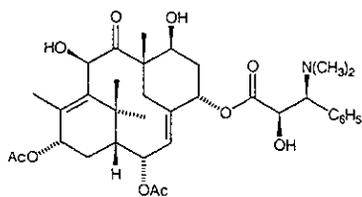


Figura 2. *Taxus globosa* Schlecht: A. Segmento de una rama femenina con semillas cubiertas por un arilo carnoso de color rojo, B. Ramilla con estróbilos masculinos mostrando los esporangios, C. Rama con estróbilos femeninos.

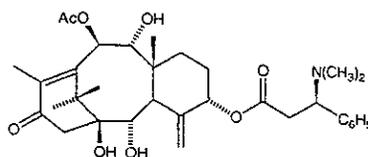
Estudios químicos de *Taxus*.

Como se mencionó anteriormente, las especies de *Taxus* eran apreciadas por su madera y por las propiedades tóxicas, aunque desde el punto de vista medicinal carecían de importancia. Las especies con una historia significativa dentro de la medicina tradicional son *Taxus wallichiana* y *Taxus cuspidata*.²⁷ *Taxus baccata* es la especie más estudiada, mientras que la especie mexicana *Taxus globosa* es la menos analizada químicamente.²⁸

El estudio químico sobre el género *Taxus* se inició por curiosidad sobre las propiedades tóxicas de las especies. El estudio pionero es el realizado por Lucas en 1856 quien aisló una mezcla de sustancias que nombró taxina.²⁹ Si bien esta mezcla es responsable en gran parte de la toxicidad, los continuos esfuerzos para establecer su naturaleza y composición, no han dado los resultados esperados debido a la inestabilidad de los constituyentes. En la actualidad se conoce que los componentes principales son dos sustancias de naturaleza alcaloidea denominadas taxina A (8) y taxina B (9), también se sabe que ésta última actúa sobre los canales de calcio provocando un paro respiratorio.^{30, 31}



taxina A (8)



taxina B (9)

En la década de los 60's, al observar el potencial terapéutico del taxol (5) se hizo necesaria la obtención de esta sustancia en cantidades suficientes para la continuación de su evaluación clínica. Una de las fuentes de obtención la representan las especies del mismo género, por lo que el interés sobre el estudio químico de éstas cobra auge. Durante el análisis de las diferentes especies de *Taxus* se han caracterizado diversos compuestos de naturaleza diterpénica los cuales han sido llamados taxanos.

Brevemente se presentará un panorama sobre los aspectos más relevantes sobre este tipo de sustancias como clasificación, biosíntesis y reactividad.

Taxanos.

Las sustancias de este tipo poseen un esqueleto original descrito como un diterpeno compuesto de un sistema [9.3.1.0] pentadeceno³² (figura 3).

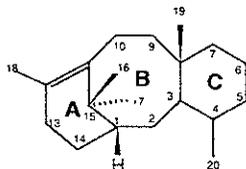


Figura 3. Esqueleto de Taxano

Este sistema tricíclico posee una conformación altamente plegada (figura 4). El anillo A de seis miembros posee conformación de bote distorsionado *cis* fusionado al anillo B de ocho miembros, el cual a su vez tiene una conformación silla-bote. En el caso de la taxinina o derivados de la baccatina, el anillo restante de seis miembros C, tiene una conformación de silla modificada y se fusiona al anillo B en forma *trans*.³³ Esta unidad estructural tiene un doble enlace como cabeza de puente (Bredt) que es estabilizado por los efectos conformacionales y por la presencia de sustituyentes en el entorno, como se ha demostrado en estudios de modelado molecular realizados con el sistema biciclo [5.3.1] undec-1(10)-eno.³⁴ La preferencia por una conformación se ha confirmado por difracción de rayos X, o bien, mediciones del efecto nuclear de Overhauser y por cálculos conformacionales.^{35, 36}

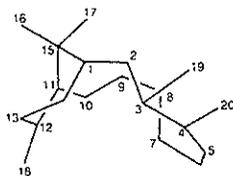


Figura 4 Conformación del esqueleto de taxano.

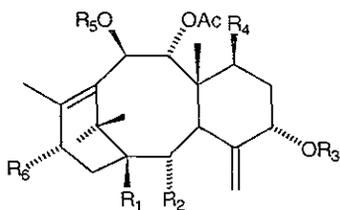
En la actualidad se conocen más de 200 taxanos los cuales pueden clasificarse en un tipo particular por la sustitución sobre ciertos átomos de carbono (C-1, C-7, C-13) o por la funcionalidad en C-20 (metileno exocíclico, epóxido, oxetano, enlace directo a C-2). La clasificación que se mostrará a continuación es la sugerida por Kingston:³⁷

1. Taxanos con un doble enlace exocíclico C-4(20).

Los compuestos de esta clase son los más abundantes y pueden subdividirse a su vez en tres subclases dependiendo de la naturaleza de la función oxigenada en C-5.

1a.- Taxoides con un grupo hidroxilo o acetato en C-5.

Ejemplo de estas sustancias se muestran en la figura 5 e incluyen a la taxusina (10),³⁸ taxinina A (11),³⁹ descinamoil taxinina J (12)⁴⁰ y un compuesto recientemente aislado el 2 α ,9 α -diacetoxi-1 β ,5 α ,10 β ,13 α -tetrahidroxi-taxa-4(20),11-dieno (13).⁴¹

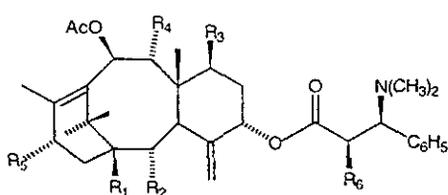


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
10	H	H	Ac	H	Ac	OAc
11	H	OAc	H	H	Ac	=O
12	H	OAc	H	OAc	Ac	OAc
13	OH	OAc	H	H	H	OH

Figura 5. Taxoides con doble enlace exocíclico C-4(20).

1b. Taxoides con una cadena básica en C-5.

Esta subclase de sustancias poseen un éster de Winterstein en la posición 5. En la figura 6 se muestran algunos de los miembros más importantes entre los que se encuentran las austrospicatinas (14 a-c) aisladas de *Austrotaxus spicatus*³⁷, la taxina B (9) uno de los constituyentes tóxicos del "tejo" y otros (15-18) que presentan un grupo 13-oxo o 13 α -acetoxilo.⁴²



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
14a	H	H	OAc	OAc	OAc	OAc
14b	H	H	OH	OH	OAc	OH
14c	H	H	OH	OAc	OAc	OAc

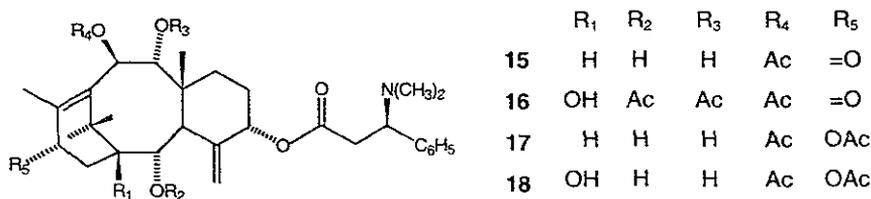


Figura 6. Taxoides con cadena básica en C-5.

1c. Taxoides con un grupo cinamoil en C-5.

Los primeros taxanos aislados pertenecen a este tipo, pero fueron obtenidos como productos de degradación por eliminación de Hofmann de la cadena básica de los taxoides como la taxina B (**9**). Sin embargo se han obtenido algunos compuestos de esta subclase por aislamiento directo. Las estructuras de algunos ejemplos representativos se dan en la figura 7. La taxinina B (**19**) es un ejemplo interesante ya que fué uno de los primeros taxoides cuya estereoquímica relativa se estableció por el efecto nuclear de Overhauser.³⁵ Otros compuestos que han sido incluidos en esta subclase son **20** y **21**⁴³ aislados de una colección invernal de hojas de *Taxus baccata*.

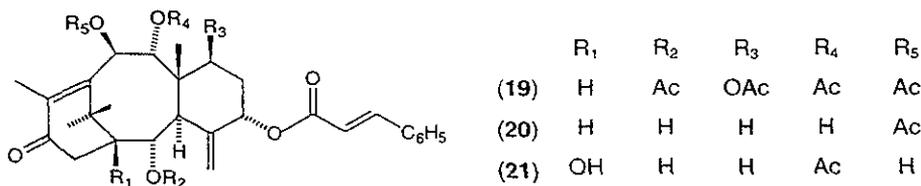
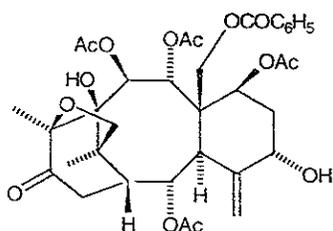


Figura 7. Taxoides con un grupo cinamoil en C-5.

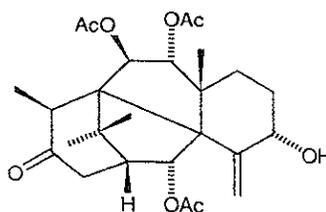
2. Taxoides con un enlace transanular.

Este grupo de taxoides mantiene la conectividad básica del anillo de taxano, pero incorpora un enlace transanular. Hasta el momento se conocen dos tipos de conectividad: a) un puente de oxígeno en C-12(**16**) ejemplificado por la taxinina M (**22**)⁴⁴ y taxoides con un enlace C-3(**11**) que generalmente tienen un grupo carbonilo en C-13. Sobre estos

últimos compuestos se ha sugerido que son formados en la planta por algún mecanismo de irradiación, ejemplo de ellos es la taxinina K (23).³⁸



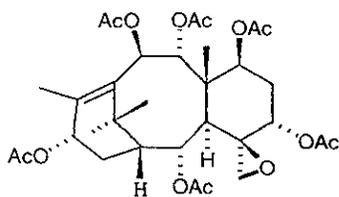
taxinina M (22)



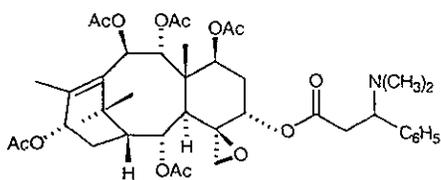
taxinina K (23)

3. Taxoides con un epóxido C-4(20).

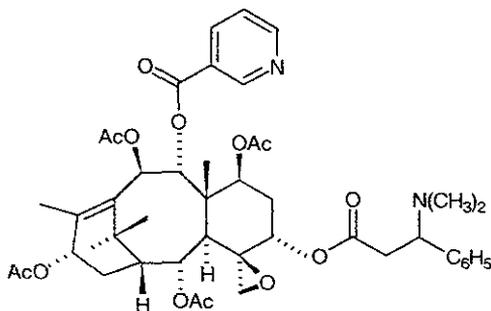
Han sido aislados pocos compuestos con un epóxido en la posición 4-20. El más conocido es la baccatina I (24).⁴⁵ todos ellos tienen un acetoxilo en C-2, pero el sustituyente en C-5 puede ser hidrógeno, acetilo, cinamoilo o cadenas básicas, principalmente se han aislado de *Taxus canadensis*⁴⁶ y *T. mairei*,³⁹ sin embargo varios alcaloides como la spicataxina (25) y nicotaxina (26) fueron encontrados en *Austrotaxus spicata*.⁴⁷



baccatina I (24)



spicataxina (25)



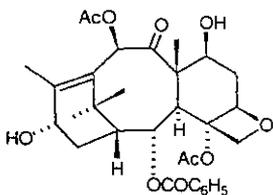
nicotaxina (26)

4. Taxoides con un anillo de oxetano en 4-5.

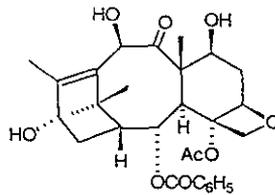
Son los más intensamente estudiados debido al potencial terapéutico y además por ser la segunda clase más abundante. A este grupo pertenece el taxol (5). Se pueden dividir en dos subclases de acuerdo a la presencia de la cadena en la posición 13.

4a. Taxanos con anillo de oxetano.

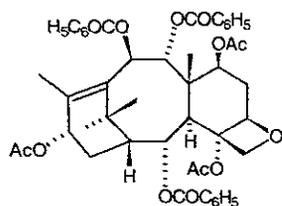
Este grupo se compone de aproximadamente 22 miembros de los cuales el ejemplo típico es la baccatina III (27)⁴⁸ la cual es un análogo de la 10-desacetilbaccatina III (7) que se encuentra en forma relativamente abundante en varias especies de *Taxus* como *T. wallichiana* y *T. baccata* de las cuales se ha aislado como materia prima para la obtención de taxol a gran escala. Otros taxanos de este tipo identificados en *Taxus brevifolia* presentan un benzoilo adicional (28) y (29).⁴⁹



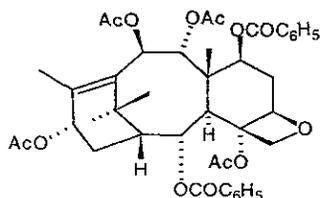
baccatina III (27)



10-desacetilbaccatina III (7)



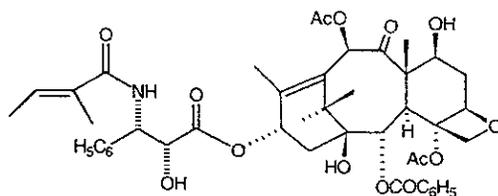
(28)



(29)

4b. Taxanos con anillo de oxetano y una cadena en C-13.

Esta subclase incluye al taxol y el compuesto relacionado cefalomanina (30) que fué aislada originalmente de *Cephalotaxus manni*⁵⁰ y posteriormente se ha encontrado en *T. wallichiana*⁵¹ y otros. La diferencia principal de esta clase son los sustituyentes en C-10 y C-7.

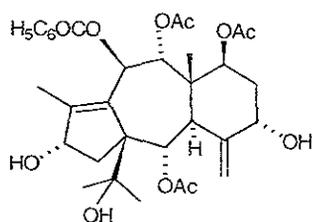


cefalomanina (30)

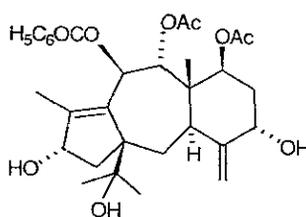
5. Taxoides con el anillo A de cinco miembros (A-nortaxoides)

Recientemente un pequeño grupo de taxanos con un anillo A de cinco miembros han sido caracterizados, también se les conoce como 11 (15→1) abeotaxanos. Se sugiere que derivan de una transposición del tipo de Wagner-Meerwein de los 1-hidroxitaxanos o bien de una ciclización transanular de epoxibriarenos o epoxicembrenos.⁵² Los A-nortaxanos tienen una forma convexa igual a los taxanos normales y a pesar de la diferencia en conectividad, exhiben una topología similar en tres dimensiones. Sin embargo los taxanos son conformacionalmente rígidos mientras que los abeotaxanos son flexibles y son posibles diferentes conformaciones para los anillos B y C.

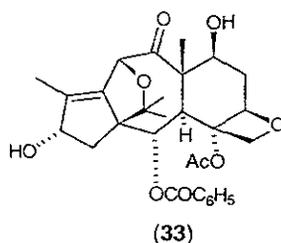
El primer A-nortaxano caracterizado fué la taxinina A (31)⁵³ y más recientemente se reasignó la estructura del brevifoliol (32) incluyéndose en esta clase.^{54, 55} Un taxano (33) con un anillo de oxetano como la baccatina III pero que tiene un anillo A d e cinco miembros con un puente óxido adicional se ha aislado de *T. wallichiana*.⁵⁶



taxinina A (31)



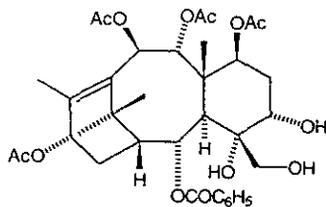
brevifoliol (32)



(33)

6. Taxoides Diversos.

Esta clase agrupa los taxanos que presentan esqueletos modificados y que no pueden incluirse en alguna de la clases anteriores como por ejemplo la taxina A (8) la cual tiene un esqueleto transpuesto, otros como el compuesto 34⁵⁷ que tiene una estructura con el anillo de oxetano abierto.



(34)

Recientemente se han aislado del género *Taxus* una serie de compuestos denominados taxachitrienos que presentan un esqueleto de biciclo [9.3.1] pentadeceno (figura 8a), el cual se había propuesto como precursor biogenético de los taxanos.^{58, 59} La conformación de este tipo de sustancias se muestra en la figura 8b.

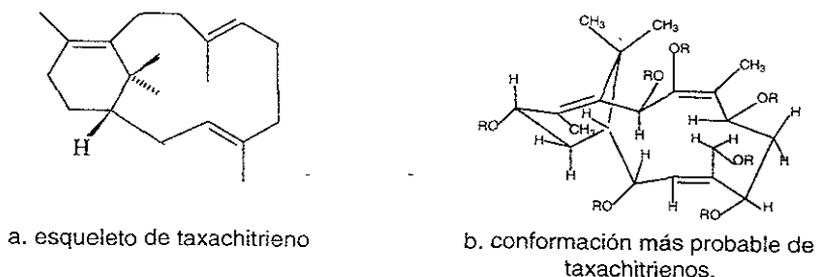
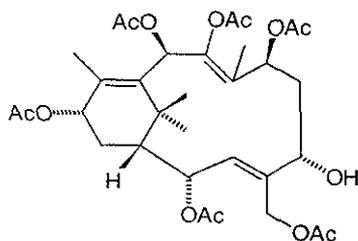


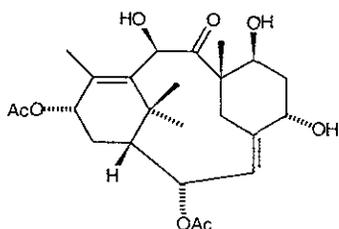
Figura 8. Esqueleto y conformación de taxachitrienos.

El taxachitrieno A (**35**)⁶⁰ es un ejemplo de esta clase de sustancias, fué aislado de *Taxus chinensis* y presenta actividad antitumoral *in vitro*.



Taxachitrieno A (**35**)

Aquí también se incluyen los denominados 2(3→20) abeotaxanos que son constituyentes de *Taxus baccata* y presentan un esqueleto como la deaminoaciltaxina A (**36**) este compuesto presenta una estructura plegada cuya conformación se estabiliza con la formación de un puente de hidrógeno entre el hidroxilo en la posición 5 y el acetato en la posición 13.⁶¹



deaminoaciltaxina A (36)

Aparentemente los 2(3→20) abeotaxanos derivan de un verticiladieno $\Delta^{4(20)}$. La ciclización de verticiladienos de este tipo no ha sido examinada pero la participación del doble enlace exocíclico como especie nucleofílica en ciclizaciones transanulares catalizadas por ácido se ha postulado para explicar la existencia de algunos germacranos transpuestos.⁶²

Biosíntesis.

Se conoce poco sobre la biosíntesis de los taxanos, inicialmente se habían propuesto como triterpenos degradados relacionados a quasinoídes,⁶³ pero estudios posteriores indican que son diterpenos desde el punto de vista estructural y biosintético.

En las primeras investigaciones realizadas sobre este tópicó se estableció que las unidades constructoras del esqueleto son el acetato, mevalonato y fenilalanina,⁶⁴ sin embargo recientemente Zenk y colaboradores⁶⁵ han demostrado que el mevalonato no está implicado en la formación del sistema anular aunque si interviene en la formación del precursor difosfato de isopentenilo por una ruta alterna de biosíntesis isoprenoide propuesta por Rohmer.⁶⁶

La etapa determinante en la biosíntesis de taxanos es la ciclización inicial de pirofosfato de geranilgeranilo (A) a taxa-4(5),11(12)-dieno (figura 9B) y no el isómero exocíclico taxa-4(20),11(12)-dieno como se había sugerido.⁶⁷



Figura 9. Ciclización de pirofosfato de geranilgeranilo

El mecanismo de esta reacción se ha estudiado con algún detalle y la enzima involucrada, denominada taxadieno sintasa, se aisló de tejidos de *T. brevifolia*.⁶⁸

La propuesta mecanística (figura 10) inicia con la ciclización del pirofosfato de geranilgeranilo (A) para formar un catión de tipo verticileno (B) en el que ocurre una transferencia de protón de C-11 a C-7 que promueve el cierre *trans* anular de los anillos B-C originando el catión taxenilo (C). La subsecuente desprotonación de C-5 forma el taxa-4(5),11(12)-dieno.⁶⁹

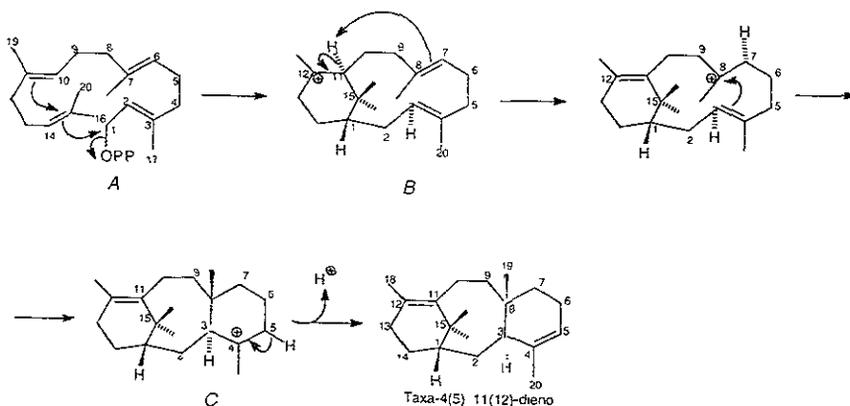


Figura 10. Mecanismo de formación de taxa-4(5),11(12)-dieno

A la formación de este precursor siguen modificaciones oxidativas para generar los esqueletos de taxano que se mencionaron en la sección anterior, la secuencia de estas reacciones no se ha establecido completamente, aunque la abundancia de los taxanos naturales con cierto patrón de oxigenación permite hacer algunas hipótesis como las siguientes.

Los taxanos con un doble enlace 4(5), no son conocidos mientras que los taxanos con funcionalidad 4(20)-eno y una función oxigenada en 5 son extremadamente comunes lo que lleva a pensar que la hidroxilación del taxa-4(5),11(12)-dieno en C-5 con migración del doble enlace es probablemente la etapa posterior a la formación del sistema anular.⁷⁰ Un estudio realizado con preparaciones microsomales de tallos de *Taxus* y cultivos celulares confirma la conversión de taxa-4(5),11(12)-dieno catalizada por NADPH en un compuesto identificado como taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol (figura 11).⁷¹

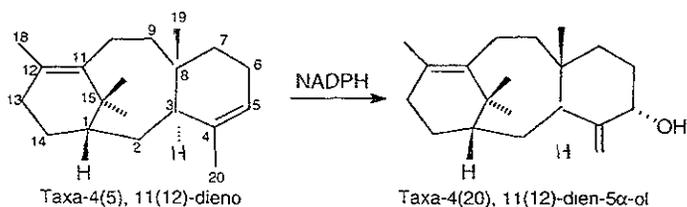


Figura 11. Oxidación de taxa-4(5),11(12)-dieno.

Por otro lado una gran mayoría de taxanos naturales están acetilados lo que indica que la acetilación del hidroxilo del precursor taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol es la tercera etapa en la biosíntesis.³⁷

Se ha establecido un orden probable de introducción de los grupos oxigenados en la molécula de taxadieno y el orden es C-5, C-10 seguidos de C-2 y C-9. Los taxanos que presentan oxígeno en C-13 son de los más abundantes por lo que se considera que el taxadieno se convierte a pentaol como se muestra en la figura 12.⁷² La oxigenación en C-7 y C-1 debe ocurrir en las últimas etapas. Otro hecho conocido es que la hidroxilación del taxadieno a pentaol es catalizada por la citocromo P450 hidroxilasa y muy probablemente las reacciones de esta clase involucren enzimas de similares.⁷¹

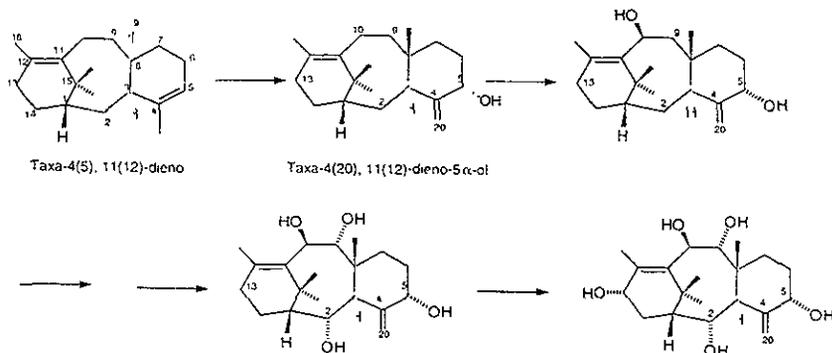


Figura 12. Secuencia de hidroxilación de taxa-4(5),11(12)-dieno

Química de Taxanos.

Cabe mencionar en este punto que la disponibilidad de los taxanos ha dificultado un poco el estudio del comportamiento químico. Los compuestos aislados en mayor cantidad como la 10-desacetilbaccatina III (7) se han utilizado para establecer la química de este grupo de sustancias no obstante se debe considerar que algunos fenómenos son particulares a determinada molécula.

Día con día se realizan nuevos descubrimientos en este campo al grado que no se pretende mostrar las numerosas investigaciones en esta área, ahora mismo durante la lectura de este párrafo pueden estarse generando resultados de manera que una reacción hasta este momento típica de estas sustancias ya no resulte serlo.

En términos generales las reacciones clásicas de los taxanos son acilación, hidrólisis, transposiciones, epimerización y fotoquímica

Acilación.

Los taxoides tienen varios grupos hidroxilo en forma libre o como ésteres por lo que su acilación y desacilación representa un papel importante en su química.

Sobre la acetilación de los grupos hidroxílicos es importante mencionar que la posición 10 es más reactiva que la posición 9 y en el caso de la baccatina III, el orden de reactividad es $7 > 10 > 13$.⁷³ El uso de otros grupos protectores como *t*-butildimetilsililo ha permitido hacer una diferenciación entre C-7 y C-10.⁷⁴

Hidrólisis.

Como pudo observarse en la clasificación de taxanos, estas sustancias poseen varios grupos acilo y la desacilación selectiva es objeto de estudio, por ejemplo los taxanos que tiene grupos éster en las posiciones 2, 5, 9 y 10 presentan un orden de reactividad de hidrólisis $C-9, C-10 > C-5, C-2$ que probablemente este influida por factores estéricos y la participación de los grupos vecinos⁷⁵

La metanólisis es una variante de la reacción de hidrólisis, que se utilizó en la determinación de la estructura del taxol (figura 13)⁵

También las cadenas laterales del taxol (**5**) o cefalomanina (**30**) pueden ser eliminadas mediante la reacción con borohidruro de tetrabutilamonio en diclorometano.⁷³

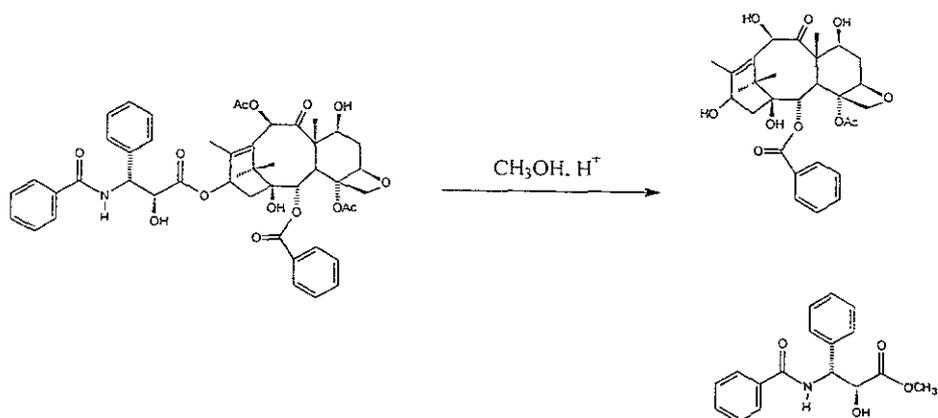


Figura 13 Metanólisis del taxol

Esta clase de reacción ha sido ampliamente ensayada ya que se busca generar derivados para realizar estudios de estructura-actividad que permitan el diseño de nuevos fármacos. Uno de los avances más recientes es la hidrólisis enzimática en las posiciones 10 y 13 del taxol (**5**) y la cefalomanina (**30**).⁷⁶

Epimerización.

El grupo hidroxilo en C-7 presente en una gran cantidad de taxanos, es parte de un sistema β -hidroxicarbonílico epimerizable por un mecanismo retroaldol-aldol en condiciones básicas. La fuerza motriz de esta reacción es al parecer la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo 7-*epi*-hidroxilo y el carbonilo del acetato en C-4.⁵⁶ También se ha observado la epimerización en condiciones ácidas y neutras

Oxidación.

Las reacciones de oxidación de taxanos proceden de la forma convencional y en algunos casos se puede predecir el producto final, no obstante hay algunos fenómenos inusuales. El taxol por ejemplo al ser tratado con el reactivo de Jones da el derivado 7-oxo (figura 14)

El doble enlace 11(12) en algunos taxanos como en el taxol es resistente a los métodos usuales de oxidación (el tetróxido de osmio y ozonólisis), lo cual se explica por el impedimento estérico dada la conformación de la molécula y en otros como la cefalomanina este si es oxidable por lo que esta diferencia de comportamiento se utiliza para la separación de ambas moléculas.^{77,78} Ya que se habla de la separación del taxol (5) y cefalomanina (30), se puede mencionar que el tratamiento de un extracto de *T. yunnanensis* con una solución de bromo produce las correspondientes halocefalomaninas que pueden ser separadas con mayor facilidad del taxol (5).⁷⁹

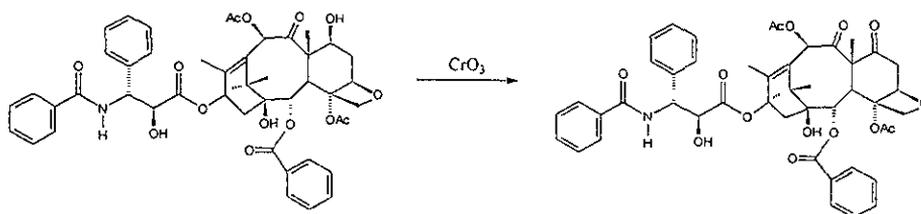


Figura 14. Oxidación de taxol

Reducción.

La hidrogenación de diversos taxanos en condiciones normales ocasiona la reducción del doble enlace 4(20)⁸⁰ Cuando se emplean condiciones más drásticas tiene lugar la hidrogenólisis o bien la reducción del anillo aromático como se muestra en la figura 15 para la baccatina III.⁸¹

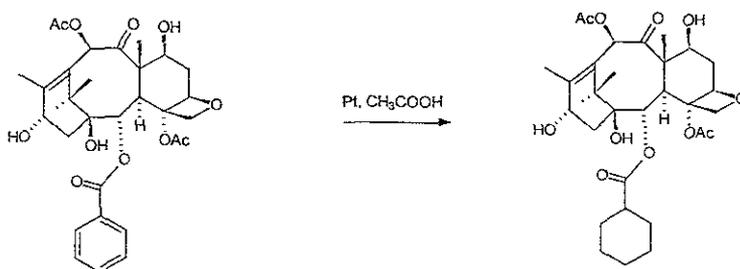


Figura 15. Hidrogenación de baccatina III.

Transposiciones.

Los taxanos sufren una reacción de transposición a sus análogos A-nortaxanos en diversas condiciones principalmente con el tratamiento de ácidos de Lewis.

El tratamiento de derivados 7,10 di(troc) de la 10-desacetilbaccatina III con $ZnCl_2$, HCl o CF_3COOH dió origen a varios productos análogos a **16.1** y **16.2**. Una interesante reacción intramolecular de estos troc derivados es la observada al tratar con alúmina el compuesto **16.2** y obtenerse el producto cíclico **16.3** (figura 16) ⁸²

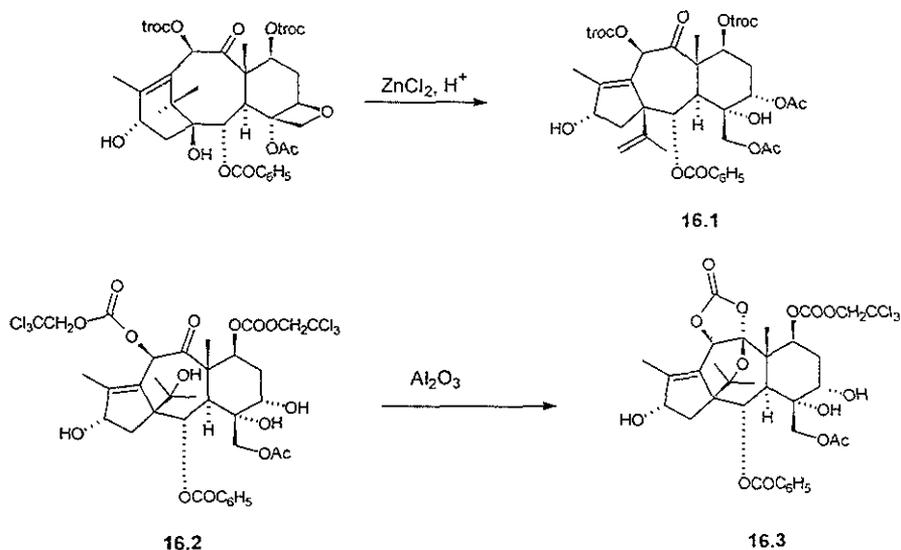


Figura 16. Reacción de transposición de 10-desacetilbaccatina III

Una transposición poco usual es la observada para la taxicina I que al ser tratada con metóxido de sodio da un producto como el que se muestra en la figura 17.⁸³

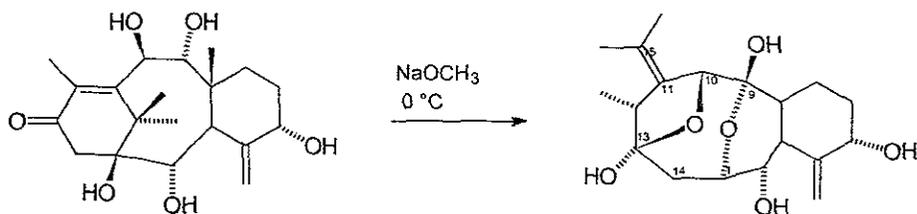


Figura 17. Transposición de taxicina I

Fotoquímica.

Los estudios en esta área se deben principalmente a Nakanishi y colaboradores y se han llevado a cabo con la taxicina y derivados.⁷⁵ Dos reacciones principales fueron observadas, una de ellas es una reacción transanular de C-3 con C-11 para formar un producto tetracíclico como 37 (figura 18).

La irradiación del taxol da como resultado el producto 38 por una secuencia que involucra un intermediario diradical.⁸⁴

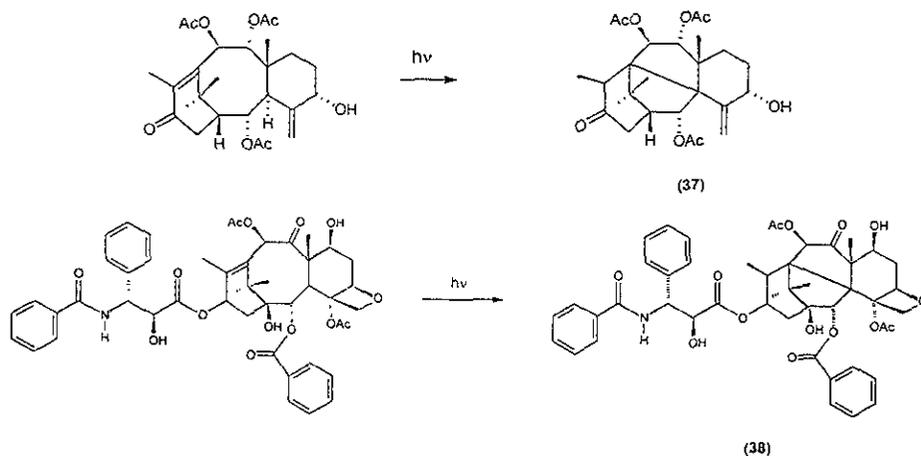


Figura 18. Reacción fotoquímica de la taxicina y taxol.

Es importante aclarar que el comportamiento químico de algunos taxanos es característico y se ha determinado al intentar la conversión de estos en taxol, un ejemplo reciente es la conversión de la cefalomanina en taxol.⁸⁵

Bioactividad de taxanos.

Existen estudios sobre estructura-actividad de los taxanos naturales y derivados que permiten establecer los fragmentos necesarios para la actividad antitumoral. En la figura 18, se utiliza al taxol para mostrar las estructuras requeridas. Se conoce que el anillo de oxetano es esencial para la bioactividad, también se ha observado que la pérdida del benzoato en 2 o el acetato en 4 disminuye dramáticamente la actividad ya que aparentemente son necesarios para el enlace con la tubulina. La presencia del anillo A, se ha establecido que es necesaria, así como también es importante la cadena lateral amídica de la posición 13.^{86,87,88}

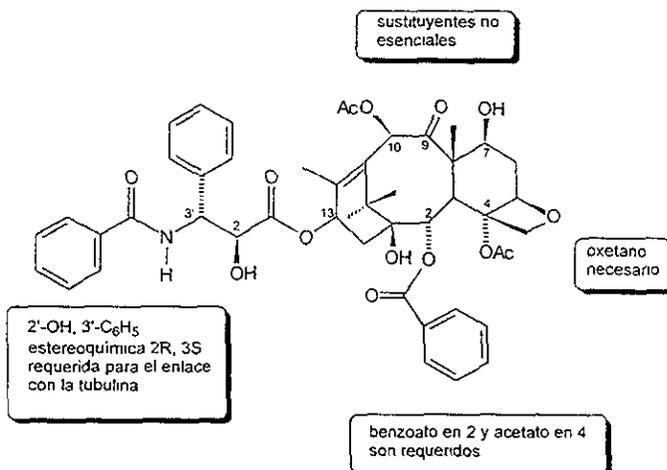
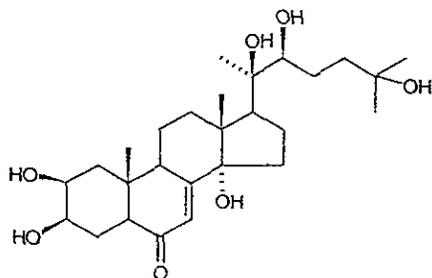


Figura 19 Fragmentos estructurales necesarios para la actividad.

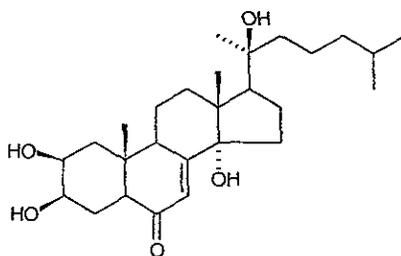
Otros metabolitos aislados del género *Taxus*.

Desde el punto de vista farmacológico y químico los taxanos son los metabolitos más importantes de este género, no obstante otro tipo de sustancias como biflavonoides, ecdisonas y glucósidos han sido aislados de especies de *Taxus* y resultan interesantes ya que algunas de ellas presentan actividad biológica.

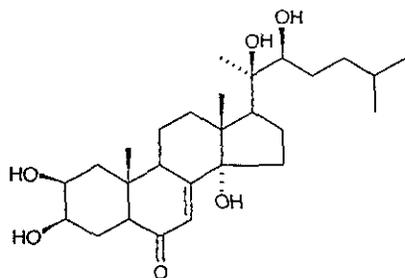
Como ejemplo de las ecdisonas presentes en algunos "tejos", se puede mencionar la ecdisterona (39), taxisterona (40),⁸⁹ ponasterona A (41) y makisterona A (42).⁹⁰



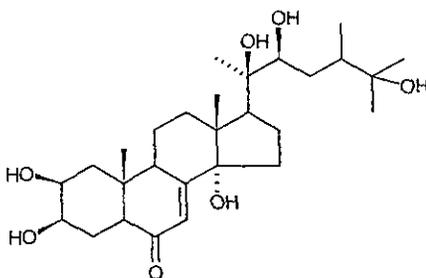
ecdisterona (39)



taxisterona (40)

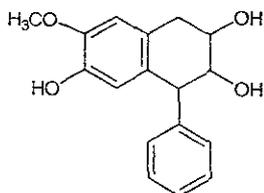


ponasterona A (41)

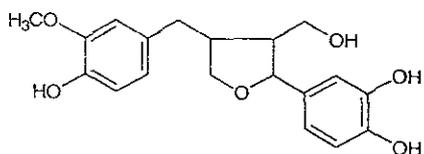


makisterona A (42).

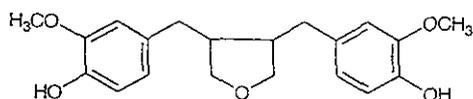
Algunos lignanos como isotaxiresinol (43), taxiresinol (44) y 3,4-divanilliltetrahidrofurano (45) se encuentran en las raíces, madera y hojas de *T. baccata*.⁹¹



isotaxiresinol (43)

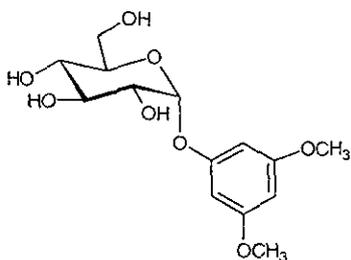


taxiresinol (44)

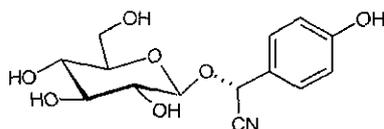


3,4-divanilliltetrahidrofurano (45)

La taxicatina (46) así como la (*R*)-taxifilina (47) son glucósidos aislados de las hojas de *T. baccata*.⁹²

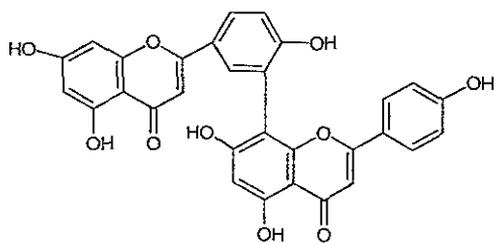


taxicatina (46)

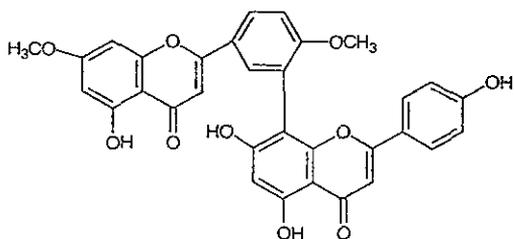


(*R*)-taxifilina (47)

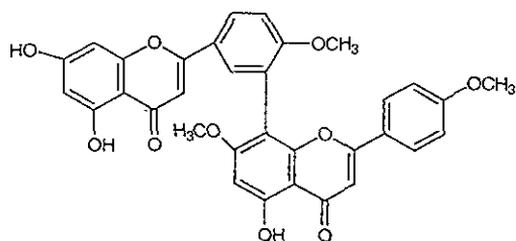
También son constituyentes de *Taxus* los biflavonoides derivados de la amentoflavona (48) como la ginkgetina (49) y kayaflavona (50).^{91a, 93}



amentoflavona (48)



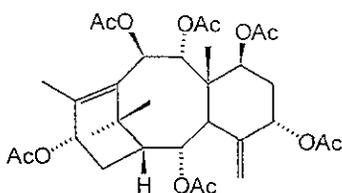
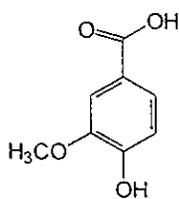
ginkgetina (49)



kayaflavona (50)

Estudio químico de *Taxus globosa*.

El "tejo" mexicano es la especie menos estudiada químicamente, existen informes de un estudio en el que fueron analizados mediante HPLC extractos orgánicos de esta especie para determinar el contenido de taxol.²⁸ En esta investigación se menciona la detección de taxol y cefalomanina en mayor abundancia que en las otras especies, sin embargo estos resultados se toman con cierta reserva. Más recientemente se ha informado la realización de cultivos celulares de esta especie para la producción de taxanos en gran escala.^{94,95} El único estudio químico es el realizado por este mismo grupo de investigación en el que fueron aislados de la corteza de *T. globosa*, 7 β -acetoxitaxusina (**51**), β -sitosterol libre y en forma de glucósido y ácido vanílico (**52**).

7 β -acetoxitaxusina (**51**)ácido vanílico (**52**)

Experimental
Experimental
Experimental

Material y Equipo.

El análisis en cromatografía en capa fina se realizó en cromatofolios Macherey-Nagel Düren Alugram Sil G/UV.

El soporte utilizado en las diversas cromatografías en columna fueron gel de sílice para placa (Merck 60GF) y mallas 35-70, 70-230. Sephadex LH-20.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtuvieron en un espectrométero analítico Varian modelo Unity 300 y Unity plus 500 usando deuterocloroformo, DMSO- d_6 , MeOH- d_4 según el caso y el desplazamiento químico δ está dado en ppm referido al TMS.

Los puntos de fusión de los compuestos fueron determinados en un equipo Fischer-Johns y no están corregidos.

Los espectros de masas fueron determinados en un espectrómetro JEOL modelo JMS-AX505 HA a 70 eV y una corriente de ionización de 100 μ A.

Los espectros en el IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo 283-B.

Para la realización del presente trabajo se efectuaron colectas de la especie *Taxus globosa* en los municipios de Jocosic (Chiapas, población 1) y el Chico (Hidalgo, población 2). La colección e identificación del material vegetal estuvo a cargo del biólogo Juan Castillo y se depositó una muestra en el Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU 669740 y MEXU 669753).

Los especímenes de las poblaciones colectadas fueron secados a 25 °C, separando corteza y follaje. Posteriormente este material vegetal fué extraído por maceración con etanol durante 48 horas a temperatura ambiente. Los diferentes extractos etanólicos se concentraron y posteriormente se sometieron a una partición diclorometano-agua ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$) y la fracción acuosa se extrajo finalmente con *n*-butanol. El procedimiento anterior se resume en el diagrama 1 y en la tabla 2 se muestra el rendimiento de cada extracción.

Diagrama 1. Procedimiento General de Extracción.

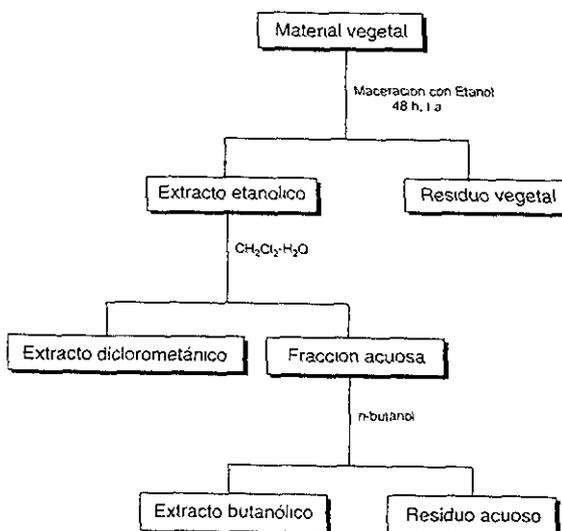


Tabla 2. Parte vegetal extraída y rendimiento de cada extracción.

Población	Material vegetal	Extracto CH ₂ Cl ₂	Extracto butanólico
1	corteza 2200 g	22.1 g	31.0 g
	hojas 850 g	5.3 g	3.8 g
2	hojas 540 g	13.5 g	5.6 g
	madera 1000 g	6.5 g	12.3 g

Las fracciones diclorometánicas y butanólicas derivadas del proceso de extracción fueron analizadas y separadas en sus constituyentes mediante diferentes técnicas cromatográficas.

Análisis del extracto diclorometánico de la corteza de *Taxus globosa* (poblacion 1).

El extracto diclorometánico (22.1 g) se preadsorbió sobre gel de sílice (malla 70-230) y se aplicó a una columna empacada con 60 g de sílica gel 60 GF₂₅₄. La elución de la columna se realizó con mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad ascendente y el desarrollo de la misma se siguió mediante cromatografía en capa fina. Como resultado de este procedimiento se obtuvieron 22 fracciones (tabla 3).

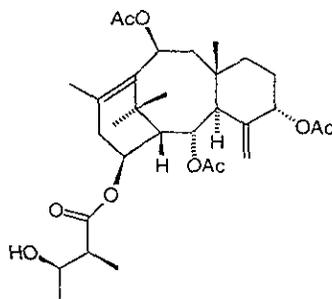
Tabla 3. Fraccionamiento del extracto diclorometánico de corteza de *T. globosa*

Fracción	Eluyente Hexano-AcOEt	Fracción	Eluyente Hexano-AcOEt
1	100:0	12	70:30
2	100:0	13	70:30
3	100:0	14	70:30
4	98:2	15	60:40
5	95:5	16	60:40
6	95:5	17	60:40
7	90:10	18	50:50
8	90:10	19	50:50
9	85:15	20	50:50
10	85:15	21	0:100
11	80:20	22	acetona

De las fracciones de baja polaridad (1-10) después de repetidas cromatografías en columna utilizando como soporte gel de sílice 60 GF, se obtuvieron compuestos sólidos de alto peso molecular que fueron caracterizados por comparación de sus datos espectroscópicos como eicosano y hentriacontano. Así mismo después de una recromatografía en columna de la fracción 4 (350 mg) se aisló β -sitosterol (80 mg) y estigmasterol (95 mg). Otros metabolitos presentes en estas fracciones son los ácidos palmítico, oleico y linoleico.

Aislamiento de $2\alpha,5\alpha,10\beta$ -triacetoxi, 14β -(2'-metil-3'-hidroxi)-butiriloxi-taxa-4(20),11(12)-dieno (**53**, yunnanxano).

La fracción 11 eluida con hexano-acetato de etilo 80:20 (600 mg) se adsorbió en gel de sílice y se recromatografió en una columna empacada con el mismo soporte (5 g), usando como eluyente mezclas de hexano-acetona. Los eluatos obtenidos con hexano-acetona 85:15 (300 mg) se reunieron y recromatografiaron sobre 15 g de gel de sílice (malla 70-230) usando como eluyente la misma mezcla de disolventes. Se obtuvieron 183.2 mg de un sólido blanco cuyo análisis cromatográfico reveló la presencia de dos constituyentes. Esta mezcla se separó por cromatografía en capa fina usando una placa cromatográfica de 20 x 20 cm y 2 mm de espesor que fué eluida con CHCl_3 -acetona (95:5). Después del procedimiento de extracción se obtuvieron 98 mg de un compuesto cuyos datos espectroscópicos corresponden a la 7β -acetoxi-taxusina (**51**) y 42.6 mg de una sustancia con las siguientes características físicas y espectroscópicas que corresponden a las del yunnanxano (**53**).



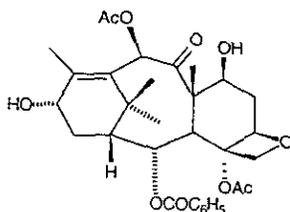
yunnanxano (**53**)

IR ν_{\max} (CHCl_3 , cm^{-1}): 3616, 2885, 2856, 2832, 1728, 1640, 1450, 1372, 1344, 1164, 1088
 RMN¹H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 6.06 (1H, dd, 5.7, 12.1, H-10), 5.36 (1H, dd, 2.5, 6.6, H-2), 5.30 (1H, t, 3.0, H-5), 5.28 (s, H-20), 5.04 (1H, dd, 4.8, 9.2, H-14), 4.83 (s, H-20), 3.86 (1H, m, H-3'), 2.93 (1H, d, 6.6, H-3), 2.85 (1H, dd, 9.2, 19.0, H-13), 2.40 (1H, d, 7.2, H-2'), 2.39 (1H, m, H-13), 2.38 (1H, m, H-9), 2.18 (3H, s, OCOCH_3), 2.10 (3H, s, CH_3 -18), 2.06 (3H, s, OCOCH_3), 2.03 (3H, s, OCOCH_3), 1.96 (1H, m, H-7), 1.91 (1H, d, 2.3, H-1), 1.80 (1H, m, H-6), 1.67 (3H, s, CH_3 -16), 1.64 (1H, dd, 5.7, 14.8, H-9), 1.24 (1H, m, H-7), 1.21 (3H, d, 6.3, H-4'), 1.16 (3H, d, 7.2, H-5'), 1.13 (3H, s, CH_3 -19), 0.85 (3H, s, CH_3 -17).

RMN¹³C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 59.12 (C-1), 70.42 (C-2), 42.15 (C-3), 142.31 (C-4), 78.19 (C-5), 28.88 (C-6), 33.82 (C-7), 39.66 (C-8), 43.88 (C-9), 70.04 (C-10), 135.43 (C-11), 134.60 (C-12), 39.49 (C-13), 70.72 (C-14), 37.27 (C-15), 25.37 (C-16), 31.67 (C-17), 20.92 (C-18), 22.46 (C-19), 116.88 (C-20), 21.38 (CH_3 -OAc), 21.38 (CH_3 -OAc), 21.87 (CH_3 -OAc), 169.74 (C=O), 169.90 (C=O), 170.18 (C=O), 174.75 (C=O), 46.97 (C-2'), 69.473 (C-3'), 20.83 (C-4'), 13.97 (C-1').

Aislamiento de 1-deshidroxibaccatina III (54) y 1 β -hidroxibaccatina I (55).

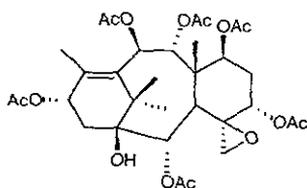
La fracción 15 (200 mg) de la columna original del extracto de corteza (población 1), se preadsorbió en gel de sílice (70-230) y se recromatografió sobre 5 g de gel de sílice en una columna de 2 cm de diámetro interno. Se usaron mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, iniciando con una proporción 9:1. Se obtuvieron 35 eluatos los cuales se reunieron en cinco fracciones (A-E). La recromatografía de la fracción C (76 mg) permitió el aislamiento de un sólido blanco cuyos datos espectroscópicos permitieron identificarlo como 1-deshidroxibaccatina III (54).



1-deshidroxibaccatina III (54)

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 8.10 (1H, dd, 1.5, 7.5, H-arom), 7.61 (2H, t, 7.5, H-arom), 7.48 (2H, d, 7.5, H-arom), 6.32 (1H, s, H-10), 5.62 (1H, d, 6.9, H-2), 4.98 (1H, dd, 10.0, 2.4, H-5), 4.89 (1H, t, 7.5, H-13), 4.44-4.40 (1H, m, H-7), 4.30 (1H, d, 8.2, H-20a), 4.15 (1H, d, 8.2, H-20b), 3.88 (1H, d, 6.6, H-3), 2.61 (1H, d, 1.5), 2.28 (3H, s, CH₃COO), 2.24 (3H, s, CH₃COO), 2.16 (3H, s, CH₃COO), 2.108 (3H, s, CH₃COO), 2.01 (3H, s, CH₃-18), 1.63 (3H, s, CH₃-19), 1.12 (3H, s, CH₃-17), 1.27 (3H, s, CH₃-16).

Las fracciones D y E se reunieron y se recromatografiaron en columna, usando como sistema de elución una mezcla de hexano-acetato de etilo 9:1. Una cromatografía posterior en capa fina de las subfracciones 12-20 de la columna anterior dió como resultado un compuesto con las siguientes características, que permiten identificarlo como 1β-hidroxibaccatina I (55).



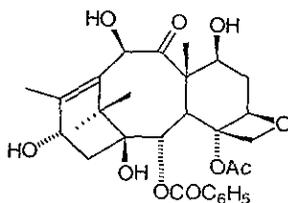
1β-hidroxibaccatina I (55)

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 6.21 (1H, d, 11.0, H-10α), 6.10 (1H, t, 8.1, H-13β), 6.04 (1H, d, 11.0, H-9β), 5.50 (1H, d, 3.0, H-2β), 5.50 (1H, dd, 4.5, 10.5, H-7α), 4.22 (1H, t, 3.0, H-5β), 3.54 (1H, d, 5.1, H-20a), 3.19 (1H, d, 3.0, H-3α), 2.54 (1H, dd 9.6, 15.0, H-14β), 2.31 (1H, d, 5.1, H-20b), 2.23 (3H, s, CH₃-18), 2.22 (3H, s, OCOCH₃), 2.17 (1H, m_{obs}, H-6α), 2.11 (3H, s, OCOCH₃), 2.09 (3H, s, OCOCH₃), 2.06 (3H, s, OCOCH₃), 2.05 (3H, s, OCOCH₃), 2.00 (3H, s, OCOCH₃), 1.88 (1H, dd, 6.6, 15.0, H-14α), 1.77 (1H, ddd, 2.4, 9.6, 15.0, H-6β), 1.66 (3H, s, CH₃-17), 1.25 (3H, s, CH₃-19), 1.24 (3H, s, CH₃-16).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.09 (s, CO), 169.85 (s, CO), 169.76 (s, CO), 169.36 (s, CO), 169.23 (s, CO), 140.39 (s, C-12), 135.71 (s, C-11), 77.77 (t, C-5), 76.14 (s, C-1), 75.21 (d, C-9), 75.21 (d, C-2), 71.15 (d, C-13), 70.75 (d, C-10), 68.76 (d, C-7), 58.30 (s, C-4), 49.94 (t, C-20), 46.67 (s, C-8), 43.32 (s, C-15), 41.38 (d, C-3), 38.58 (t, C-14), 31.14 (t, C-6), 28.46 (q, C-16), 21.82 (q, C-17), 21.67 (q, COCH₃), 21.42 (q, COCH₃), 20.90 (q, COCH₃), 20.66 (q, COCH₃), 15.42 (q, CH₃-18), 13.70 (q, CH₃-19).

Aislamiento de 10-desacetilbaccatina III (7).

La fracción 18 de la columna inicial del extracto diclorometánico de corteza (200 mg) que presentaba un aspecto sólido de color oscuro, se recrystalizó de acetona-diclorometano (1:1) en tres ocasiones hasta obtener un residuo (143 mg) que posteriormente se recrystalizó de metanol para obtener un compuesto puro con punto de fusión de 244-245 °C. El espectro de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono trece de esta sustancia indican que se trata de la 10-desacetilbaccatina III (7).



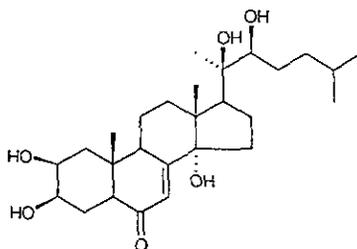
10-desacetilbaccatina III (7)

RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 8.02 (2H, dd, 1.5, 8.1, H-arom), 7.66 (1H, dd, 7.5, 1.5 H-arom), 7.56 (2H, d, 7.5, H-arom), 5.41 (1H, d, 7.0, H-2), 5.21 (1H, d, 4.5, OH-13), 5.14 (1H, d, 2.5, H-10), 4.98 (1H, d, 7.5,), 4.92 (1H, dd, 1.5, 9.5, H-5), 4.75 (1H, d, 2.5, OH-10), 4.63 (1H, m, H-13), 4.33 (1H, s, H), 4.10 (1H, m, H-7), 4.04 (2H, s, H-20), 3.82 (1H, d, 7.5, H-3), 2.29 (1H, dd, 3.0, 14.5, H-14a), 2.28 (1H, t, 14.5, H-6α), 2.20 (3H, s, OCOCH₃), 2.16 (1H, d, 9.0, H-14b), 1.90 (3H, s, CH₃-18), 1.65 (1H, td, 2.5, 14.0, H-6β), 1.53 (3H, s, CH₃-19), 0.95 (3H, s, CH₃-17), 0.94 (3H, s, CH₃-16).

RMN¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 210.28 (s, C=O), 169.47 (s, OC=O), 165.23 (s, OC=O), 141.55 (s, C-12), 134.48 (s, C-11), 133.12 (d, C-4'), 130.29 (s, C-1'), 129.46 (2C, s, C-2', C-6'), 128.63 (2C, d, C-3', C-5'), 83.73 (d, C-5), 80.10 (s, C-4), 76.93 (s, C-1), 75.45 (t, C-20), 74.84 (d, C-2), 74.34 (d, C-10), 70.70 (d, C-7), 66.04 (d, C-13), 57.03 (s,), 46.51 (d, C-3), 42.45 (s, C-15), 39.41 (t, C-14), 36.55 (t, C-6), 26.74 (q, C-16), 22.24 (q, CH₃CO), 20.12 (q, C-17), 14.74 (q, C-18), 9.67 (q, C-16),

Aislamiento de ponasterona (41).

El análisis por cromatografía en capa fina de la fracción más polar del extracto diclorometánico de corteza (fracción 22) mostró la presencia de un constituyente principal con R_f de 0.4 en un sistema diclorometano-metanol 8:2. Este residuo (218 mg) se disolvió en metanol y se filtró sobre carbón activado. Se eliminó el disolvente y el residuo orgánico fué fraccionado con la ayuda de una columna cromatográfica de 2 cm de diámetro empacada con 10 g de sílice para placa. Los eluatos obtenidos con CH₂Cl₂-MeOH (8:2) se reunieron y el sólido obtenido se recrystalizó de metanol-acetona. Después de este procedimiento se obtuvo un compuesto cuyas características permitieron identificarlo como a la ponasterona (41).



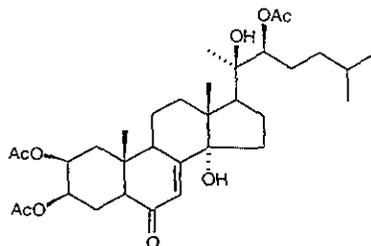
ponasterona (41)

RMN¹H (MeOH-*d*₄, 300 MHz) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 5.80 (1H, d, 2.4, H-7), 3.94 (1H, d, 2.4, H-3), 3.83 (1H, ddd, 3.6, 6.0, 12.0, H-2), 3.33 (1H, d, 10.5, H-22), 3.14 (1H, ddd, 3.3, 8.2, 11.5, H-9), 2.36 (1H, t, 9.0, H-17), 2.37 (1H, dd, 6.0, 11.1, H-5), 2.12 (1H, ddd, 4.5, 13.0, 13.0 H-4a), 1.97 (2H, m, H-11a, H16a), 1.85 (1H, dd, 4.5, 13.5, H-4b), 1.81 (1H, m, H-15a), 1.79 (1H, m, H-24a), 1.71 (2H, m, H-11b, H-16b), 1.68 (1H, m H-15b), 1.53 (1H, m, H-23a), 1.44 (1H, dd, 11.7 13.0, H-1a), 1.44 (1H, m, H-24b), 1.22 (1H, m, H-23b), 1.21 (1H, dd, 11.0, 13.2, H-1b), 1.19 (3H, s, CH₃-21), 0.95 (3H, s, CH₃-19), 0.91 (3H, d, 6.7, CH₃-26), 0.90 (3H, d, 6.9, CH₃-27), 0.88 (3H, s, CH₃-18).

RMN¹³C (MeOH-*d*₄, 75 MHz) δ (ppm): 206.43 (s, C-6), 167.96 (C-8), 122.13 (C-7), 85.22 (C-14), 77.97 (C-20), 77.84 (C-22), 68.71 (C-2), 68.52 (C-3), 51.79 (C-5), 50.47 (C-17), 39.25 (C-10), 37.65 (C-24), 37.37 (C-1), 35.12 (C-9), 32.85 (C-4), 32.51 (C-12), 31.77 (C-15), 30.48 (C-23), 29.22 (C-25), 24.39 (C-19), 23.41 (C-26), 22.73 (C-27), 21.50 (C-11, C-16), 20.98 (C-21), 18.02 (C-18).

Acetilación de ponasterona (41).

A una muestra de 10 mg de ponasterona se le adicionaron 50 μ l de piridina y 0.1 ml de anhídrido acético, esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 h. Al término del tiempo se detuvo la reacción con adición de hielo. El producto de reacción fué extraído en 4 ocasiones con 10 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó para eliminar los residuos de piridina (HCl 10%) y posteriormente el exceso de acidez (solución saturada de NaHCO₃), el producto final después de eliminar el disolvente, es un sólido translúcido que se caracterizó como el 2,3,22-triacetato de ponasterona (41a).

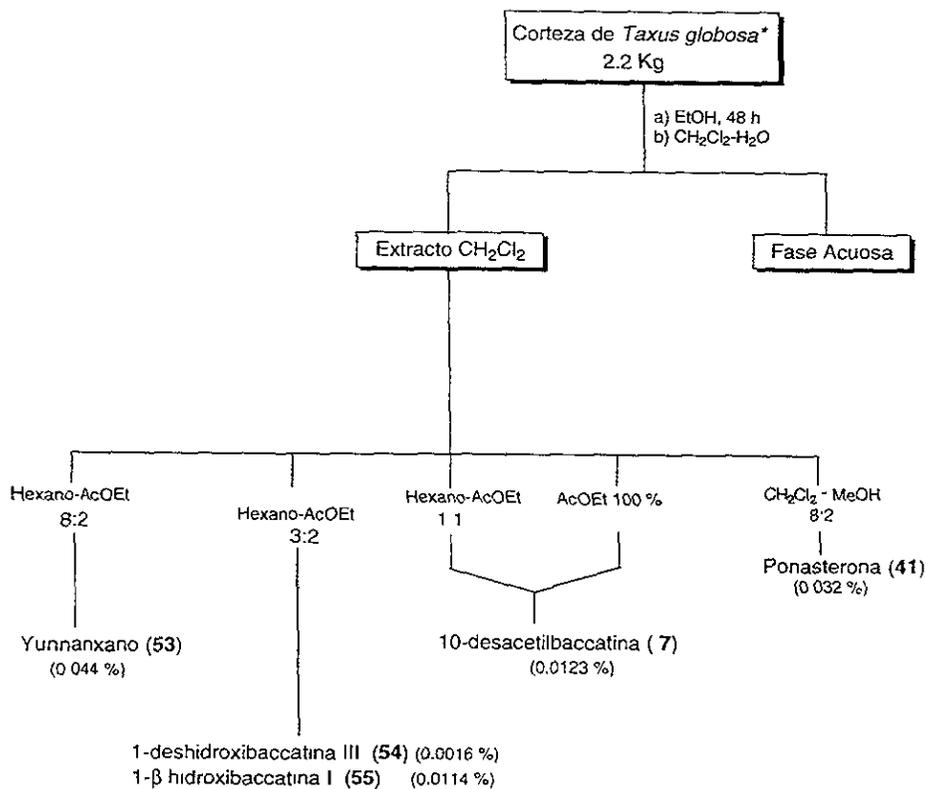


2,3,22, triacetato de ponasterona (41a).

Experimental

^1H NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 5.87 (1H, d, 2.4, H-7), 5.36 (1H, d, 1.0, H-3), 5.07 (1H, ddd, 3.3, 7.8, 11.7, H-2), 4.83 (1H, dd, 2.4, 10.4, H-22), 3.12 (1H, ddd, 3.0, 8.1, 11.0, H-9), 2.40 (1H, dd, 4.8, 13.5, H-5), 2.35 (1H, t, 9.7, H-17), 2.13 (6H, s, OCOCH_3), 2.01 (3H, s, OCOCH_3), 1.25 (3H, s, CH_3 -21), 1.04 (3H, s, CH_3 -19), 0.89 (3H, d, 6.6, CH_3 -26), 0.89 (3H, d, 6.6, CH_3 -27), 0.86 (3H, s, CH_3 -21).

Diagrama 2. Constituyentes del extracto diclorometánico de la corteza.



* Colectada en Jocotic, Chiapas México (669748 MEXU)

Análisis del extracto de hojas *T. globosa* (población 1)

El extracto diclorometánico de las hojas de *Taxus globosa* (población 1) (5 g) se fraccionó en una columna cromatográfica de 4 cm de diámetro empacada con 25 g de sílice 60 GF₂₅₄, usando mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad ascendente. Se obtuvieron 100 eluatos que fueron reunidos en 15 fracciones (tabla 4).

Tabla 4. Fraccionamiento del extracto diclorometánico de hojas de *T. globosa* (Pob-1).

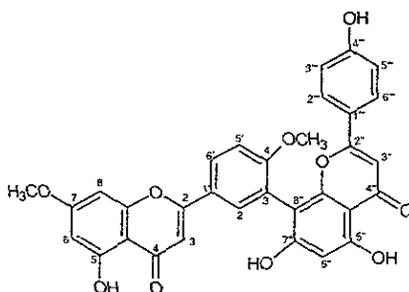
Fracción	Eluyente hexano-AcOEt	Fracción	Eluyente CH ₂ Cl ₂ -MeOH
1	100:0	9	100:0
2	100:0	10	98:2
3	95:5	11	95:5
4	90:10	12	90:10
5	80:20	13	80:20
6	70:30	14	70:30
7	60:40	15	50:50
8	50:50		

La fracción 3 eluida con hexano-acetato de etilo 95:5 fue un residuo de color verde intenso, que se recromatografió en condiciones similares a las descritas anteriormente y se aisló un compuesto sólido de punto de fusión de 136°C que se caracterizó como β -sitosterol mediante el análisis de los datos espectroscópicos y la comparación con una muestra auténtica.

Al igual que en el extracto de corteza, las primeras fracciones se constituyen de mezclas complejas de sustancias de naturaleza hidrofóbica en su mayoría ácidos grasos.

Aislamiento de ginkgetina (49).

De la fracción 8 eluida con hexano-acetato de etilo 1:1 (50 mg), se aisló mediante recristalizaciones sucesivas de metanol-acetona 1.1 un compuesto que se caracterizó como el biflavonoide ginkgetina (49).



ginkgetina (49)

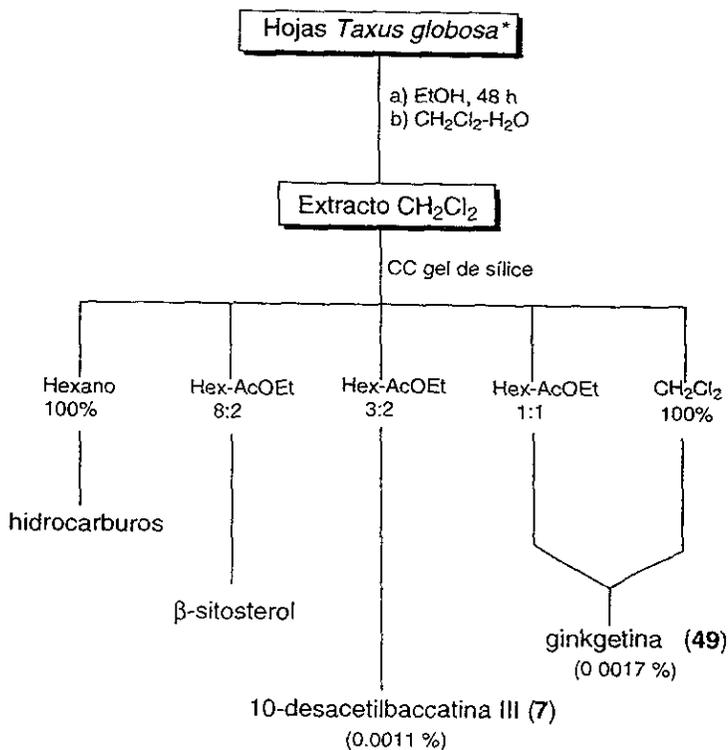
RMN¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 13.07 (1H, s, OH), 12.90 (1H, s, OH), 10.80 (1H, s, OH-7"), 10.26, (1H, s, OH-4"), 8.22 (2H, dd, 2.4, 9.0, H-6"), 8.09 (1H, d, 2.4, H-2'), 7.59 (1H, d, J=9.3, H-2", H-6"), 7.49 (1H, d, 8.7, H-3", H-5"), 7.36 (1H, d, 9.0, H-5'), 7.00 (1H, s), 6.93 (1H, d, 9.0, H-3",H-5"), 6.90 (1H,s, H-3), 6.80 (1H, d, 2.4, H-6), 6.80 (1H, s, H-6), 6.71 (1H, d, 9.0, H-), 6.40 (1H, s, H-6"), 6.36 (1H, d, 2.4, H-8), 3.82 (3H, s, CH₃O), 3.79 (3H, s, CH₃O), 3.78 (3H, s, CH₃O), 3.74 (3H, s, CH₃O).

RMN¹³C (75 MHz, DMSO) δ (ppm): 181.90 (C-4, C-4"), 165.13 (C-7"), 163.60 (C-2, C-2"), 161.66 (C-7), 161.04(C-4', C-4"), 160.55 (C-5, C-5"), 157.32 (C-8"a), 130.84 (C-2'), 128.26 (C-6'), 127.92 (C-2', C-6"), 122.29 (C-3'), 121.15 (C-1'), 115.74 (C-3", C-5"), 111.71 (C-5'), 104.70 (C-3"), 103.78 (C-4"a), 102.48 (C-4a), 98.09 (C-69), 92.67(C-8, C-8'), 55.98 (OCH₃), 55.89 (OCH₃)

Aislamiento de β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo.

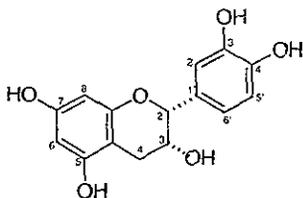
Las fracciones más polares de este extracto (12-14), un residuo semisólido de color rojo intenso se constituye de tres sustancias mayoritarias de acuerdo al análisis cromatográfico realizado en placas de capa fina. El residuo (200 mg) fue disuelto en metanol y filtrado sobre carbón activado. La fracción orgánica se recrystalizó de metanol-acetona 1:1 para obtener un compuesto sólido que fué caracterizado como β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo. La estructura de esta sustancia se estableció mediante análisis espectroscópicos.

Diagrama 3. Constituyentes del extracto diclorometánico de las hojas.



Análisis del extracto butanólico de la corteza de *Taxus globosa* (población 1).

El residuo butanólico (3.0 g) es un sólido de color oscuro que fué adsorbido en sephadex LH-20 (1.0 g) y aplicado a una columna de 5.0 cm de diámetro empacada con el mismo soporte (15 g). La columna se eluyó a presión reducida con mezclas de H₂O-MeOH, obteniéndose 50 eluatos de 25 ml. Un análisis de los eluatos en cromatografía en capa fina utilizando un sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH 8:2 mostró dos constituyentes principales (Rf 0.8 y 0.65) que absorben en el UV a 254 y 356 nm. Las fracciones 10-17 enriquecidas con el compuesto de Rf mayor, fueron reunidas y aplicadas en una placa cromatográfica preparativa de gel de sílice que fué eluída con un sistema CH₂Cl₂-MeOH 85:15 en dos ocasiones. Se separó la zona diferenciable en UV y fue extraída con el mismo sistema de elución en cuatro ocasiones. El compuesto caracterizado es un sólido de color rojo identificado como *epi*-catequina (56).

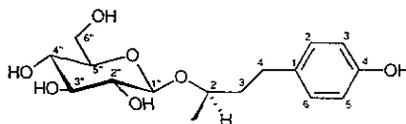


epi-catequina (56).

RMN¹H (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 6.95 (1H, d, 2.0, H-2'), 6.78 (1H, dd, 2.0, 8.0, H-6'), 6.74 (1H, d, 8.0, H-5'), 5.93 (1H, d, 2.0, H-8), 5.90 (1H, d, 2.0, H-6), 4.80 (1H, s, H-2), 4.17 (1H, m, 3.0, 4.5, H-3), 2.85 (1H, dd, 4.5, 17.0, H-4a), 2.74 (1H, dd, 3.0, 17.0, H-4b).

RMN¹³C DEPT (125 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm): 158.14 (s, C-4'), 157.82 (s, C-8a), 157.75 (s, C-5), 157.43 (s, C-7), 146.27 (s, C-3'), 132.18 (s, C-1'), 119.31 (d, C-6'), 115.92 (d, C-2'), 115.34 (d, C-5'), 100.11 (d, C-4a), 96.53 (d, C-8), 95.93 (d, C-6), 79.95 (d, C-2), 67.55 (d, C-3), 29.24 (t, C-4).

El otro constituyente mayoritario de este extracto es un sólido de punto de fusión 185-186 °C que fué aislado de las fracciones 18-20 de la columna anterior. Las fracciones (110 mg) fueron aplicadas en una columna que se eluyó a presión normal con un gradiente de diclorometano-metanol de polaridad ascendente. Los eluatos obtenidos con CH₂Cl₂-MeOH 9:1 (80 mg) se reunieron y se recristalizaron de metanol. Posteriormente se llevo a cabo una recristalización de metanol-acetona 1:1 para su purificación. Las propiedades de este compuesto concuerdan con las informadas para el 2-(β-D-glucopiranosil), 4-(4'-hidroxifenil)-butano (betulósido = rhododendrina) (**57**).



2-(β-D-glucopiranosil), 4-(4'-hidroxifenil)-butano (**57**).

IR ν_{\max} (MeOH) cm^{-1} : 3350, 3252, 1616, 1516, 1442, 1380, 1247, 1088, 1010

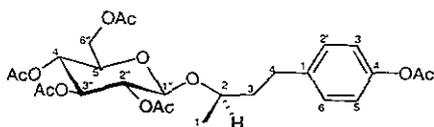
RMN¹H (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 7.02 (2H, d, 9.0, H-3', H-5'), 6.66 (2H, d, 9.0, H-2', H-6'), 4.32 (1H, d, 7.9, H-1''), 3.86 (1H, dd, 2.4, 11.7, H-6''), 3.86 (1H, dd, 2.4, 11.7, H-), 3.67-3.71 (1H, dd, 5.4, 10.5, H-), 3.14-3.36 (4H, m, H-2, H-5, H-), 2.60 (2H, ddd, 2.7, 6.6, 12.0, H-4), 1.84 (1H, m, H-3b), 1.67 (1H, m, H-3a), 1.18 (3H, d, 6.0, H-1).

RMN¹³C (75 MHz, MeOH-*d*₄) δ (ppm): 156.21 (s, C-8), 134.68 (s, C-5), 130.38 (d, C-2', C-6'), 116.01 (d, C-3', C-5'), 102.26 (d, C-1''), 78.18 (C-), 77.78 (d, C-2'), 75.14 (d, C-2), 71.75 (d, C-4''), 62.87 (t, C-6'), 40.57 (t, C-4), 31.80 (t, C-3), 19.93 (q, C-1).

EM (IE, 70 eV) m/z : 328 (M⁺), 177 (C₆H₉O₆⁺), 148 (*p*-HO-C₆H₄CH₂CH=CHMe), 107 (C₇H₇O⁺, PB), 77, 73, 53, 45.

Acetilación de betulósido (57).

A una muestra de 20 mg de betulósido se le adicionaron 100 μ l de piridina y 0.2 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h, al término de este tiempo se realizó el procedimiento descrito anteriormente (acetilación de ponasterona) para la obtención del producto acetilado. El derivado acetilado del betulósido (57a) presenta las señales siguientes en resonancia magnética nuclear.

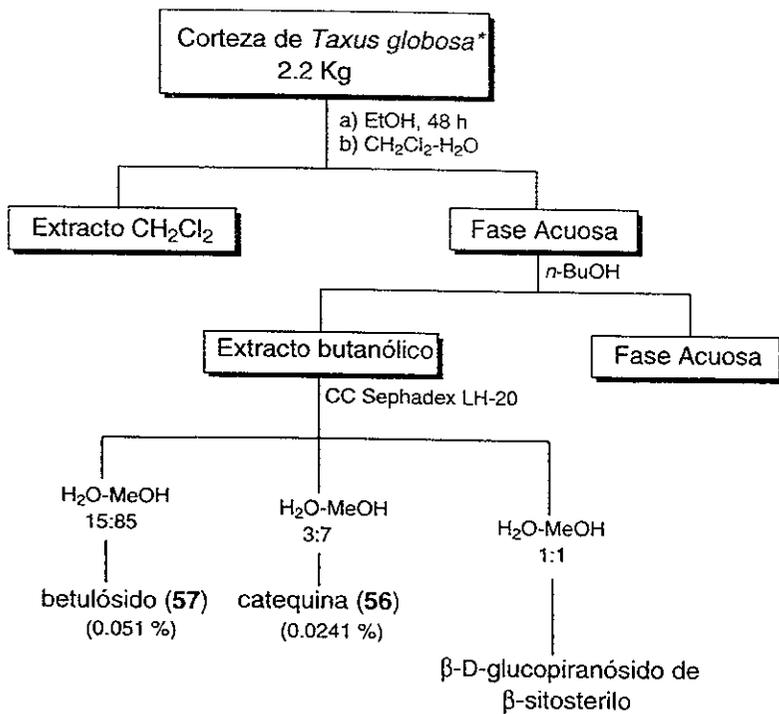


Derivado acetilado del betulósido (57a).

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm), Int., mult., J (Hz): 7.19 (2H, d, 8.7, H-3', H-5'), 6.96 (2H, d, 8.4, H-2', H-6'), 5.22 (1H, dd, 9.3, 9.9, H-3''), 5.10 (1H, dd, 9.0, 9.9, H-4''), 4.99 (1H, dd, 8.1, 9.3, H-2''), 4.54 (1H, d, 8.1, H-1''), 4.25 (1H, dd, 4.5, 12.0, H-6''a), 4.14 (1H, dd, 2.4, 12.0, H-6''b), 3.77 (1H, m, H-2), 3.66 (1H, ddd, 2.4, 4.8, 8.8, H-5'), 2.68 (2H, m, H-4), 2.28 (3H, s, OCOCH₃), 2.05 (3H, s, OCOCH₃), 2.04 (3H, s, OCOCH₃), 2.03 (3H, s, OCOCH₃), 2.01 (3H, s, OCOCH₃), 1.84 (1H, m, H-3a), 1.70 (1H, m, H-3b), 1.15 (d, 7.0, H-1).

RMN¹³C DEPT (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.71 (s, C=O), 170.34 (s, C=O), 169.63 (s, C=O), 169.42 (s, C=O), 148.75 (s, C=C), 139.71 (s, C=C), 129.50 (d, C-3', C-5'), 121.22 (d, C-2', C-6'), 99.14 (d, C-1''), 74.66 (d, C-3''), 72.97 (d, C-5''), 71.71 (d, C-2''), 71.55 (d, C-2), 68.60 (d, C-4''), 62.08 (t, C-6''), 38.43 (t, C-4), 30.64 (t, C-3), 21.11 (q, OCOCH₃), 21.11 (q, OCOCH₃), 20.62 (q, OCOCH₃), 20.62 (q, OCOCH₃), 20.62 (q, OCOCH₃), 19.82 (q, C-1).

Diagrama 4. Constituyentes del extracto butanólico de corteza.



Análisis de *Taxus globosa* (población 2).

Con el objeto de facilitar el análisis de los extractos de la población 2, se utilizaron como referencia los compuestos aislados de la corteza de *T. globosa* colectada en Chiapas. Se realizó un análisis comparativo de los diferentes extractos mediante cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) observándose algunas similitudes, sobre todo en los extractos de hojas. Como el objetivo principal era la detección del taxol o sustancias análogas y dada la abundancia de estos, se decidió realizar un fraccionamiento similar al descrito en las páginas anteriores. Las fracciones que presentaban compuestos de R_f y tiempo de retención similar a los taxanos aislados, se analizaron nuevamente por HPLC.

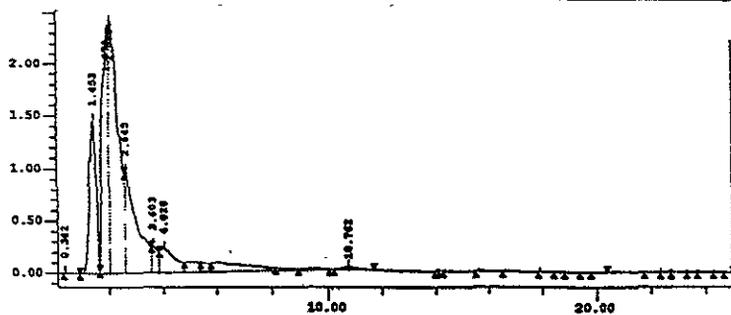
Preparación de las muestras para análisis mediante HPLC.

Los extractos diclorometánicos de madera y hojas de *T. globosa* población de Hidalgo, fueron secados mediante la adición de sulfato de sodio anhidro y posterior evaporación del disolvente. Se tomó una alícuota de 10 mg de cada extracto y cada muestra fue disuelta en 1 ml de cloroformo o metanol grado HPLC. Las soluciones fueron pasadas por unidades de filtración con membranas Durapore® de 0.45 μm . El filtrado final se analizó en el cromatógrafo de líquidos. En el caso de las sustancias puras, 1 mg de compuesto fué disuelto en 500 μL de disolvente para su análisis.

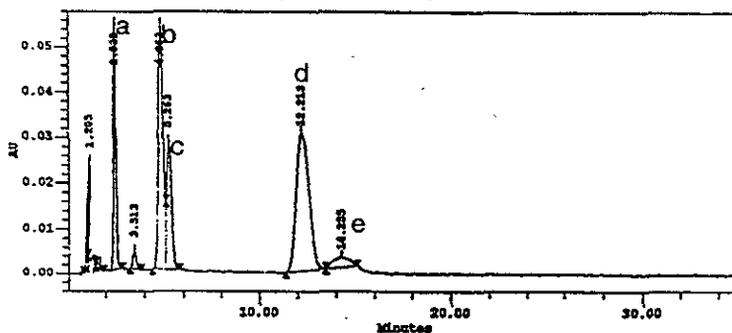
Se utilizaron diferentes condiciones de análisis que se resumen en la tabla 5. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras 20, 21 y 22.

Tabla 5. Condiciones de análisis en HPLC.

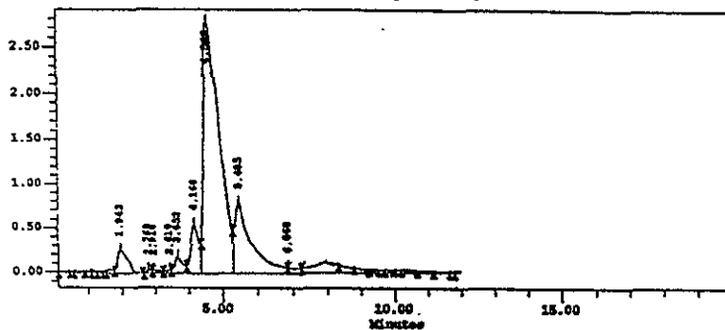
Método	1	2	3
Columna	μ -bondapak C-18 3.9 x 300 mm	Curosil B 3.2 x 250 mm	Lichrosorb RP-18 4.0 x 250 mm
Fase móvil	$\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ 65:35	$\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ 40:60	$\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}-\text{MeOH}$ 35:45:20
Detector	UV 230 nm	UV 230 nm	UV 230 nm
flujo	1.0 ml/min isocrático	1.0 ml/min isocrático	0.5 ml/min isocrático



a. método 1: μ -bondapak C-18, CH₃CN- H₂O 65: 35, UV 230 nm, 1 ml/min.



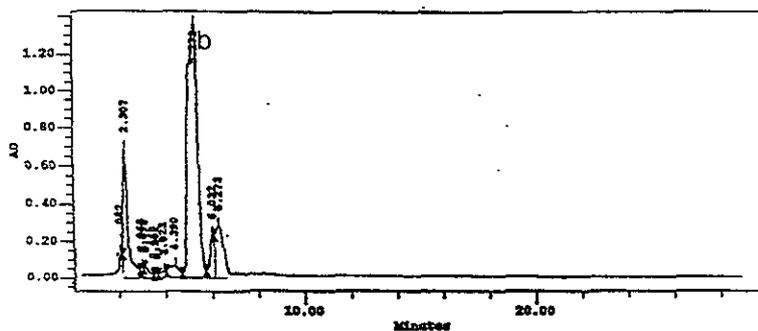
b. método 2: Curosil B, CH₃CN- H₂O 40: 60, UV 230 nm, 1 ml/min

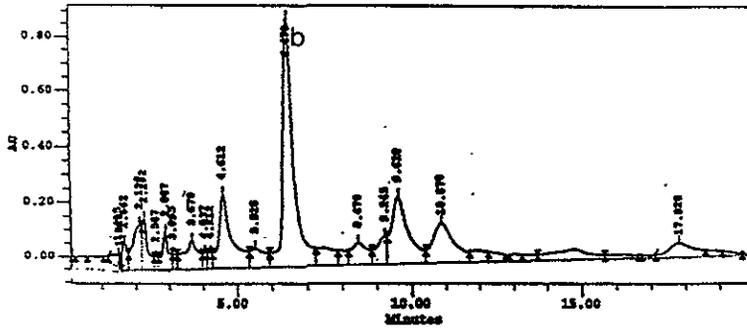


c. método 3: Lichosorb RP-18, CH₃CN- H₂O-MeOH 40: 35: 25.

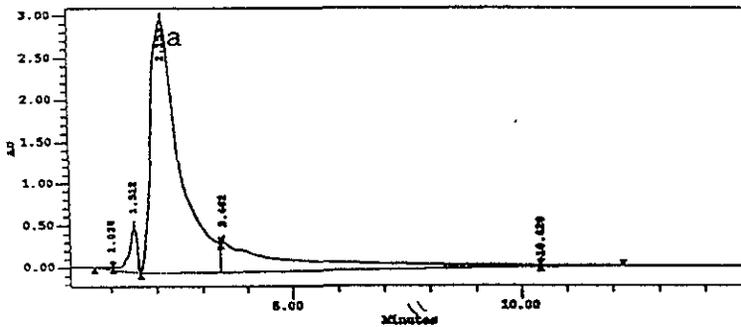
Figura 20. Cromatograma de una mezcla de taxanos: a) 10-desacetilbaccatina III, b) 1 β -hidroxibaccatina I, c) brevifoliol, d) taxol, e) Yunnanxano y f) 7 β -acetoxitaxusina.

De los cromatogramas anteriores se observa que el método que ofrece una mayor resolución es el método b . Con estas condiciones se realizó el análisis de los extractos y algunas de las fracciones de la colecta de Hidalgo en las que se observaron metabolitos de comportamiento cromatográfico similar a los taxanos aislados.





a. Cromatograma de la fracción eluida con hexano-ACOEt de la madera de *T. globosa* (pob-2)



b Cromatograma de la fracción 16 (eluida con CH_2Cl_2) de madera de *T. globosa* (pob-2)

Figura 22. Cromatogramas de fracciones del extracto de madera de *Taxus* (pob-2).

Como puede notarse es evidente que 10-desacetilbaccatina III (7) se encuentra presente en el extracto de las hojas de la colecta de Hidalgo, aunque la abundancia es menor en comparación con la población de Chiapas.

Los diferentes metabolitos utilizados como referencia no fueron detectados por este método de análisis y posiblemente los constituyentes de estos extractos son otro tipo de sustancias cuya caracterización está en proceso.

Por otro lado, el extracto butanólico de esta colecta presenta una gran similitud en composición con la colecta 1 y los constituyentes aislados son el betulósido y el glucósido de β -sitosterol. En la tabla 6 se compara la composición química de ambas poblaciones.

Tabla 6. Composición de las poblaciones de Chiapas (1) e Hidalgo (2) de *T. globosa*.

Compuesto	<i>T. globosa</i> población 1	<i>T. globosa</i> población 2
yunnanxano (53)	✓	
1-deshidroxibacatina III (54)	✓	
1 β -hidroxibacatina I (55)	✓	
10-desacetilbacatina III (7)	✓	✓
ponasterona (41)	✓	✓
gingketina (49)	✓	✓
<i>epi</i> -catequina (56)	✓	
betulósido (57)	✓	✓

Resultados

Constituyentes de la corteza de *Taxus globosa* (población 1).

De las fracciones menos polares del extracto diclorometánico de la corteza de "tejo" mexicano se obtuvo mediante métodos cromatográficos: β -sitosterol y los ácidos palmitoleico, esteárico y oleico como constituyentes principales.

De las fracciones de mediana polaridad se obtuvieron diversos compuestos que presentan patrones de acoplamiento spin-spin similares, de manera que sólo se analizaran en detalle algunos de ellos y se discutieran las diferencias principales.

**$2\alpha,5\alpha,10\beta$ -triacetoxi- 14β (2'-metil,3'-hidroxi)-butiriloxi-taxa-4(20)-11(12)-dieno.
(yunnanxano. 53).**

En las fracciones 11 y 12 obtenidas de la columna inicial del extracto de corteza, se obtuvo un sólido que presenta en su espectro en el IR (espectro 1) las señales características de grupos hidroxilo en 3616 cm^{-1} , así como la absorción típica de un grupo carbonilo en 1728 cm^{-1} que indica la presencia de grupos éster. Dos señales de baja intensidad en 1640 y 1450 cm^{-1} sugieren la presencia de dobles enlaces.

En el espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece (espectro 3) se observan señales para 31 carbonos que se asignan a 9 metilos, 5 metilenos, 8 metinos y 9 carbonos cuaternarios de acuerdo con el experimento DEPT (espectro 4).

En el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (espectro 2) se aprecian las señales que confirman la existencia de los nueve grupos metilo en la molécula: tres señales simples en δ 0.84, δ 1.13, δ 1.67, que deben corresponder a metilos sobre carbono cuaternario, una señal simple ancha en δ 2.10 se asigna a un metilo vinílico, dos señales dobles con una constante de acoplamiento de 7.0 Hz en 1.16 y 1.21 ppm que corresponden a dos metilos secundarios. Además la molécula debe contener tres ésteres del ácido acético ya que se observan tres señales simples agudas en δ 2.03, δ 2.06 y δ 2.18 que son típicas de los metilos de acetato, lo cual está de

acuerdo con la absorción de los grupos carbonilo en el IR y se justifican tres de las señales (δ 170.18, δ 169.74, δ 169.90) a campo bajo en el espectro de RMN¹³C. La cuarta señal apreciable a campo bajo (δ 174.75) en el espectro 3 debe corresponder muy probablemente al carbonilo de un éster que involucra los dos metilos secundarios y un grupo oxhidrilo, esto es, un éster del ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico.

La presencia de los cuatro ésteres implica la existencia de 9 oxígenos que junto con los datos aportados por los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono trece permiten establecer la fórmula molecular C₃₁H₄₆O₉ para este compuesto. El grado de insaturación es 9 y se puede explicar de la siguiente manera: cuatro insaturaciones se justifican por los carbonilos de los ésteres, dos corresponden a dobles enlaces que se infieren de las señales en δ 142.3, δ 135.4, δ 134.6 y δ 116.8 observables en el espectro 3, finalmente las insaturaciones restantes deben corresponder a tres ciclos.

En el espectro de correlación homonuclear H-H (COSY, espectro 5), se observa una clara interacción entre las señales de los metilos secundarios en 1.16 y 1.21 ppm y las señales de hidrógenos metínicos en 2.40 y 3.81 ppm respectivamente, este último por su desplazamiento químico debe corresponder muy probablemente a un hidrógeno geminal a una función oxigenada, es decir, soporta al grupo oxhidrilo.

La señal doble de dobles en δ 6.06 (J= 5.7, 12.1 Hz) se debe a un hidrógeno metínico base de un grupo éster que a juzgar por el desplazamiento puede ser alílico, este hidrógeno muestra una clara correlación con las señales en 1.64 y 2.38 ppm por lo que estas últimas señales se asignan a un metileno. De manera similar la señal doble de dobles en 5.36 ppm (J= 2.3, 6.6 Hz), la señal triple en δ 5.30 (J=2.9) y el doble de dobles de 5.04 ppm (J=4.8, 9.2 Hz) se asignan a los metinos base de éster.

En el espectro 5 se observan las interacciones entre la señal en δ 5.36 con las señales en 2.93 y 1.91 ppm que corresponden a dos metinos alifáticos. Por otro lado el hidrógeno que resuena en 5.30 ppm muestra interacciones con la señal en δ 1.80 que se atribuye a un metileno. Así mismo la señal en 5.04 ppm muestra interacciones con las señales en δ 2.39 y δ 2.85 que corresponden probablemente a un metileno alílico.

Además es apreciable un sistema de dos señales simples en δ , 5.28 y δ 4.83 que se atribuyen a un metileno vinílico.

Los fragmentos estructurales derivados del análisis anterior se muestran en la figura 23.

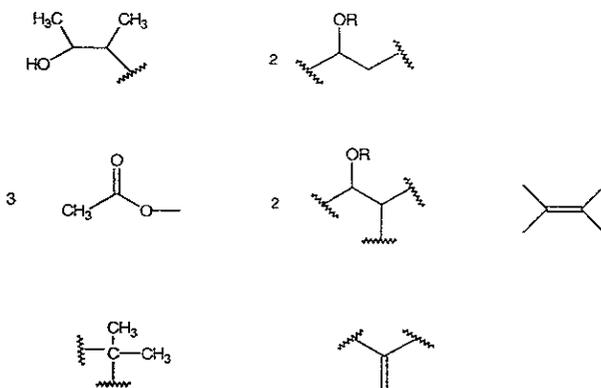


Figura 23. fragmentos estructurales

De acuerdo con los datos del experimento DEPT, así como los correspondientes de correlación heteronuclear a un enlace (HMQC, espectro 6) y a larga distancia (HMBC, espectro 7) permiten establecer un esqueleto de tipo taxa-4(20)-11(12)-dieno para este compuesto. Las señales en δ 6.06 (H-10), δ 5.36 (H-2), δ 5.30 (H-5) y δ 5.04 (H-14) correlacionan con las señales dobles en 70.04 (C-10), 70.42 (C-2), 78.19 (C-5) y 70.72 (C-14) ppm respectivamente, así como las señales en δ 2.93 (H-3) y δ 1.91 (H-1) con las señales en δ 42.15 (C-3) y δ 59.12 (C-1), mientras que las señales en 1.64 (H-9 α) y 2.38 (H-9 β) ppm, lo hacen con la señal triple en δ 43.88 (C-9) y las señales en δ 2.39 (H-13 α) y δ 2.85 (H-13 β) con la señal triple en 39.49 (C-13) ppm.

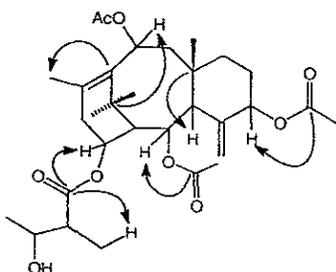
Las asignaciones para cada hidrógeno y carbono realizadas mediante los espectros HMQC y COSY se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Asignaciones realizadas con el espectro COSY y HMQC.

Asignación	δ Hidrógeno	δ Carbono	
1	1.91 d (2.3)	59.12	
2	5.36 dd (2.3, 6.6)	70.42	
3	2.93 d (6.6)	42.15	
5	5.30 t (2.9)	78.19	
6	1.80 m	28.88	
7	1.24 m	33.82	
	1.96 m		
9	1.64 dd (5.7, 14.8)	43.88	
	2.38 m		
10	6.06 dd (5.7, 12.1)	70.04	
13	2.39 m	39.49	
	2.85 dd (9.2, 19.0)		
14	5.04 dd (4.8, 9.2)	70.72	
16	1.67 s	25.37	
17	1.13 s	31.67	
18	2.10 s	20.92	
19	0.85 s	22.46	
20	4.83 s	116.88	
	5.28 s		
2'	2.4 q (7.2)	46.97	
3'	3.86 m	69.47	
4'	1.21 d (6.3)	20.83	
5'	1.16 d (7.2)	13.97	
OCOCH ₃	2.03 s	21.38	169.74
	2.06 s	21.38	169.90
	2.18 s	21.87	170.18

δ en ppm determinados en CDCl₃ a 500 MHz, J en Hz

Para establecer la posición del éster 3-hidroxi-2-metilbutírico, se recurrió al espectro HMBC (espectro 7) en el que se aprecia claramente la correlación entre la señal del carbonilo en 174.7 ppm y las atribuidas al metilo del butirato en 2.4 ppm y H-14 en 5.04 ppm, por lo que en la posición catorce se debe localizar el éster 3-hidroxi-2-metilbutírico. Otras correlaciones observadas corresponden a la interacción de los grupos carbonilo en 169 ppm con las señales asignadas a H-2 y H-5 que confirman la posición de los acetatos. Con todos los datos anteriores se puede establecer la estructura **53** que se muestra en la figura 24 para el primer taxano aislado de *T. globosa*. En la misma figura se muestran las correlaciones observadas en el espectro HMBC.



53

figura 24. correlaciones observadas en el espectro HMBC.

Respecto a la estereoquímica de los centros quirales localizados en 1, 2, 3, 5, 8, 10, 14, 2' y 3'. Se conoce con base en la biogénesis que el metilo en 19 tiene orientación β al igual que la función oxigenada en la posición 10, mientras que el hidrógeno en C-3 tiene orientación α . Por lo que la configuración de los centros estereogénicos 3, 8 y 10 se encuentra establecida.³⁷ Para determinar la configuración de los centros restantes se realizó un análisis de las constantes de acoplamiento: H-10 se encuentra en una orientación α y presenta un acoplamiento de 6.0 Hz con uno de los hidrógenos en 9 y otro acoplamiento *trans* diaxial a juzgar por la magnitud de la constante de acoplamiento de 12 Hz (figura 25).

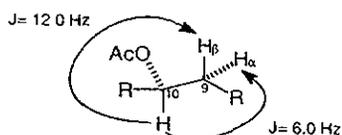


Figura 25. acoplamiento de H-10

El hidrógeno 3 que resuena en 2.93 ppm presenta un acoplamiento de 6.5 Hz con H-2 que supone un acoplamiento axial-ecuatorial, por lo que el acetato en 2 tiene una orientación α . Además H-2 tiene un acoplamiento de 2.5 Hz con H-1 que se puede explicar con una conformación sinclinal con un ángulo diedro (ϕ) de 50° o 120° , en consecuencia el hidrógeno en 1 es β .

H-5 que se encuentra acoplado con H-6 presenta sólo una constante de acoplamiento de 3.0 Hz con los hidrógenos del metileno, lo que supone una disposición como se muestra en la figura 26 y el acetato se encuentra en posición α .

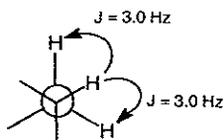


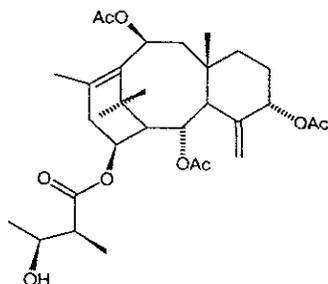
Figura 26. configuración de C-5

La configuración del éster derivado del butírico no se puede establecer mediante el análisis de las constantes de acoplamiento entre los hidrógenos H-2', H-3' y H-5', en consecuencia las posibilidades son 2' *R*, 3' *S* o bien 2' *S*, 3' *R* (figura 27).



figura 27. configuración de C-2' y C-3'.

En resumen el compuesto aislado de *T. globosa* presenta las características de 2 α ,5 α ,10 β -triacetoxi,14 β -(2'-metil,3'-hidroxil)-butiriloxi-taxa-4(20),11(12)-dieno (**53**), aislado anteriormente de *T. yunnanensis* en el que la configuración del butirato se ha establecido como 2'-*R* y 3'-*S* mediante estudios de degradación del éster y comparación de la rotación óptica del ácido libre.⁹⁶



2 α ,5 α ,10 β -triacetoxi,14 β -(2'-metil,3'-hidroxi)-butiriloxi-taxa-4(20),11(12)-dieneo
(yunnanxano 53).

En lo que respecta a la conformación de esta molécula se ha establecido que el anillo A corresponde a un bote distorsionado con fusión *cis* al anillo B que adopta una conformación silla-bote fusionado *trans* al anillo C en una conformación de silla distorsionada, esto se muestra en la figura 28.

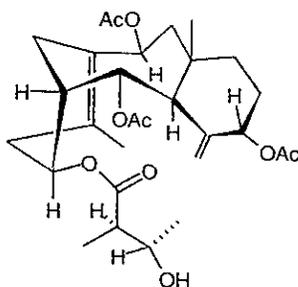


Figura 28. conformación de yunnanxano (53).

En las tablas 8 y 9 se muestran los datos de RMN¹H y ¹³C experimentales del compuesto aislado de *T. globosa* comparados con los informados en la literatura para el yunnanxano aislado de *T. yunnanensis*.⁹⁶

Tabla 8. Datos RMN¹H de yunnanxano (53)

Hidrógeno	Experimental	Referencia ⁹⁶
	(CDCl ₃ , 500 MHz)	(CDCl ₃ , 300 MHz)
1	1.91 d (2.3)	1.91 d (2.3)
2	5.36 dd (2.3, 6.6)	5.36 dd (2.3, 6.6)
3	2.93 d (6.6)	2.93 d (6.6)
5	5.30 t (2.9)	5.3 t (2.9)
6	1.80 m	1.8 m
7 α	1.24 m	1.24 m
7 β	1.96 m	1.96 m
9 α	1.64 dd (5.7, 14.8)	1.64 dd (5.7, 14.8)
9 β	2.38 m	2.38 m (12.1)
10	6.06 dd (5.7, 12.1)	6.06 dd (5.7, 12.1)
13 α	2.39 m	2.39 m (14.8, 19.0)
13 β	2.85 dd (9.2, 19.0)	2.85 dd (9.2, 19.0)
14	5.04 dd (4.8, 9.2)	5.04 dd (4.8, 9.2)
16	1.67 s	1.67 s
17	1.13 s	1.13 s
18	2.10 s	2.10 s
19	0.85 s	0.85 s
20 α	4.83 s	4.83 s
20 β	5.28 s	5.28 s
2'	2.4 q (7.2)	2.4 q (7.2)
3'	3.86 m	3.86 m
4'	1.21 d (6.3)	1.21 d (6.3)
1''	1.16 d (7.2)	1.16 d (7.2)
OCOCH ₃	2.03 s	2.03 s
	2.06 s	2.06 s
	2.18 s	2.18 s

Tabla 9. Datos de RMN¹³ C de yunnanxano (53).

Carbono	Experimental		Referencia ⁹⁶	
	(CDCl ₃ , 125 MHz)		(CDCl ₃ , 75 MHz)	
1		59.12		59.12
2		70.42		70.42
3		42.15		42.15
4		142.31		142.31
5		78.19		78.19
6		28.88		28.88
7		33.82		33.82
8		39.66		39.66
9		43.88		43.88
10		70.04		70.04
11		135.43		135.43
12		134.60		134.60
13		39.49		39.49
14		70.72		70.72
15		37.27		37.27
16		25.37		25.37
17		31.67		31.67
18		20.92		20.92
19		22.46		22.46
20		116.88		116.88
OCOCH ₃		21.38		21.38
		21.38		21.38
		21.87		21.87
C=O	169.74	169.90	169.74	169.90
	170.18	174.75	170.18	174.75
2'		46.97		46.97
3'		69.47		69.47
4'		20.83		20.83

2 α -benzoiloxi,4 α -acetoxi-1 β ,7 β ,10 β ,13 α -tetrahidroxi-4 β (20),5 β -oxetan-tax-11(12)-en-9-ona.
(10-desacetilbaccatina III, 7).

De las fracciones 18 y 19 de la columna original del extracto de corteza se obtuvo un segundo taxano como un sólido con punto de fusión de 244-245 °C, que presenta en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (espectro 8) las señales características de tres metilos cuaternarios δ 0.94, δ 0.95 y δ 1.53, un metilo vinílico en δ 1.90 y un solo metilo de acetato en 2.20 ppm.

En 8.02, 7.56 y 7.66 resuenan cinco hidrógenos aromáticos, por lo que se puede pensar en la existencia de un anillo aromático monosustituido. Por otro lado el desplazamiento de 8.02 de dos de estos hidrógenos indica la presencia de un grupo electroatractor. En este mismo espectro aparece un sistema AB en 5.40 y 3.81 ppm ($J=7.0$ Hz) característico de hidrógenos geminales a una función oxigenada que correlacionan respectivamente con las señales en δ 74.8 y δ 46.5 del espectro de RMN¹³C (espectro 9). Este sistema AB es muy similar al observado en el espectro 2 en δ 5.36 (H-2) y δ 2.93 (H-3) por lo que se piensa en un esqueleto similar.

En el espectro de RMN¹³C (espectro 9) se aprecian 29 señales de carbono, las cuales de acuerdo al experimento DEPT (espectro 10) corresponden a 5 metilos, 3 metilenos, 11 metinos y 10 carbonos totalmente sustituidos. Con la integración del espectro de RMN¹H de 38 hidrógenos se puede pensar en un grado de insaturación de 11.

Las insaturaciones se explican de la siguiente manera: cuatro corresponden al anillo aromático, tres se atribuyen a la presencia de tres carbonilos justificado por las señales en el espectro de carbono trece en δ 210.3, δ 169.5 y δ 165.2. Además existe un enlace tetrasustituido que se deduce de la presencia de dos carbonos cuaternarios en 141.5 y 134.5 ppm. Las insaturaciones restantes se ajustan a un sistema de tres ciclos que apoya la idea del esqueleto de taxano.

El desplazamiento a campo más bajo de uno de los carbonilos sugiere la presencia de cetona y la estructura de una baccatina (figura 29).

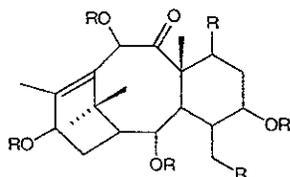


Figura 29. Esqueleto de baccatina.

Mediante el análisis del experimento de correlación homonuclear COSY (espectro 11) y de correlación heteronuclear a un enlace (HMQC, espectro 12) son identificables dos sistemas AB_2 que se pueden asignar a H-13 (4.62) que correlaciona con la señal en $RMN^{13}C$ en 66.04 ppm (C-5) y muestra una clara interacción con las señales de un metileno en δ 2.28 y δ 2.15 (H-14). Asimismo en 4.92 resuena H-5 que muestra interacción con las señales en 2.28 y 1.65 correspondientes a H-6 que correlaciona con la señal en 36.5 ppm (C-6). El metileno restante debe ser geminal a oxígeno por el desplazamiento de los hidrógenos en 4.03 ppm que correlaciona con la señal en 75.45 ppm. Estos datos concuerdan con los correspondientes a una estructura de baccatina.

En la tabla 10 se muestran las asignaciones realizadas para las señales observadas en los espectros 11 y 12 de este compuesto.

Tabla 10. Asignaciones realizadas con los espectros COSY-HMQC.

Asignación	Hidrógeno δ en ppm, m (J en Hz)	Carbono δ en ppm
2	5.41, d (7.0)	74.83
3	3.81, d (7.0)	46.5
5	4.92, dd (1.5, 9.5)	83.7
6	2.28, t (14.5)	36.5
	1.65, td (14.0)	
7	4.10, m	70.701
10	5.14, d (2.5)	74.34
13	4.62, m	66.04
14	2.28, dd (3.0, 14.5)	39.4
	2.15, d (9.0)	
16	0.94, s	26.73
17	0.95, s	20.12
18	1.90, s	14.74
19	1.53, s	9.66
20	4.03, s	75.45
2'	8.02, dd (1.5, 8.1)	129.4
3'	7.56, d (7.5)	128.6
4'	7.66, dd (1.5, 7.5)	133.12
5'	7.56, d (7.5)	128.6
6'	8.02, dd (1.5, 8.1)	129.4
CH ₃ CO	2.02	20.65

La asignación de las señales restantes se realizó con la ayuda del espectro HMBC (espectro 13) de esta sustancia en el que se observaron las correlaciones que se muestran en la tabla 11 y el espectro correspondiente.

Tabla 11. Correlaciones observadas en el espectro HMBC.

Señal	Correlación
C-9 (210)	OH-10 (4.75), H-10 (5.13), CH ₃ -19 (1.54)
C=O (169)	CH ₃ (2.02)
C=O (165)	H-2 (5.41), H-2' (8.02)
C-12 (141)	CH ₃ -18 (1.9)
C-11 (134)	CH ₃ -18 (1.9), CH ₃ -17 (0.95), OH-10 (4.75)
C-4 (80.09)	H-5 (4.92), H-20 (4.03), H-3 (3.82)
C-5 (83.7)	H-20 (4.03)
C-10 (74.4)	OH-10 (4.75)

Del experimento anterior (HMBC) es posible establecer la localización del único éster derivado del ácido acético en C-4 que justifica el desplazamiento a campo bajo (δ 80.09) de este carbono y situar al benzoato en C-2 por la interacción observada entre la señal en δ 5.41 (H-2) con el carbonilo en δ 165.4 y uno de los hidrógenos aromáticos en 8.02 ppm. La interacción de C-4 y C-5 con el metileno en δ 4.03 confirma la presencia del anillo de oxetano.

Respecto a la estereoquímica relativa, el desplazamiento a campo alto de C-19 (δ 9.6) indica una interacción γ -gauche por lo que el hidroxilo en C-7 guarda una relación *cis* y dado que el metilo en 19 es β (biogénesis), el hidroxilo en 7 tiene la misma orientación. La configuración en C-10 y C-3 se ha establecido como α . Considerando la conformación silla-bote del anillo de ciclooctano y la orientación α de H-3, el acoplamiento con H-2 supone una disposición axial para ambos por lo que H-2 es β (figura 30). Respecto H-5, es conocida la orientación β del anillo de oxetano y en consecuencia H-5 es α .

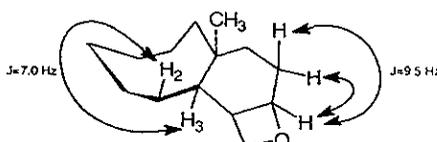
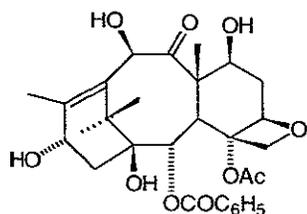
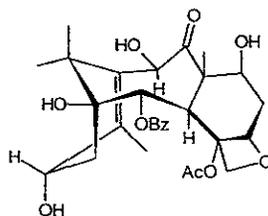


Figura 30.

Los datos anteriores coinciden con los informados para la 10-desacetilbaccatina III (7), uno de los taxanos que se encuentra en mayor abundancia que el taxol (5) en diferentes especies de *Taxus* y que en la actualidad constituye la materia prima para la obtención del mismo.⁹⁷



10-desacetilbaccatina III (7).



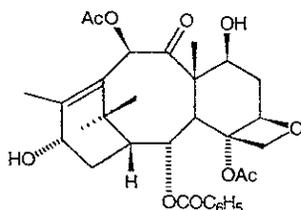
2 α -benzoiloxi-4 α ,10 β -diacetoxi-7 β ,13 α -dihidroxi-4 β (20),5 β -oxetan-tax-11(12)-eno-9-ona.
(1-deshidroxibaccatina III, 54).

De las fracciones 15-17 del extracto diclorometánico de corteza se aislaron dos compuestos que muestran un patrón de acoplamiento spin-spin semejante a la 10-desacetilbaccatina III (7).

El menos polar de ellos es un sólido amorfo que presenta en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (espectro 14) señales para los cuatro metilos típicos del esqueleto de taxano, dos sistemas AB₂ asignables a H-13 (δ 4.89), H-14 (δ 2.61), H-7 (δ 4.4) y H-6 (δ 1.85) y un singulete en δ 6.32 que corresponde a H-10. Además son observables tres señales de hidrógenos geminales a oxígeno en δ 5.62, δ 4.30 y δ 4.15, las dos últimas señales se deben al metileno del anillo de oxetano. Por lo que se deduce una estructura de baccatina III. La presencia de un grupo éster adicional se infiere por el desplazamiento a campo bajo de la señal correspondiente de H-10. Un $\Delta\delta$ de 0.2 ppm en la señal atribuida a H-2 (δ 5.62) de este compuesto respecto a la localizada en δ 5.41 (H-2) de la 10-desacetilbaccatina III (7) sugiere la ausencia del hidroxilo en C-1.

Resultados

Con estos datos se identifica esta sustancia como 1-deshidroibaccatina III (54). En la tabla 12 se muestran los datos de cada señal observada en el espectro y se comparan con los obtenidos para 1-deshidroibaccatina III (54) aislada de *T. yunnanensis*.⁹⁸



1-deshidroibaccatina III (54).

Tabla 12. Datos de RMN ¹H de 1-deshidroibaccatina III.

Hidrógeno	Experimental δ (J=Hz) (CDCl ₃ , 300 MHz)	Referencia ⁹⁸ δ (J=Hz) (CDCl ₃ , 400 MHz)
1	1.94 m	1.96
2	5.62 d (6.9)	5.62 d (8.0)
3	3.88 d (6.6)	4.00 d (8.0)
5	4.98 dd (10.0, 2.4)	5.00 dd (1.0, 9.0)
6	1.85 m	1.86 m
7	4.44 - 4.40 m	2.15 m
10	4.44 - 4.40 m	4.47 dd (7.0, 11.0)
13	6.32 s	6.32 s
14	4.89 t (7.5)	4.88 br t (8.0)
16	2.61 m	2.56 m
17	1.27 s	1.26 s
18	1.12 s	1.10 s
19	2.03	2.00 s
20 α	1.63 s	1.68 s
20 β	4.15 d (8.2)	4.18 d (8.0)
OCOCH ₃	4.30 d (8.2)	4.30 d (8.0)
	2.16 s	2.22 s
	2.28 s	2.37 s
OCOC ₆ H ₅	7.48 d (7.5)	7.46 m
	7.61 t (7.5)	8.05 dd (8.0, 2.0)
	8.10 dd (7.5, 1.5)	

1 β -hidroxi-2 α ,5 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13 α -hexaacetoxi-4(20)-epoxi-tax-11(12)-eno.
(1 β -hidroxibaccatina I, 55).

Otro compuesto aislado de las mismas fracciones 15-17 es un sólido que presenta en el espectro en el infrarojo (espectro 15) una vibración característica de hidroxilo en 3606 cm^{-1} , una señal típica de carbonilo de éster en 1739 cm^{-1} que se confirma con la banda de 1240 cm^{-1} . Además son apreciables las bandas de absorción típicas de dobles enlaces en 1650 y 1460 cm^{-1} .

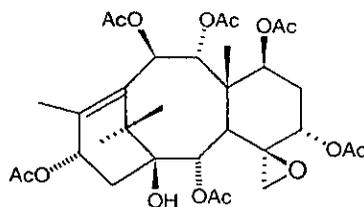
En el espectro de masas determinado por ionización química (espectro 16) se aprecian dos series de fragmentos, una de ellos implica la pérdida sucesiva de 60 unidades de masa y sugiere la presencia de al menos cinco grupos acetato en la molécula, en este espectro aparece un ión en 592 m/z que en primera instancia se puede atribuir al ión molecular, pero se descarta ya que en el espectro de RMN¹³C (espectro 18) aparecen las señales de treinta y dos carbonos de los cuales de acuerdo con el experimento DEPT (espectro 19) corresponden a 12 carbonos totalmente sustituidos, 7 metinos, 3 metilenos y 10 metilos. De la integración del espectro de resonancia de hidrógeno (espectro 17) se obtiene la presencia de 43 hidrógenos que junto con los datos anteriores y los fragmentos en el espectro de masas se puede establecer una fórmula molecular C₃₂H₄₄O₁₄ para este compuesto.

En el espectro de RMN¹H (espectro 17) aparecen un conjunto de señales en la región de 2.00-2.20 ppm que se atribuyen a seis metilos de acetato que justifica la banda de absorción en 1739 cm^{-1} en el infrarojo y la pérdida de ácido acético en el espectro de masas. Asimismo son identificables seis metinos geminales a oxígeno que corresponden a: un sistema AB en δ 6.21 y δ 6.03 con un acoplamiento de 11.0 Hz (disposición antiperiplanar) que se atribuye a H-10 y H-9; una señal triple en δ 6.09 generado por H-13; un hidrógeno en δ 5.49 (H-2); una señal doble de dobles en δ 5.5 asignado a H-7 y finalmente un triplete en δ 4.22 (H-5). De igual manera se observa un sistema AB (δ 3.53 y δ 2.31) que correlaciona con un carbono en 49.9 ppm característico de un anillo de oxirano.

La localización de cinco de los acetatos es clara por los desplazamientos de las señales de C-2 (δ 75.2), C-7 (δ 68.75), C-9 (δ 75.21), C-10 (δ 70.75) y C-13 (δ 71.15). De las señales en la región de las bases oxigenadas quedan dos señales sin asignar: una de ellas es un carbono cuaternario que resuena en 76.0 ppm y por analogía con los compuestos anteriores se atribuye a C-1 y la otra es un carbono metínico en δ 77.77 que se asigna a C-5. En una de estas posiciones debe localizarse el acetato restante. El desplazamiento de las señales no es suficiente para realizar la asignación. Con el objeto de discernir entre las dos posibilidades se realizó la acetilación de esta sustancia y después del tratamiento usual no se observó cambio en la materia prima lo cual indica que el hidroxilo debe ser terciario y debe localizarse en C-1.

La localización del epóxido en C-4 justifica el desplazamiento a campo alto de la señal atribuida a H-5 (δ 4.22) por la orientación β del oxígeno epoxídico, lo que lleva a considerar que H-5 presenta la misma orientación.

Con el espectro de correlación H-H (COSY, espectro 20) se confirma la conectividad del esqueleto de taxano y se caracteriza a este compuesto como 1- β -hidroxibaccatina I (55). En las tablas 13 y 14 se muestran los datos obtenidos en el presente trabajo y los informados en la literatura para esta sustancia aislada anteriormente de otras especies de *Taxus*.^{99,100}



1- β -hidroxibaccatina I (55).

Tabla 13. Datos de RMN ^1H de 1 β -hidroxibaccatina I.

Hidrógeno	Experimental δ (J=Hz) (CDCl_3 , 300 MHz)		Referencia ¹⁰⁰ δ (J=Hz) (CDCl_3 , 300 MHz)	
2 β	5.50 d (3.0)		5.49 d (3.2)	
3 α	3.19 d (3.0)		3.18 d (3.2)	
5 β	4.22 t (3.0)		4.22 t (2.8)	
6 α	2.17 m		2.17 m	
6 β	1.77 ddd (15, 9.6, 2.4)		1.75 m	
7 α	5.50 dd (10.5, 4.5)		5.50 dd (11.6, 4.4)	
9 β	6.04 d (11.0)		6.04 d (11.0)	
10 α	6.21 d (11.0)		6.22 d (11.0)	
13 β	6.095 t (8.1)		6.09 t (8.4)	
14 α	1.88 ddd (15, 6.6)		1.88 dd (15.0, 6.8)	
14 β	2.54 dd (15.0, 9.6)		2.54 dd (15.0, 9.6)	
16	1.24 s		1.24 s	
17	1.65 s		1.65 s	
18	2.23 s		2.23 s	
19	1.25 s		1.25 s	
20 α	3.54 d (5.1)		3.55 d (5.6)	
20 β	2.31 d (5.1)		2.31 d (5.6)	
OCOCH ₃	1.99 s	2.05 s	2.22 s	2.12 s
	2.06 s	2.09 s	2.09 s	2.06 s
	2.11s	2.22 s	2.05 s	2.00 s

Tabla 14. Datos de RMN ^{13}C de 1 β hidroxibaccatina I.

Carbono	Experimental		Referencia ¹⁰⁰	
	(CDCl ₃ , 75 MHz)		(CDCl ₃ , 75 MHz)	
1		76.13		76.0
2		75.21		72.1
3		41.38		41.3
4		58.29		58.2
5		77.77		77.7
6		31.15		31.1
7		68.76		68.6
8		46.67		46.6
9		75.22		75.1
10		70.75		70.7
11		135.71		135.6
12		140.39		140.3
13		71.15		71.1
14		38.58		38.5
15		43.32		43.2
16		28.46		28.4
17		21.82		21.8
18		15.42		15.4
19		13.70		13.6
20		49.93		49.9
COCH ₃	21.67	21.42		--
	20.90	20.66		
C=O	170.08	169.84	170.1	169.8
	169.75	169.35	169.7	169.3
	169.23	169.23	169.2	169.1

2 β ,3 β ,14 α ,21 β ,22 β (*R*)-pentahidroxi-5 β -colest-7-en-6-ona
(ponasterona, 41).

El metabolito de mayor polaridad que se aisló de la fracción soluble en diclorometano del extracto etanólico de corteza de *T. globosa*, es un sólido que presenta señales a campo alto en el espectro de resonancia magnética de hidrógeno (espectro 21) que sugieren una estructura de esteroi. La presencia de 27 señales en el espectro de RMN¹³C (espectro 22) confirma esta suposición. Los resultados de los experimentos DEPT (espectro 23) establecen la presencia de seis carbonos cuaternarios, 8 metinos, 8 metilenos y 5 metilos. Uno de los carbonos cuaternarios localizado en 206 ppm debe corresponder a un carbonilo de cetona α,β insaturada. En 122.13 ppm se observa la señal de un carbono vinílico cuya señal de hidrógeno aparece en δ 5.79. De acuerdo con el análisis anterior, la molécula debe contener un fragmento como el mostrado en la figura 31.

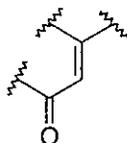


figura 31.

Otro fragmento que esta de acuerdo con la cadena lateral de un esteroi se deduce de las dos señales dobles identificables en δ 0.90 y δ 0.91 en el espectro de RMN¹H (espectro 21) que integran cada una para tres hidrógenos y correlacionan con la señal del metino que resuena en 1.90 ppm que a su vez está unido a un metileno (figura 32).

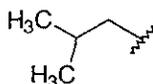
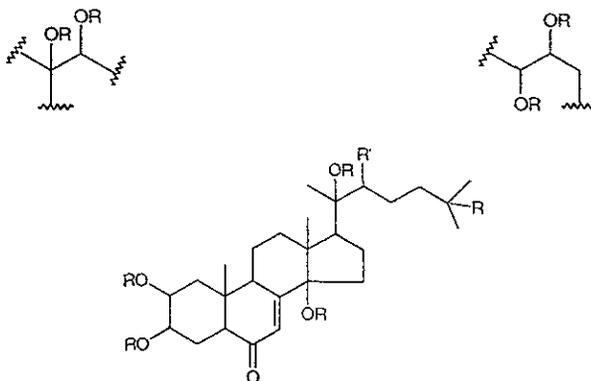


Figura 32.

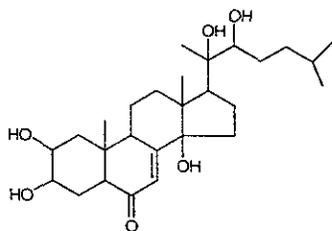
En la región de las bases oxigenadas en el espectro de RMN¹³C se observan 5 señales a δ 85.22, δ 77.97, δ 77.84, δ 68.71 y δ 68.52 que corresponden a 2 carbonos cuaternarios y tres metinos, estos a su vez correlacionan respectivamente con las señales a δ 3.93, δ 3.83 y δ 3.14 en el experimento de correlación heteronuclear a un enlace (HETCOR, espectro 24). Los resultados anteriores sugieren la presencia de los arreglos atómicos siguientes (figura 33) que junto con los mostrados anteriormente conducen a un esqueleto de ecdisteroide.



estructura de ecdisteroide.

Figura 33.

Las señales de metilo sobre carbono totalmente sustituido aparecen a δ 0.88 (C-18), δ 0.95 (C-19) y δ 1.19 (C-21), el desplazamiento de este último se atribuye a la presencia de oxígeno en la posición 20. Todos los datos anteriores están de acuerdo con la estructura de ponasterona (41), un ecdisteroide aislado anteriormente del mismo género (*T. baccata*)⁹⁶.



ponasterona (41)

Es conocida la fusión *cis* de los anillos A y B de este tipo de sustancias. No obstante se realizó un análisis de las constantes de acoplamiento de las señales involucradas para establecer la configuración relativa de los centros estereogénicos.

Las señales de H-2 (δ 3.84) y H-3 (δ 3.94) presentan una constante de acoplamiento de 3.0 Hz que sugiere una disposición axial-ecuatorial, las constantes de acoplamiento de 6.0 y 12.0 Hz de H-2 con H-1 se deben al acoplamiento axial-axial y axial-ecuatorial respectivamente. H-3 no presenta acoplamiento apreciable con H-4 quien a su vez exhibe un acoplamiento geminal con $J=13.5$ Hz y una interacción *trans* diaxial y axial-ecuatorial con H-5 (δ 2.37). Este sistema de acoplamiento confirma la fusión *cis* de los anillos A y B y establece la orientación de los dos grupos hidroxílicos en β (figura 34).

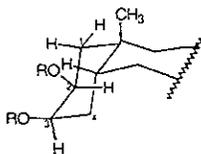
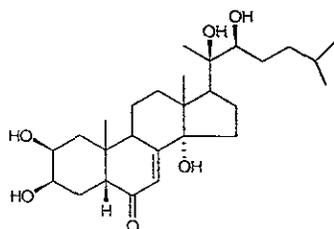


Figura 34.

La presencia del hidroxilo en la posición 22 se confirma al realizar la acetilación de este compuesto y observar tres señales simples agudas en la región de 2.00 ppm (espectro 25) y el desplazamiento correspondiente de las señales atribuidas a H-2 (δ 3.84 a δ 5.07), H-3 (δ 3.94 a δ 5.36) y H-22 (δ 3.30 a δ 4.84). El hidroxilo en 14 así como el de la posición 20 se deduce de la presencia de dos carbonos cuaternarios en δ 77.9 y δ 85.2. La asignación de las señales restantes se efectuó con la ayuda del experimento HETCOR, los datos para esta sustancia se muestran en la tabla 15.



ponasterona (41).

Tabla 15. Datos espectroscópicos de ponasterona (41).

Asignación	Hidrógeno	Carbono
1	1.44 dd (11.7, 13.0) 1.21 dd (11.5, 13.0)	37.37 t
2	3.82 ddd (3.0, 6.0, 12.0)	68.71 d
3	3.93 d (3.0)	68.52 d
4	2.11 ddd (4.5, 13.0, 13.5) 1.85 dd (4.5, 13.5)	32.85 t
5	2.37 dd (6.0, 13.0)	51.79 d
6	-	206.43 s
7	5.79 d (2.4)	122.13 d
8	-	167.96 s
9	3.14 ddd (3.0, 8.2, 11.5)	35.12 d
10	-	39.25 s
11	1.97 m	21.50 t
14	-	85.22 s
15	1.81 m 1.68 m	31.77 d
16	1.96 m	21.50 t
17	1.70 m	50.47 d
18	0.88 s	18.02 q
19	0.95 s	24.39 q
20	-	77.97 s
21	1.19 s	20.98 q
22	3.33 d (10.5)	77.84 d
23	1.53 m 1.22 m	30.48 t
24	1.78 m 1.43 m	37.65 t
25	1.90 m	29.22 d
26	0.91 d (6.8)	23.41 q
27	0.90 d (6.8)	22.73 q

7, 4'-di-O-metil amentoflavona
(gingketina, 49).

Del extracto diclorometánico de las hojas se aisló un compuesto sólido de color amarillo de punto de fusión mayor a 300 °C que en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (espectro 26) mostró cuatro hidrógenos hidroxílicos: en 13.07 y 12.90 ppm dos protones que deben estar formando puentes de hidrógeno y dos hidrógenos en 10.8 y 10.2 ppm. En la región de 6 a 8 ppm se observan tres sistemas aromáticos, uno de ellos es un sistema AB con constantes de acoplamiento (2.5 Hz) *meta* (δ 6.78, δ 6.36) (figura 35), el desplazamiento de estas señales indica que los sustituyentes de este anillo son grupos OR, lo que concuerda con la presencia de los grupos hidroxilo y grupos metoxilo (δ 3.82 y δ 3.78) en la molécula.

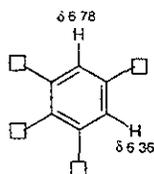


Figura 35. Sistema AB

Un sistema ABX (δ 8.22, 7.36 y 8.10 ppm) con constantes de acoplamiento *orto* (10.0 Hz) y *meta* (2.5 Hz) indica la presencia de un anillo aromático con sustitución 1,2,4 y un sistema A_2B_2 aromático con constantes de acoplamiento de 9.0 Hz en δ 7.48 y δ 6.73 permiten establecer la presencia de dos anillos aromáticos que se muestran en la figura 36. El desplazamiento de dos hidrógenos del sistema ABX sugiere que uno de los sustituyentes es oxígeno

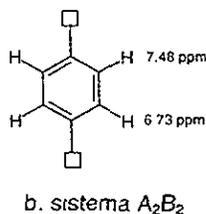
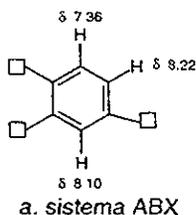
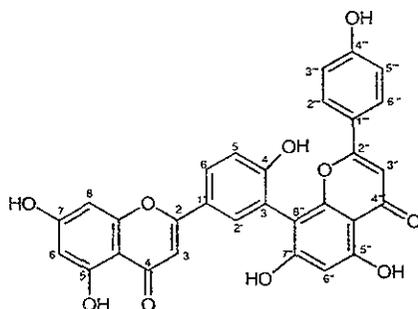


Figura 36. Sistemas aromáticos observados en RMN¹H.

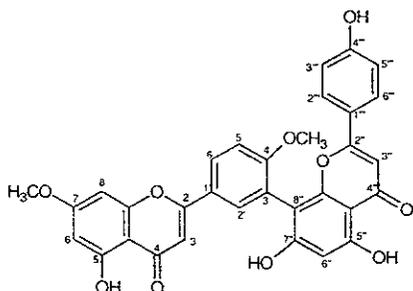
Además aparecen tres singuletes en 7.00, 6.79 y 6.40 que integran cada uno para un hidrógeno. Estos hidrógenos corresponden a protones sobre carbono de tipo sp^2 . En el espectro de $RMN^{13}C$ (espectro 27) se observa la existencia de al menos 28 carbonos en la molécula de los cuales 12 aparecen como dobletes y dos como cuartetos en el espectro DEPT (espectro 28), los carbonos restantes deben ser cuaternarios. Las señales de carbono así como la sustitución de los anillos aromáticos concuerdan con un sistema biflavonoide del tipo de la amentoflavona (**48**).



amentoflavona (**48**)

El metabolito aislado de *Taxus globosa* difiere de la amentoflavona por la presencia de dos grupos metoxilo.

Con base en la biogénesis de esta clase de compuestos, los metoxilos pueden ser localizados en las posiciones 7, 4', 7'' o 4''''. Al realizar la comparación de los datos obtenidos para este compuesto y los correspondientes de la amentoflavona se puede decir que los grupos metoxilo se localizan en las posiciones 7, 4'. Aunque resulta necesario la realización de un experimento de correlación C-H a larga distancia para confirmar el enlace interflavonoide y la posición de los metoxilos, en el presente trabajo debido a la cantidad disponible de muestra no fué posible llevarlo a cabo. No obstante los datos obtenidos (tablas 16 y 17) están de acuerdo con la 7,4'-di-O-metil amentoflavona (gingketina, **49**) aislada anteriormente de varios géneros como el *Gingko*¹⁰² y como constituyente de *Taxus baccata* y *T. wallichiana*¹⁰³.



7, 4'-di O-metilmentoflavona (gingketina, 49)

Tabla 16. Datos de RMN¹H de gingketina (49).

Hidrógeno	Experimental (DMSO-d ₆ , 300 MHz)	Referencia ¹⁰³ (DMSO-d ₆ , 300 MHz)
3	6.79 (s)	6.80 (s)
6	6.80 (d, 2.5)	6.78 (d, 2.5)
8	6.36 (d, 2.5)	6.36 (d, 2.5)
2'	8.08 (d, 2.4)	8.10 (d, 2.5)
5'	7.36 (d, 9.0)	7.36 (d, 10.0)
6'	8.22 (dd, 2.4, 9.0)	8.21 (dd, 2.5, 10.0)
6''	6.40 (s)	6.42 (s)
3''	7.00 (s)	6.99 (s)
2''', 6'''	6.71 (d, 9.0)	6.73 (d, 10.0)
3''', 5'''	7.48 (d, 9.0)	7.50 (d, 10.0)
OCH ₃	3.82 (s)	3.83 (s)
OCH ₃	3.78 (s)	3.80 (s)
OH	13.07 (s)	13.10 (s)
OH	12.90 (s)	12.91 (s)
OH	10.81 (s)	10.83 (s)
OH	10.25 (s)	10.29 (s)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 17. Datos de RMN¹³C de ginkgetina (49).

Carbono	Experimental (DMSO-d ₆ , 75 MHz)	Referencia ¹⁰³ (DMSO-d ₆ , 75 MHz)
2, 2''	163.6	163.5
3	102.5	103.5
4, 4''	181.9	181.9
5, 5''	160.5	160.4
6	98.1	98.5
7	161.7	161.7
3''	103.8	103.8
4''a	103.7	103.5
3'	122.2	122.4
2', 6'''	127.9	128.0
3''', 5'''	115.7	115.8
4', 4'''	161.0	161.0

3 α ,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavano

(epi-catequina, 56).

Del extracto butanólico de la corteza de *Taxus globosa* (población 1) se aisló un compuesto de color ligeramente rojizo en cuyo espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (espectro 30) se observa un sistema AB aromático en δ 5.92 y δ 5.90 (J=2.0 Hz) que correlaciona con las señales localizadas en 96.5 y 95.9 ppm en el espectro de RMN¹³C (espectro 31). Las constantes de acoplamiento de 2.0 Hz sugieren una disposición *meta* de estos hidrógenos. El fragmento derivado de este análisis se muestra en la figura 37.

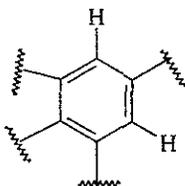


Figura 37.

Otro sistema aromático ABC ubicado en δ 6.95, δ 6.78 y δ 6.74 indica la presencia de un anillo trisustituido como el mostrado en la figura 38, por el desplazamiento químico de las señales se sugiere la presencia de dos grupos electronegativos. Además en el espectro en el infrarojo se observa una banda de absorción ancha en 3500 cm^{-1} confirmando la presencia de hidroxilos en la molécula.

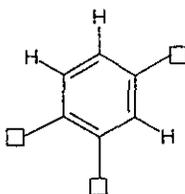


Figura 38.

Otra señal observable en el espectro 30 es una señal en δ 4.16 que indica la presencia de un hidrógeno geminal a oxígeno lo cual concuerda con la señal de carbono trece en 65 ppm y finalmente en la región de 2.6 y 2.8 ppm se localizan dos señales dobles de dobles que integran para un hidrógeno cada una y que corresponden a un metileno con hidrógenos no equivalentes. Los fragmentos estructurales de estas señales llevan a la conclusión de un esqueleto de flavan-3-ol (figura 39), por el desplazamiento y constantes de acoplamiento se deduce la estructura de catequina uno de los monómeros que constituyen los taninos.

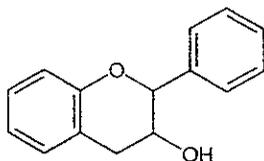


Figura 39. esqueleto de flavan-3-ol.

La señal asignada a H-2 (δ 4.80) se observa como un singulete lo que sugiere un ángulo diedro de 90° con H-3, por otro lado H-3 (δ 4.16) presenta un acoplamiento con los hidrógenos metilénicos de H-4 con constantes de 3.0 y 4.5 Hz lo que supone una disposición como se muestra en la figura 40.

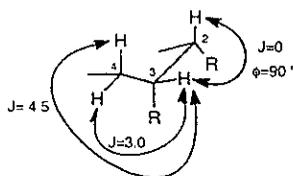


Figura 40.

Aquí es importante notar que la asignación de la estereoquímica relativa es ambigua si se consideran solamente las constantes de acoplamiento H-H ya que se ha observado que estas moléculas en solución presentan equilibrios conformacionales como los mostrados en la figura 41.¹⁰⁴ Además hay que aclarar que en condiciones ligeramente ácidas y de temperatura alta hay epimerización en C-3.

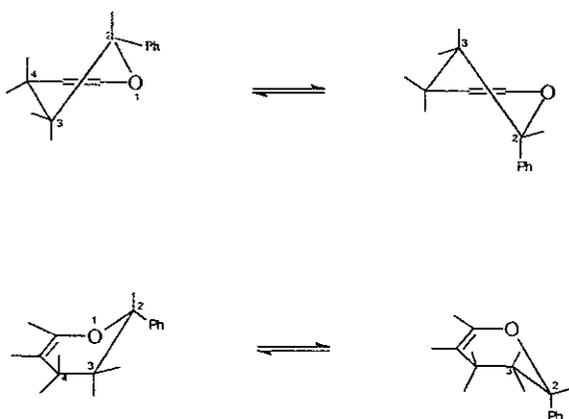
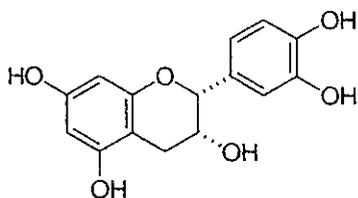


Figura 41. Confórmeros de flavan-3-ol.

Los dos grupos sustituyentes en las posiciones 2 y 3 están en el mismo lado en disposición α , ya que el enantiómero no se conoce y se establece la estructura de *epi*-catequina (**56**) para esta sustancia.



epi-catequina (**56**).

2-β-D-glucopiranosil, 4-(4'-hidroxifenil)-butano (betulósido, 57).

El componente mayoritario del extracto butanólico de la corteza es un compuesto sólido en forma de agujas finas que tiene punto de fusión de 187 °C. El espectro en el infrarojo de esta sustancia (espectro 33) presenta en 3350 y 3252 cm^{-1} bandas características de grupos hidroxilo. Otras bandas de importancia son las localizadas en 1616 y 1516 cm^{-1} que indican la presencia de anillo aromático. El peso molecular determinado por EMIE (espectro 34) está de acuerdo con una fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_7$ ya que se observa un ión molecular de m/z 328, la pérdida sucesiva de 18 unidades de masa está de acuerdo con la presencia de grupos hidroxílicos en la molécula y un fragmento en m/z 148 ($\text{M}^+ - 180$) lleva a pensar en la presencia de una hexosa que podría ser glucosa. El pico base de este espectro (m/z 107) es típico del ión benciloxonio ($\text{C}_7\text{H}_7\text{O}^+$) que junto con los fragmentos de m/z 77 y 53 confirma la presencia de un anillo aromático con una función oxigenada como sustituyente.

En el espectro de RMN^1H (espectro 35) se observa una señal doble en 4.53 ppm con constante de acoplamiento de 8.1 Hz que corresponde al hidrógeno anomérico además de un conjunto de señales sobrepuestas entre 3.1 y 3.9 ppm que integran para 8 protones. Otras señales identificables a campo bajo son las de un sistema aromático AA'BB' en δ 7.02 y δ 6.66 que indican la presencia de un anillo aromático *para* disustituido. A campo alto (δ 2.60, δ 1.84, δ 1.67) resuenan los hidrógenos de dos metilenos. Finalmente en este espectro a δ 1.18 aparece una señal doble que integra para tres hidrógenos y presenta una constante de 7.0 Hz, esta señal se atribuye a un metilo unido a un metino que soporta una función oxigenada. Los fragmentos derivados del análisis de los espectros 33-35 son los mostrados en la figura 42.

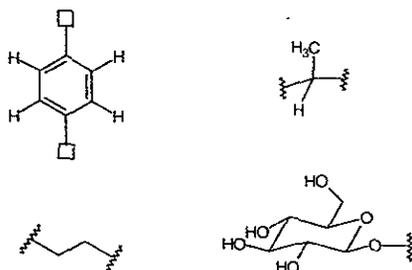


Figura 42. Fragmentos estructurales.

Con los datos aportados por el experimento DEPT (espectro 37) se confirma la fórmula de $C_{16}H_{24}O_7$ con la presencia de tres metilenos, 10 metinos, un metilo y dos carbonos cuaternarios en 134.6 y 156 ppm que se asignan a los carbonos *ipso* del anillo aromático. El desplazamiento de uno de estos carbonos (δ 156) supone el enlace C-O por lo que uno de los sustituyentes en el anillo puede ser o un grupo hidroxilo o bien el residuo de glucopiranososa. Por otro lado en el espectro de correlación H-H (COSY, espectro 41) se aprecia la correlación del metino en δ 3.87 con la señal en δ 3.63 y el metilo doblete a δ 1.18, la señal en δ 3.63 es un hidrógeno que correlaciona con el conjunto de señales múltiples del anillo de piranososa. Estas correlaciones se ilustran en la figura 43.

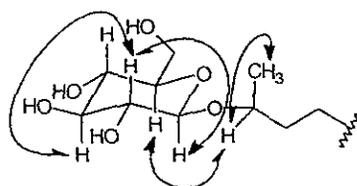


Figura 43. correlaciones observadas en el espectro COSY.

De la observación anterior y los fragmentos mostrados en la figura 42 sólo es posible la unión del anillo aromático a un metileno y este debe ser el localizado en 2.60 ya que las corrientes magnéticas generadas por el sistema π ocasionan este desplazamiento.

Con el objeto de asignar sin ambigüedad cada señal se realizó la acetilación de este compuesto, el derivado acetilado presenta las señales características del anillo aromático *para* sustituido, el hidrógeno anomérico (H-1'') en 4.53 con $J=8.1$ y las señales debidas a los hidrógenos de la piranosa en 5.21(dd, 9.3, 9.6, H-3''), 5.10 (dd, 9.0, 9.9, H-4''), 4.99 (dd, 8.1, 9.3, H-2''), 4.25 (dd, 4.5, 12.0, H-6''a), 4.14 (dd, 2.4, 12.0, H-6''b) y 3.66 (ddd, 2.4, 4.5, 9.0, H-5''), además de cinco acetatos en 2.00-2.30 (espectro 38, RMN^1H). Las correlaciones de este fragmento estructural se observan en el espectro 41 (COSY) y son mostradas en la figura 44.

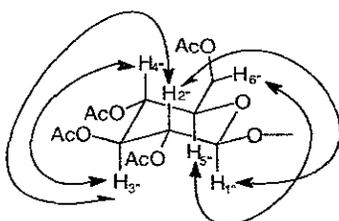
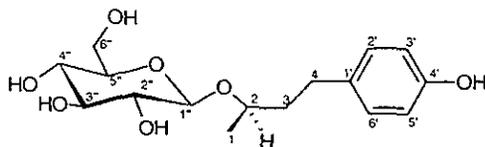


Figura 44.

Además en el espectro de resonancia de hidrógeno y el experimento DEPT (espectro 40) del derivado acetilado se identifican nuevamente los sistemas A_3X del metilo unido a metino en 1.15 (H-1) y 3.77 (H-2) ppm, los dos metilenos del fragmento derivado del butano en 1.69 (H-3a), 1.84 (H-3b) y 2.60 (H-4) ppm.

La constante de acoplamiento de 8.1 Hz entre H-1'' y H-2'' es característica de un acoplamiento axial-axial con un ángulo diedro de 168° como el observado en la β -D-glucopiranososa. En consecuencia se deduce que esta sustancia es un glucósido derivado del *p*-hidroxifenil-butano conocido comunmente como betulósido o rhododendrina (57).

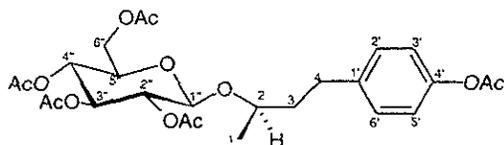


2- β -D-glucopiranosil, 4-(4'-hidroxifenil)-butano (betulósido, 57)

Esta sustancia ha sido aislada de especies pertenecientes a los géneros *Betula* y *Rhododendrum*¹⁰⁵ y la configuración de C-2 se ha determinado como *S*. También es constituyente de las hojas de *T. baccata* como lo demuestra el estudio de Parmar¹⁰⁶ en el que se determinó la estructura mediante rayos X. Los datos obtenidos experimentalmente se muestran en la tabla 19 y coinciden con los informados en la literatura.¹⁰⁶

Tabla 19. Datos de RMN¹H de betulósido (57) y derivado acetilado (57a)

Hidrógeno	57	57a
	(300 MHz, MeOH-d ₄)	(300 MHz, CDCl ₃)
1	1.18, d, 7.0	1.15 d 7.0
2	3.80	3.77 m
3	1.84 m	1.84 m
4	1.67 m	1.69 m
4	2.60 dd	2.67 m
2', 6'	6.66 d, 9.0	6.95 d 8.4
3', 5'	7.02 d, 9.0	7.19 d 8.4
1''	4.32 d, 8.1	4.53 d 8.1
2''	3.18 dd, 8.0, 8.0	4.98 dd 8.1, 9.3
3''	3.68 m	5.21 dd 9.3, 9.8
4''	3.28 m	5.10 dd 9.0, 9.3
5''	3.36 m	3.66 ddd 2.4, 4.8, 9.0
6''	3.24 m	4.24 dd 4.5, 12.0
		4.14 dd 2.4, 12.0



Derivado pentaacetilado de betulósido (57a).

Se aislaron y caracterizaron de *Taxus globosa* los siguientes metabolitos: ácidos grasos esteárico, oleico y palmitoleico; esteroides: β -sitosterol, el correspondiente glucósido y ponasterona (41); taxanos: yunnanxano (53), 1-deshidroxibaccatina III (54), 1 β -hidroxibaccatina I (55), 10-desacetilbaccatina III (7); el biflavonoide ginkgetina (49), y los compuestos fenólicos *epi*-catequina (56) y betulósido (57). La abundancia de cada metabolito se muestra en los diagramas respectivos de la sección experimental y como se puede apreciar la ponasterona, el betulósido y la 10-desacetilbaccatina son los más abundantes. Con esto se logra el objetivo de establecer un perfil químico del tipo de sustancias presentes en esta especie. Desafortunadamente el taxol no fué detectado como constituyente de esta planta. Sin embargo la presencia de la 10-desacetilbaccatina en un rendimiento de 0.12 % comparable al informado para otras especies hace posible pensar en el "tejo" mexicano como fuente alternativa de obtención de taxol.

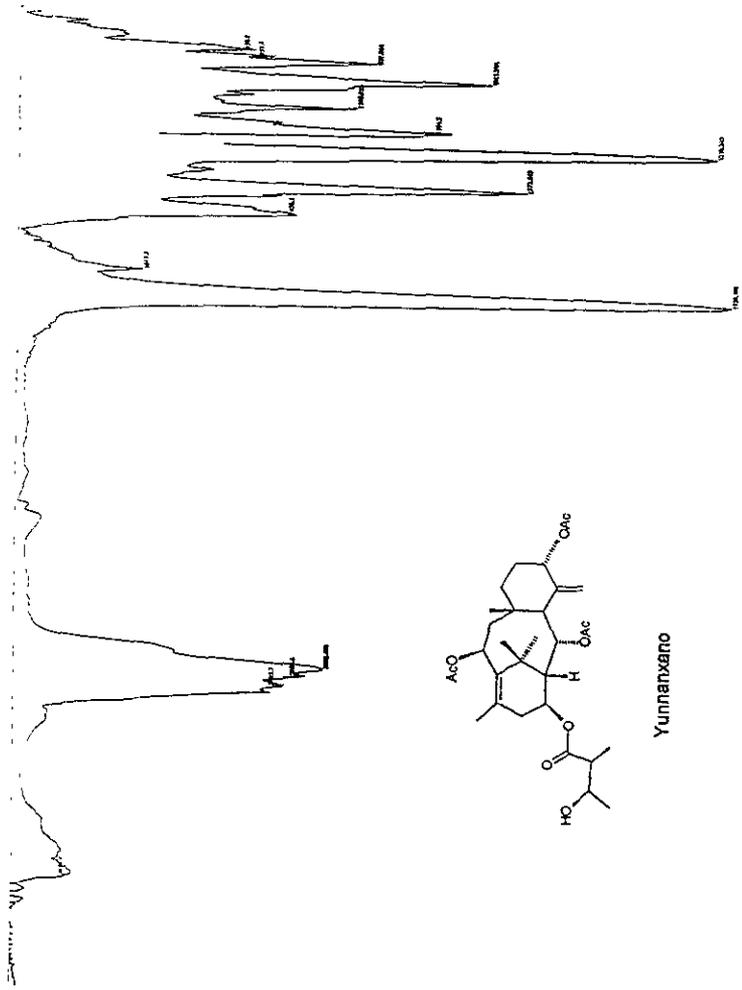
Por otra parte los metabolitos aislados presentan una gama de actividades biológicas interesantes, por ejemplo el betulósido presenta actividad como hepatoprotector¹⁰⁶. También se ha mencionado el efecto sobre el sistema nervioso central de los biflavonoides¹⁰⁷. Y la ponasterona es una de las hormonas producidas por insectos en la etapa de muda. Algunas de estas actividades biológicas justifican en parte las propiedades atribuidas a especies de *Taxus* por algunas etnias.

Es importante mencionar que los taxanos son metabolitos de los "tejos" cuya abundancia es muy pequeña de manera que su aislamiento y caracterización puede resultar difícil a pesar de las técnicas actuales de aislamiento y caracterización disponibles.

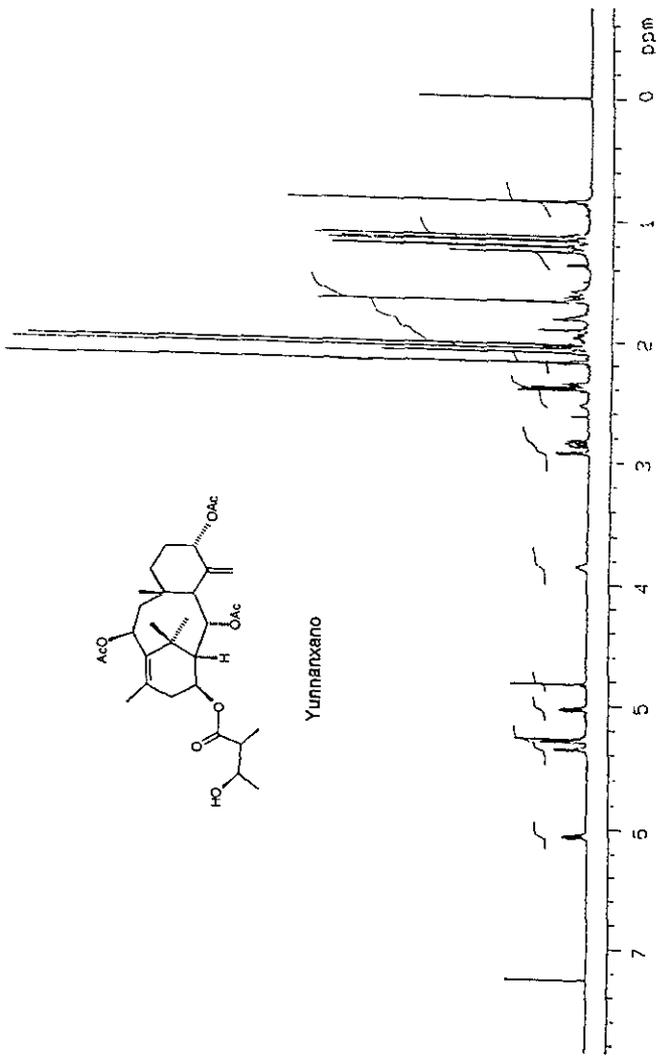
Resulta conveniente la continuación del estudio de esta especie y la realización de pruebas biológicas de algunos de los metabolitos aislados sobre todo de los taxanos, ya que recientemente se encontró que algunos de estos compuestos actúan de manera sinérgica con piretroides.¹⁰⁸

Sobre la composición química de las poblaciones analizadas se puede mencionar que existen diferencias notables sobre todo en la fracción diclorometánica. Mientras que la fracción butanólica de las diferentes partes de ambas poblaciones presentan como constituyentes principales al betulósido y *epi*-catequina.

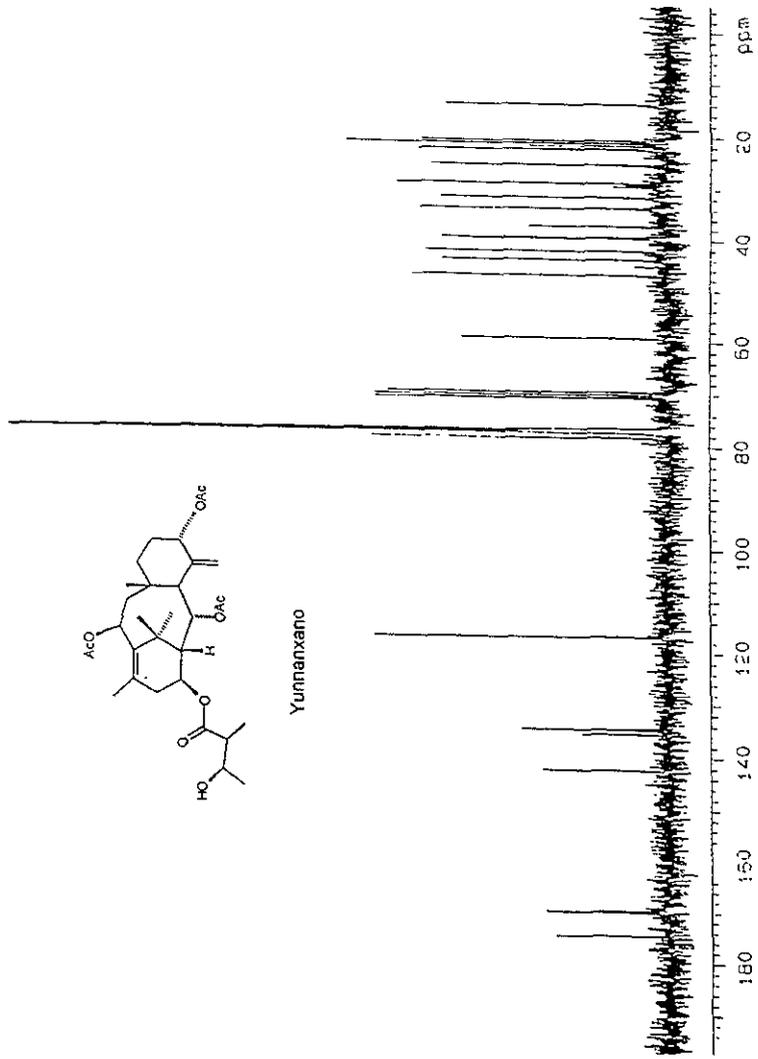
Con los resultados de este trabajo se puede hacer la observación de que un clima tropical favorece la producción de taxanos, aunque dada la abundancia de este tipo de metabolitos resulta necesario continuar el estudio de esta especie.



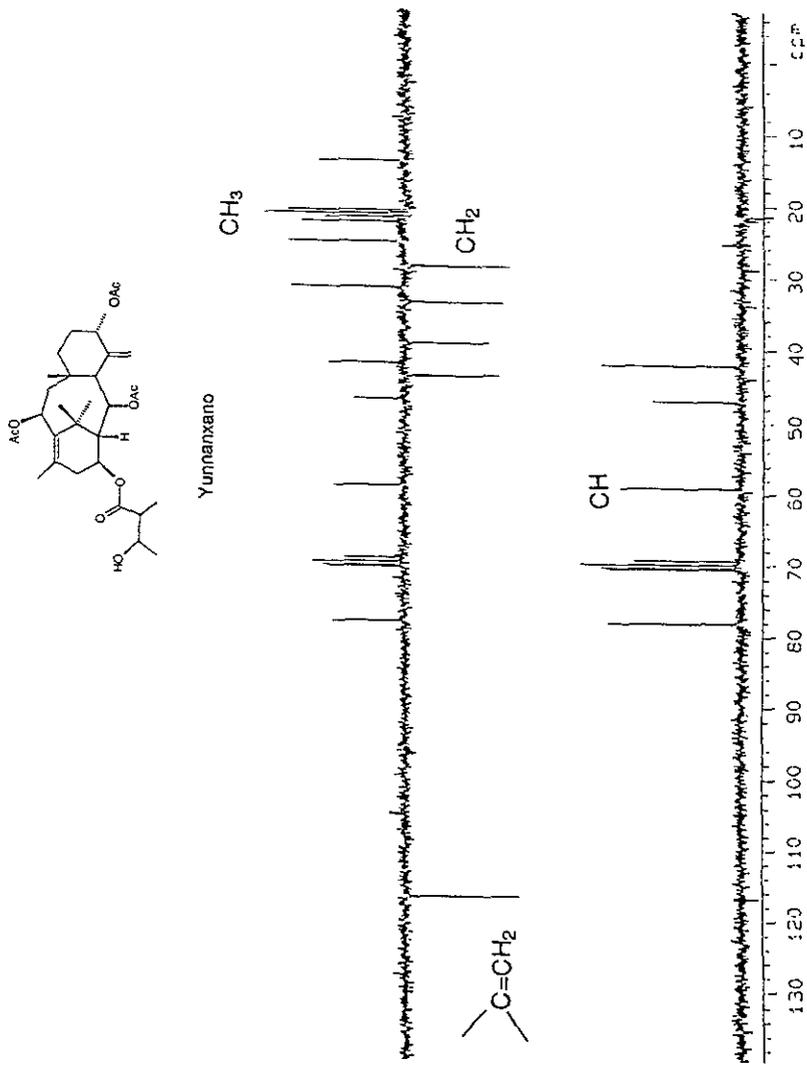
Espectro 1. IR (CHCl₃) de Yunnanxano (53).



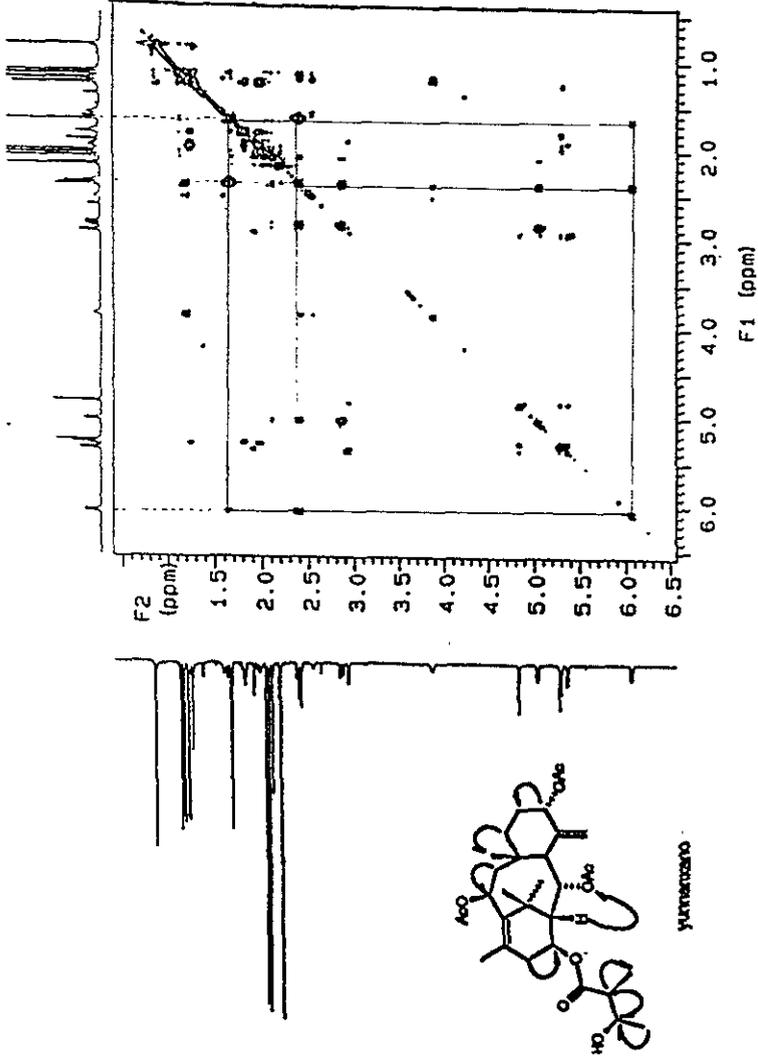
Espectro 2. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de Yunnanxano (53).



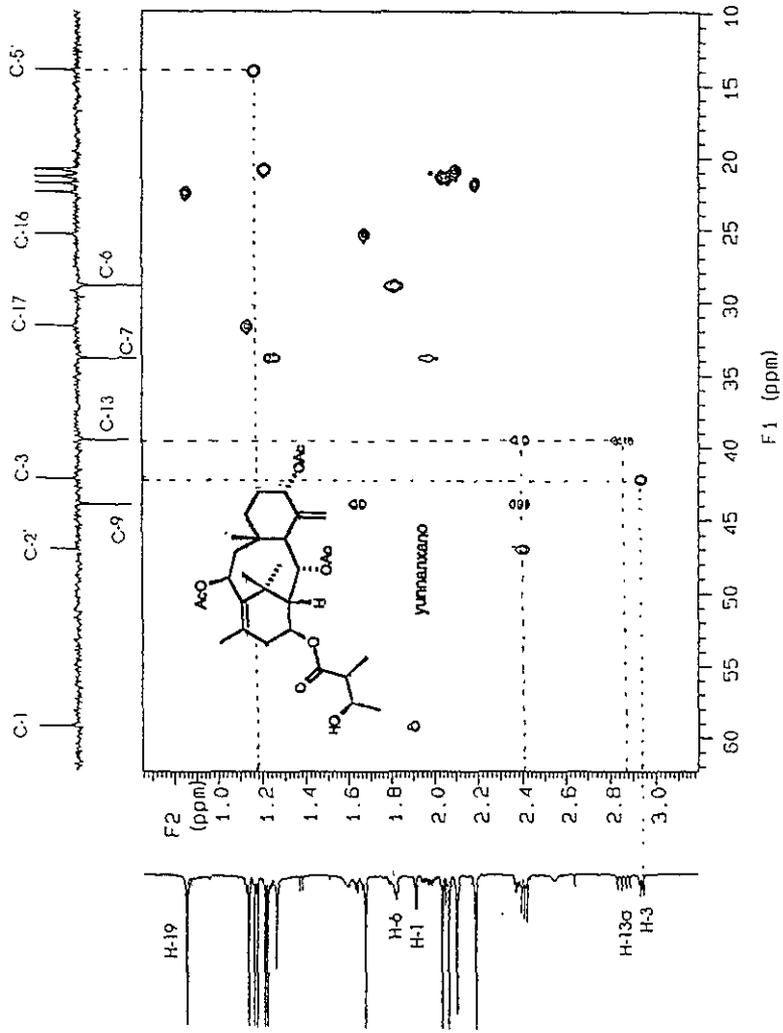
Espectro 3. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de Yunnanxano (53).



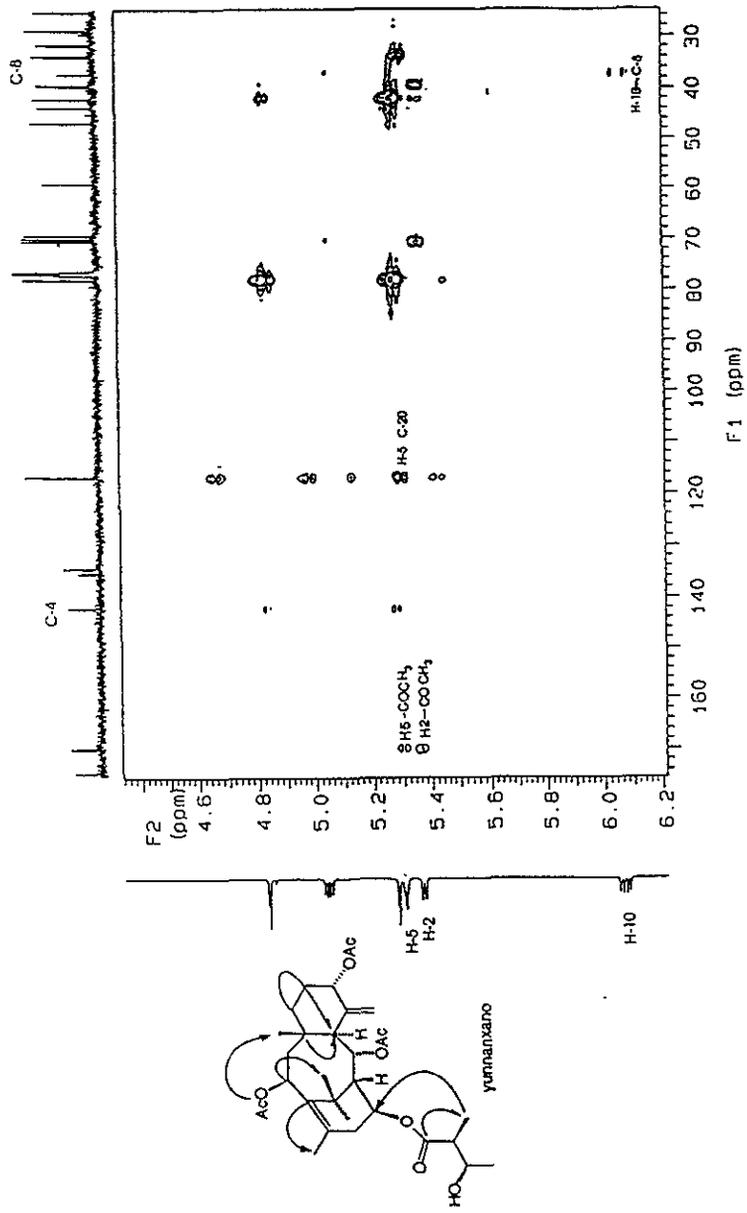
Espectro 4. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) DEPT de Yunnanxano (53).



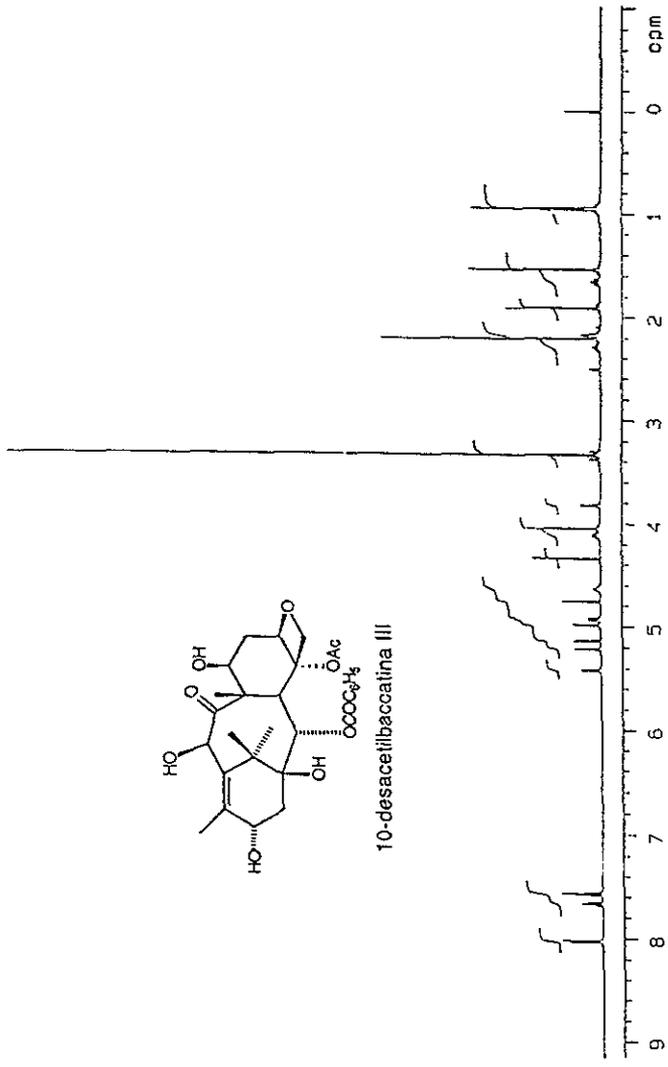
Espectro 5. COSY H - H (CDCl₃, 500 MHz) de Yunnanxano (53).



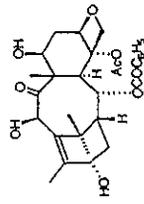
Espectro 6. HMQC (CDCl₃, 500 MHz) de Yunnanxano (53).



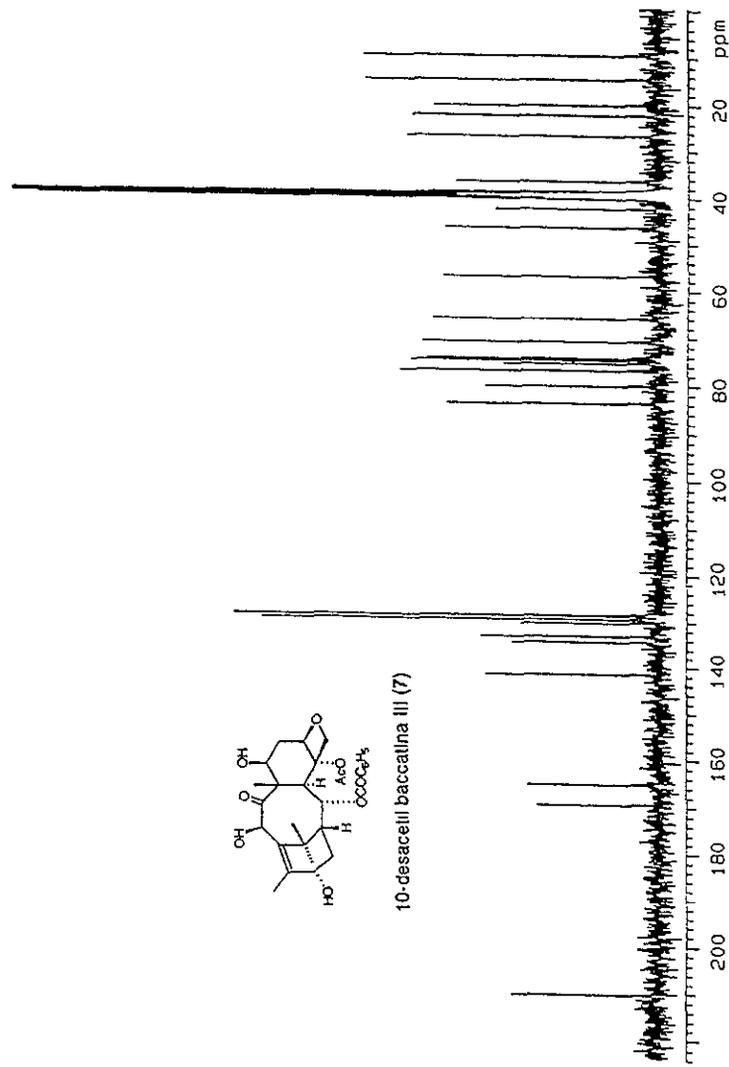
Espectro 7. HMBC (CDCl₃, 500 MHz) de Yunnanxano (53)



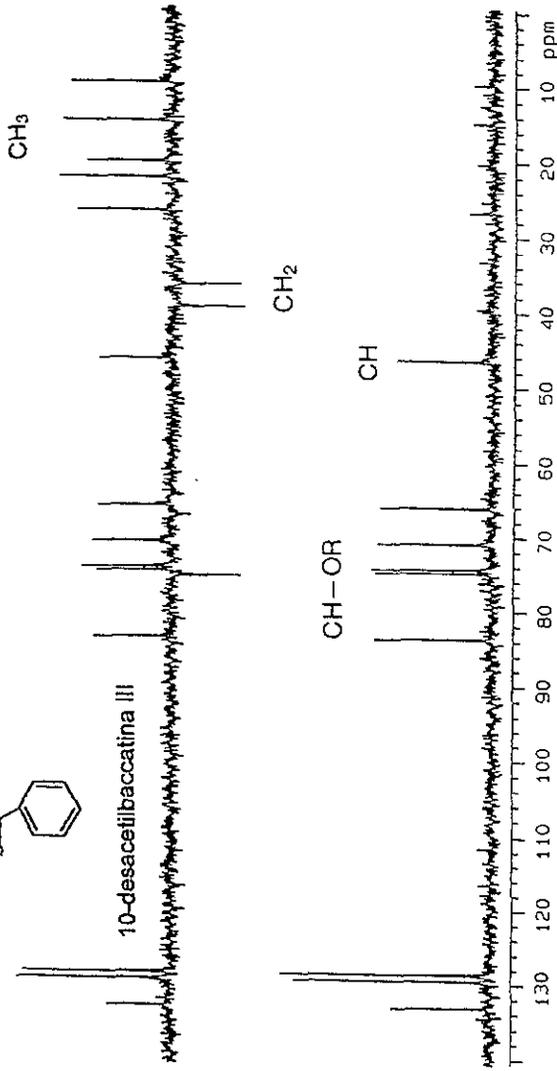
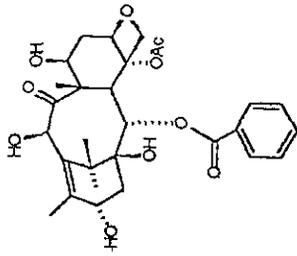
Espectro 8. RMN^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) de 10-desacetilbaccatina III (7).



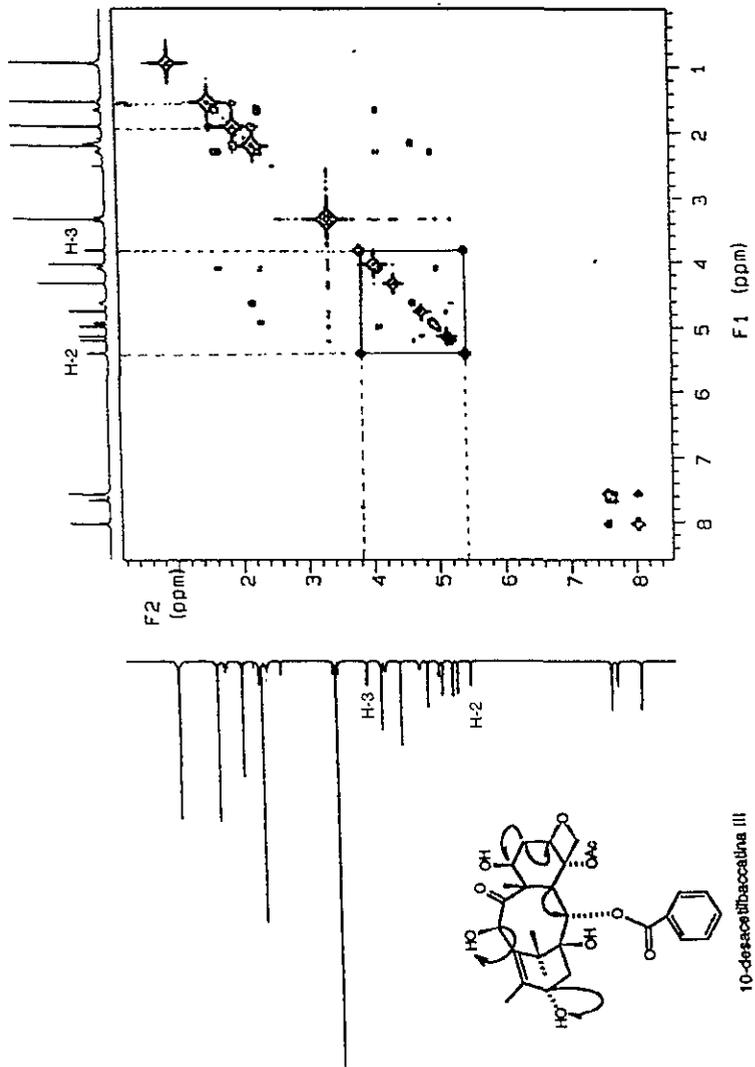
10-desacetyl baccatina III (7)



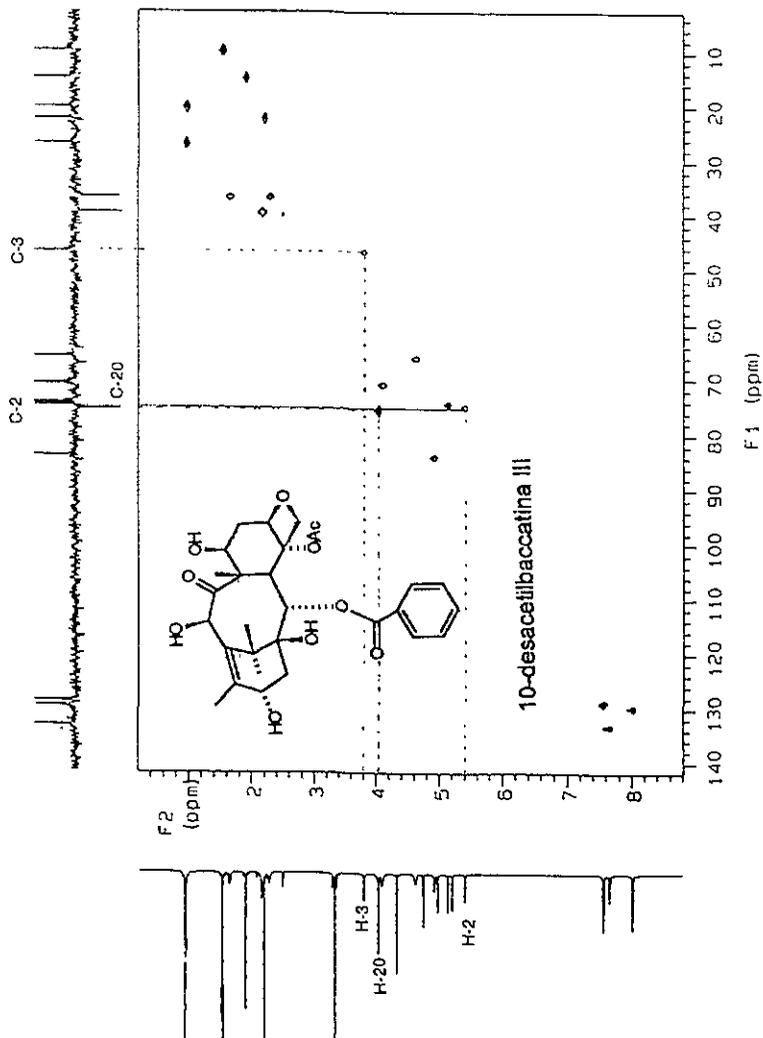
Espectro 9. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de 10-desacetilbaccatina III (7).



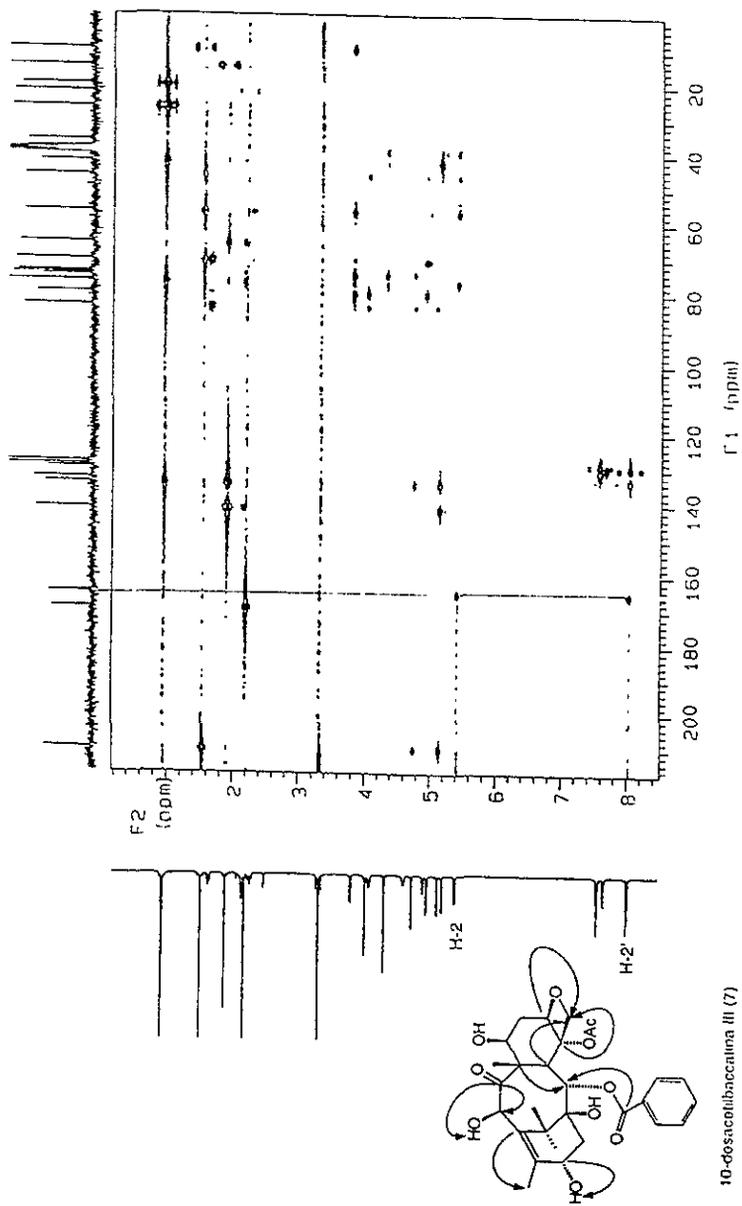
Espectro 10. DEPT (DMSO-*d*₆, 125 MHz) de 10-desacetilbaccatina III (7).



Espectro 11. COSY H - H (DMSO-*d*₆, 500 MHz) de 10-desacetilbaccatina III (7).

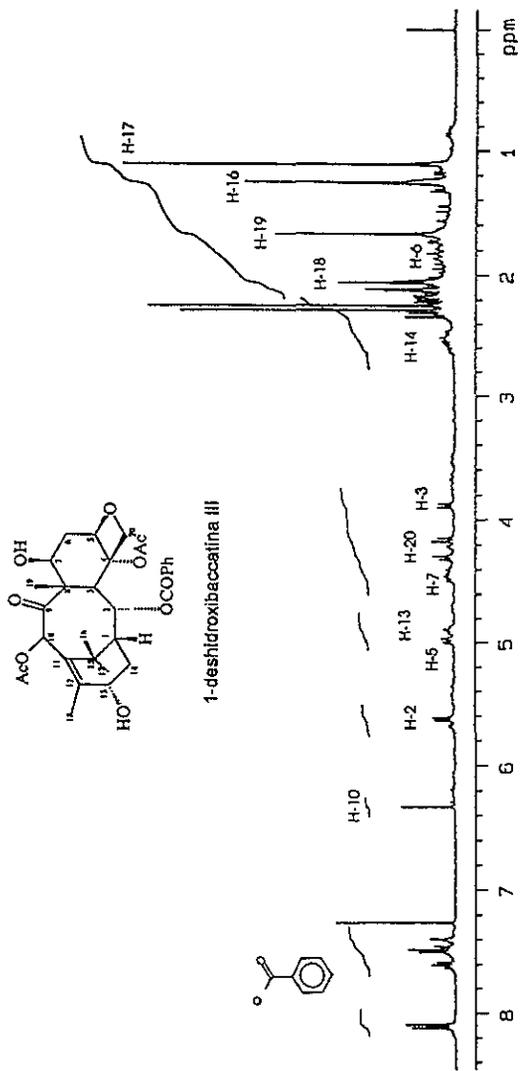


Espectro 12. HMQC (DMSO- *d*₆, 500 MHz) 10-desacetilbaccatina III (7).

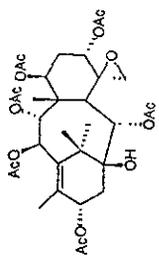
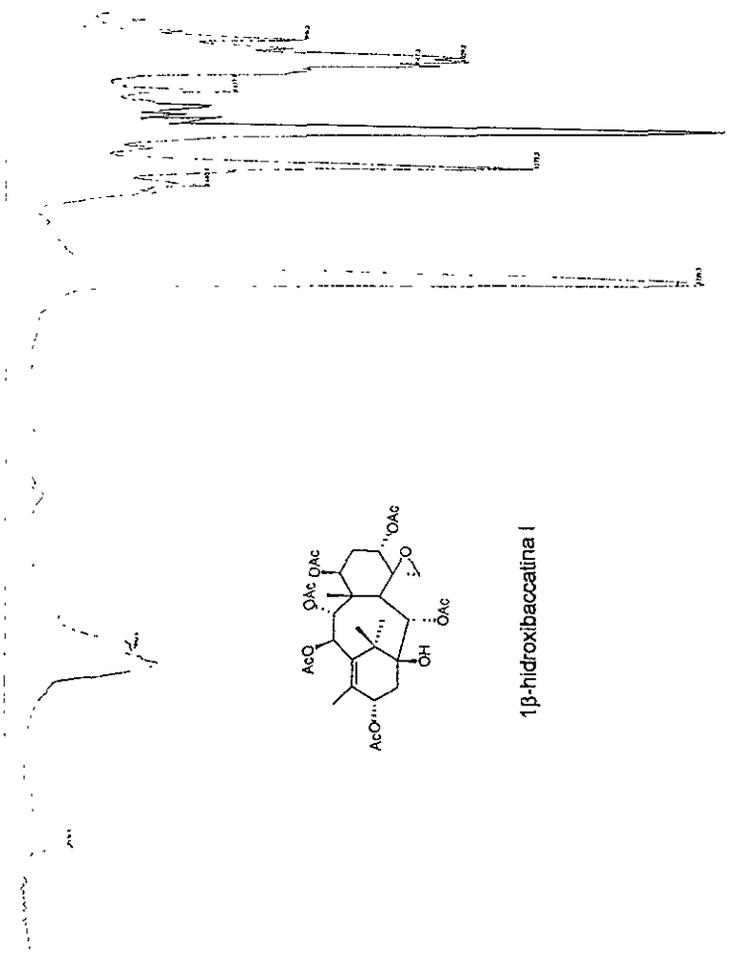


10-desacetylbaicalina III (7)

Espectro 13. HMBIC (DMSO- d_6 , 500 MHz) 10-desacetylbaicalina III (7).

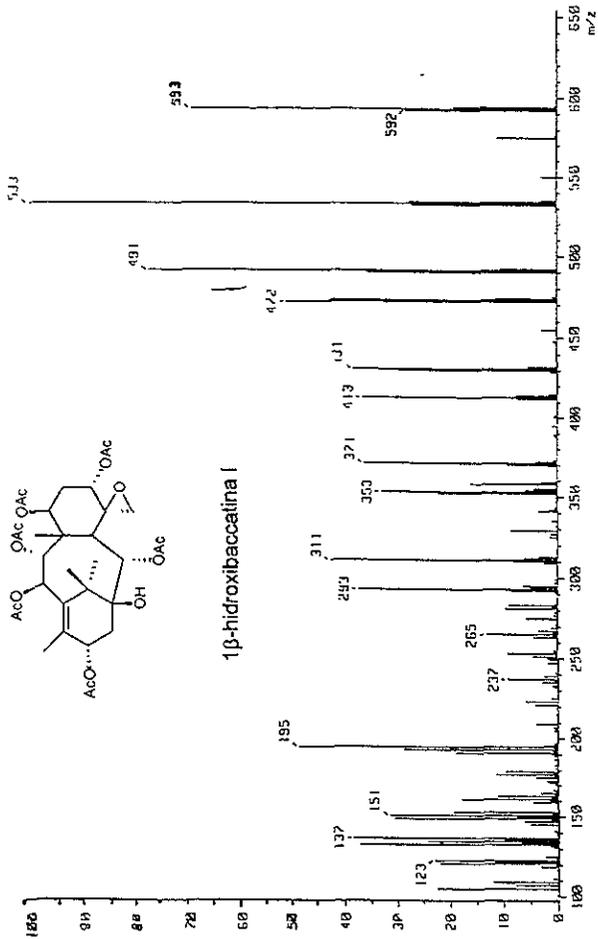


Espectro 14. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 1-deshidroxibaccatina III.

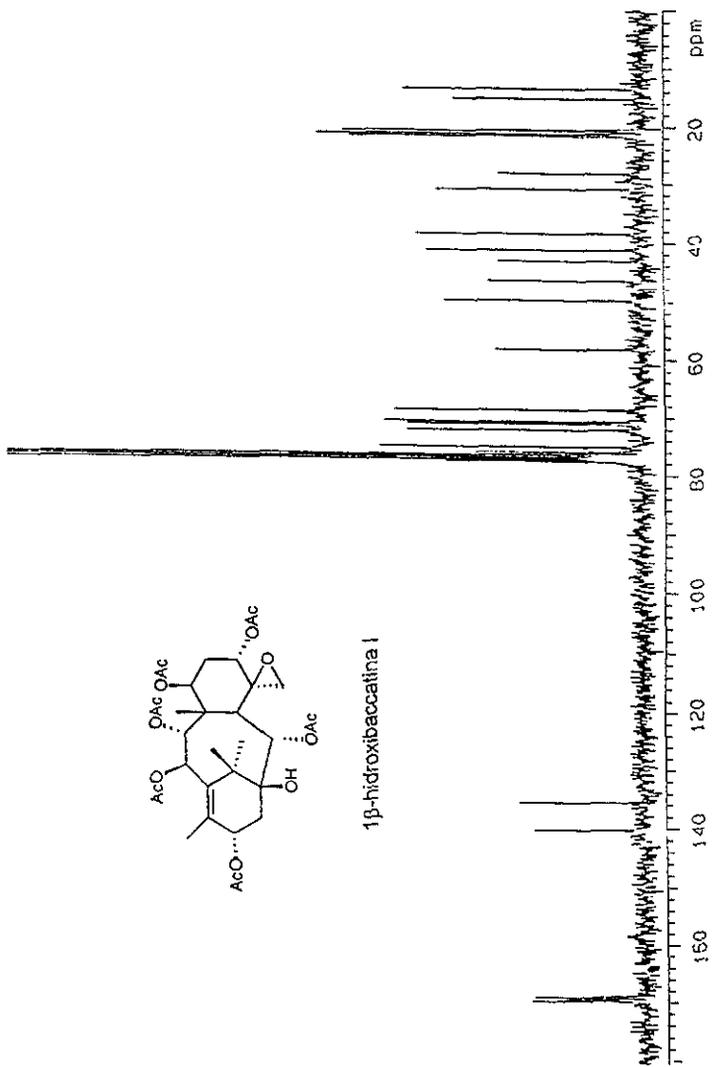


1β-hidroxiabacatina I

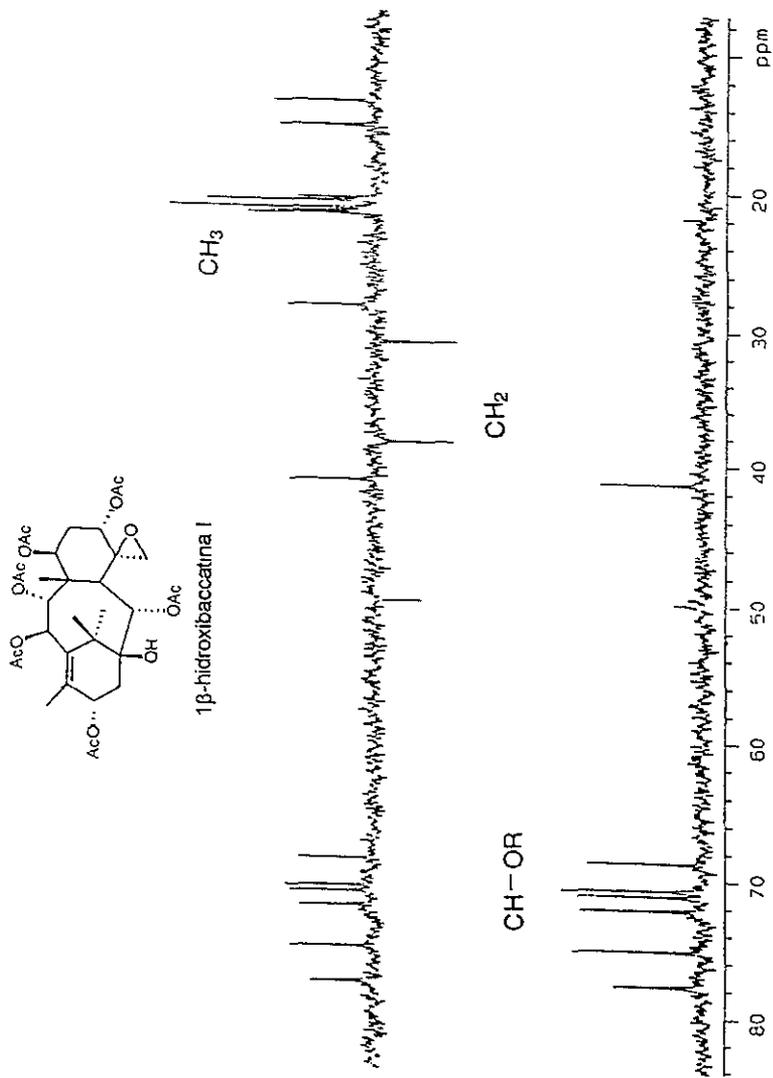
Espectro 15. IR (CHCl₃) de 1β-hidroxiabacatina I (55).



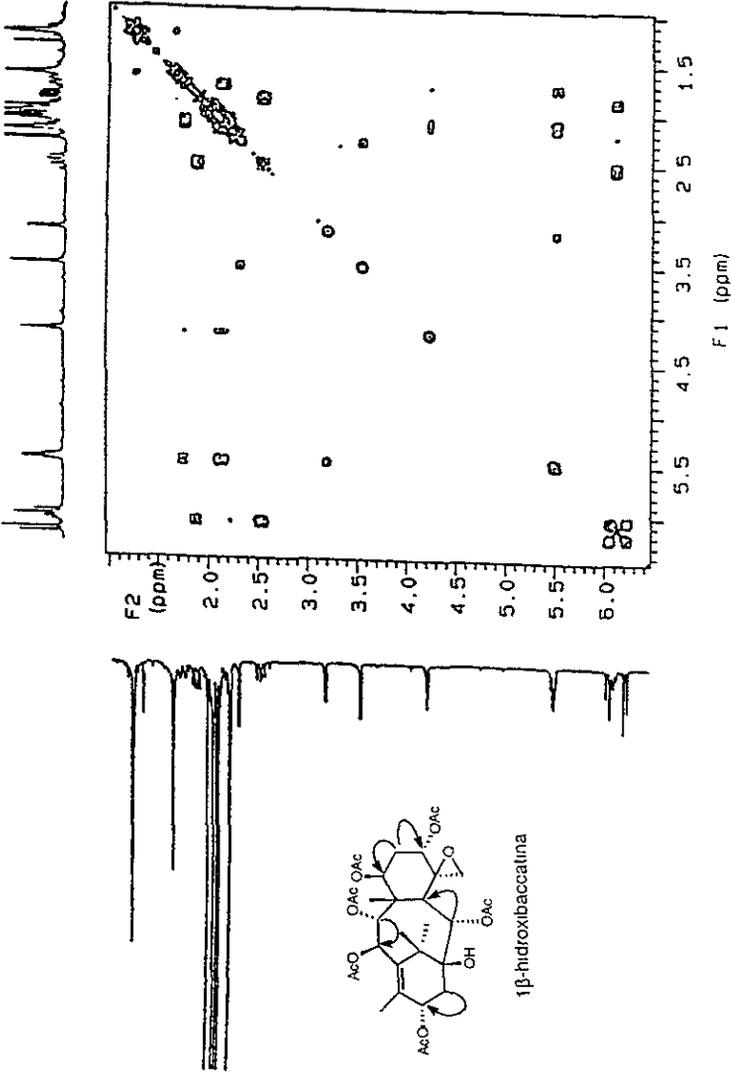
Espectro 16. EM (IQ) de 1β-hidroxibaccatina I (55).



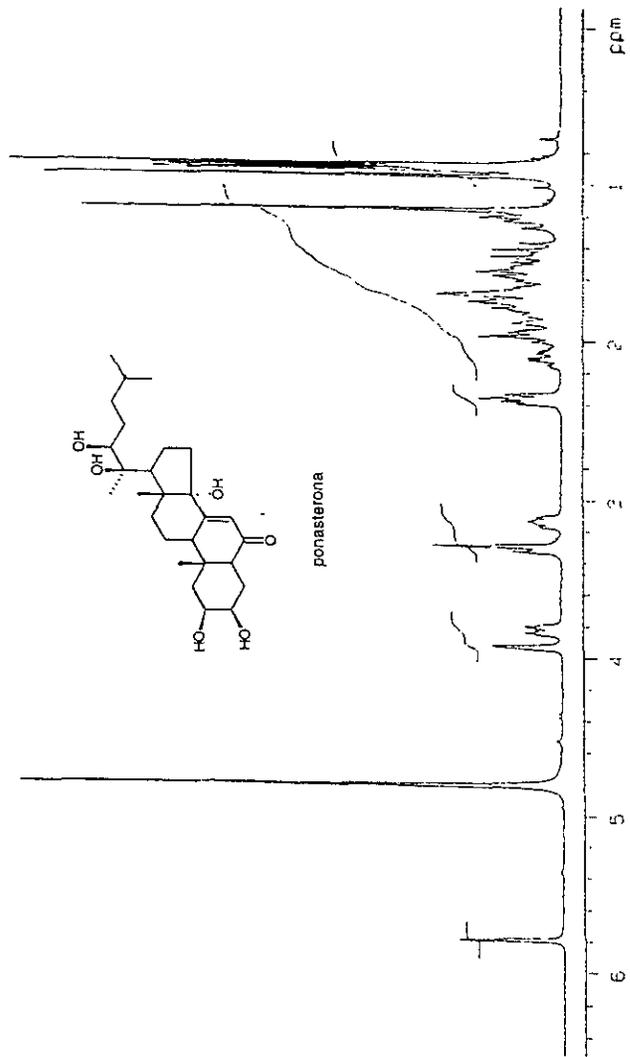
Espectro 18. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de 1β-hidroxi**baccatina I (55)**.



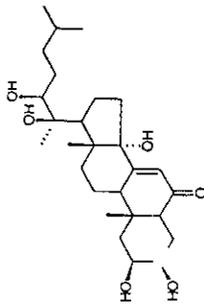
Espectro 19. DEPT (CDCl_3 , 125 MHz) de 1β -hidroxibaccatina I (55).



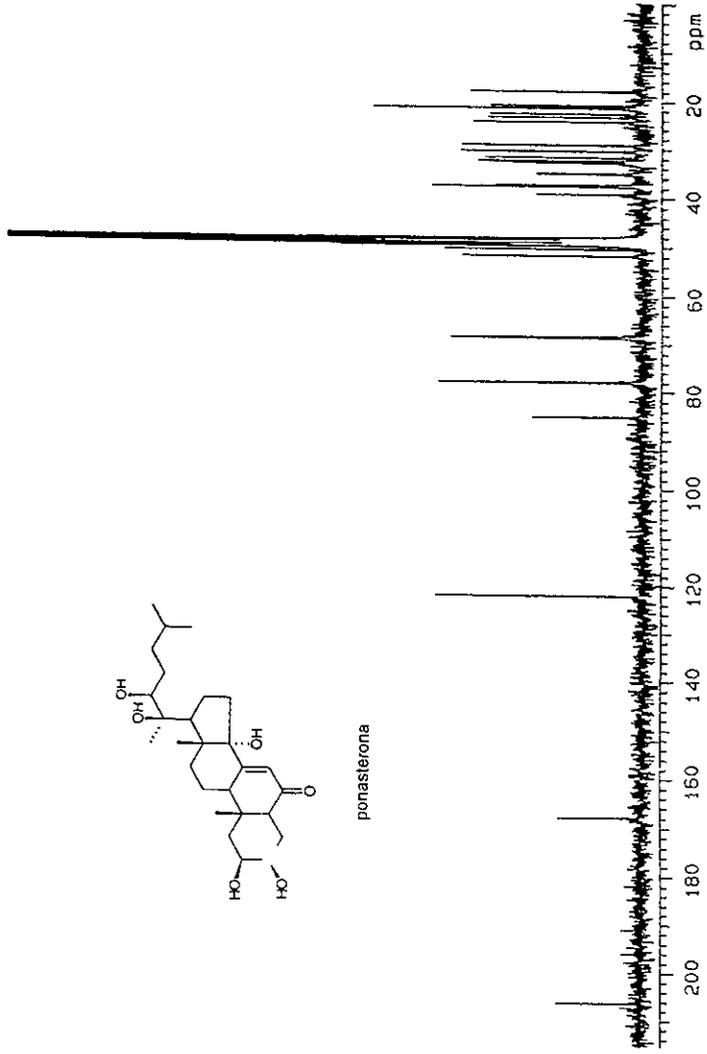
Espectro 20. COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de 1 β -hidroxibaccatina I (55).



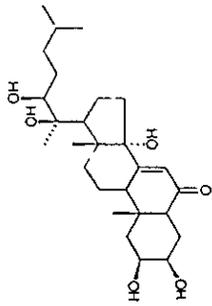
Espectro 21. RMN ^1H (MeOH- d_4 , 300 MHz) de ponasterona (41).



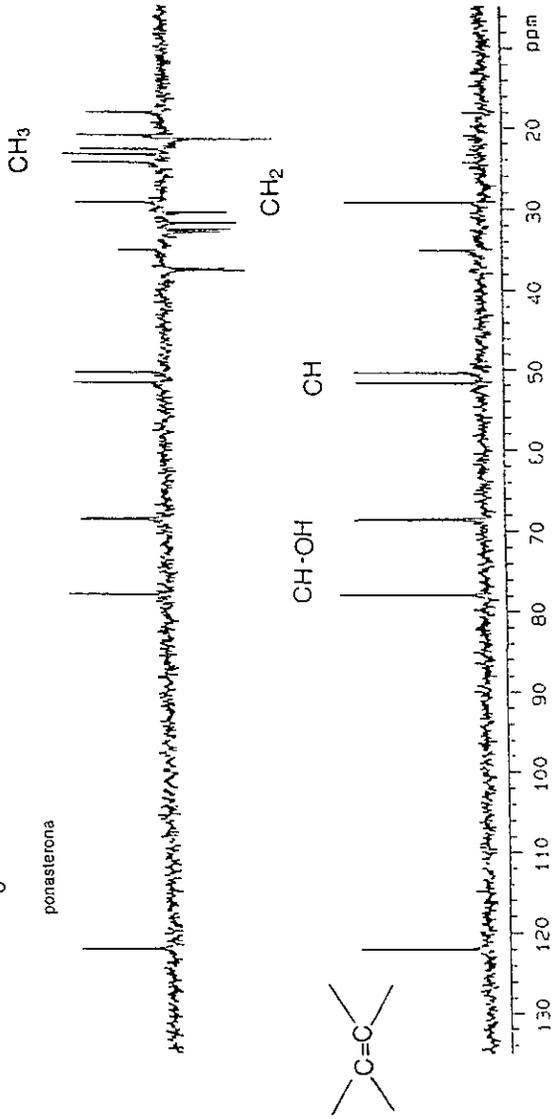
ponasterona



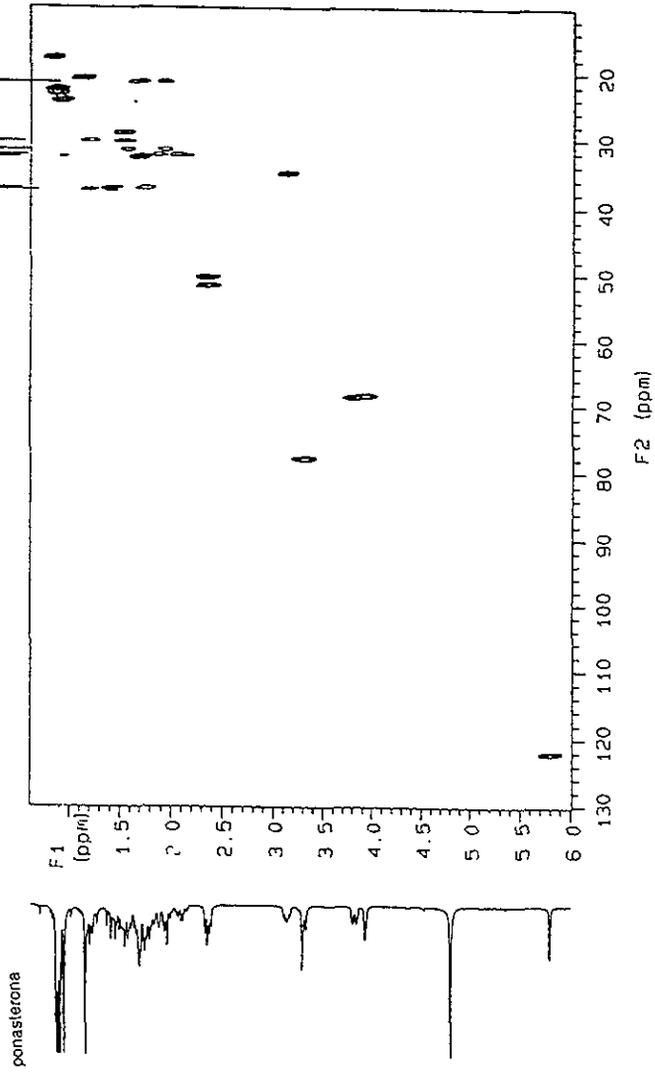
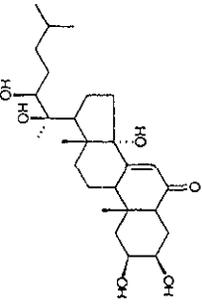
Espectro 22 RMN ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, 75 MHz) de ponasterona (41).



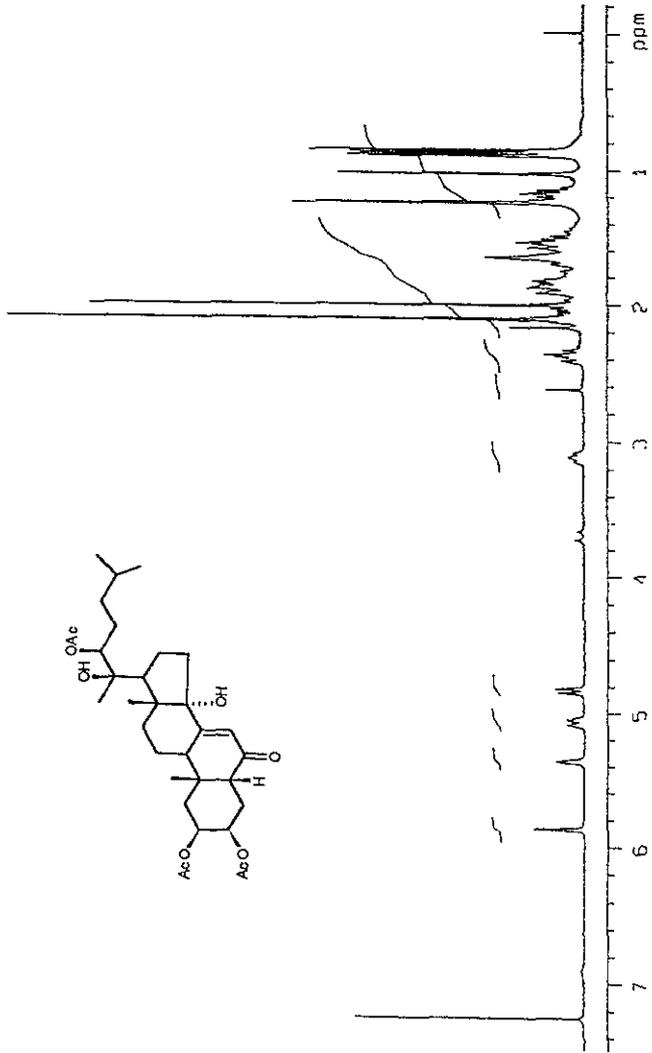
ponasterona



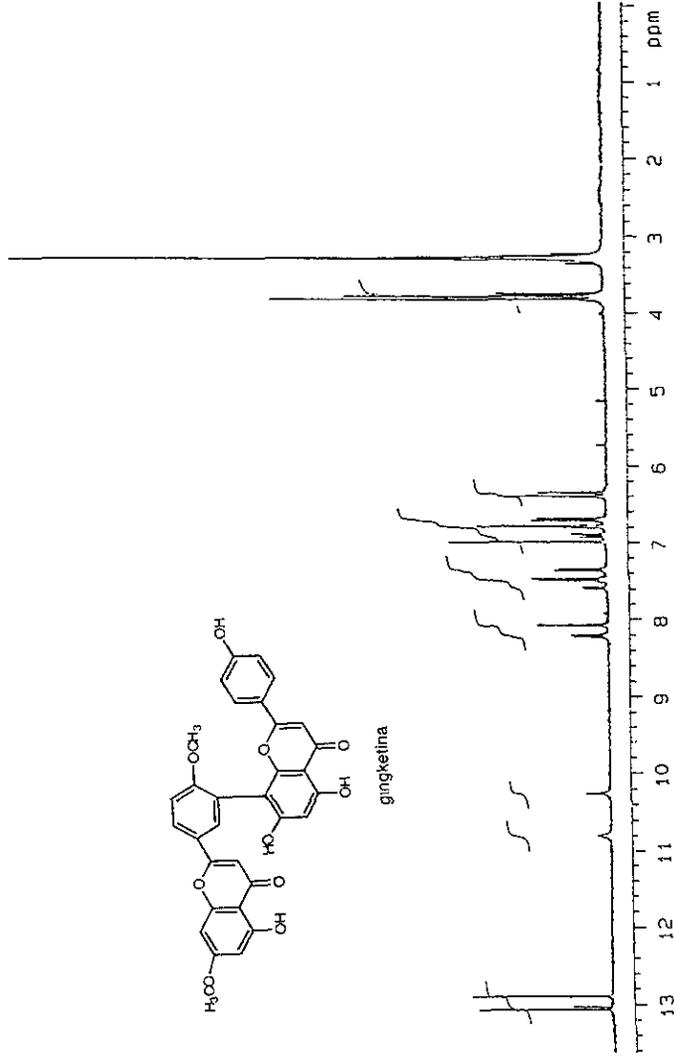
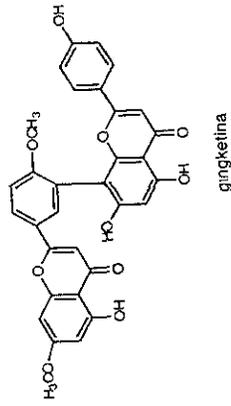
Espectro 23. DEPT (MeOH-d₄, 300 MHz) de ponasterona (41).



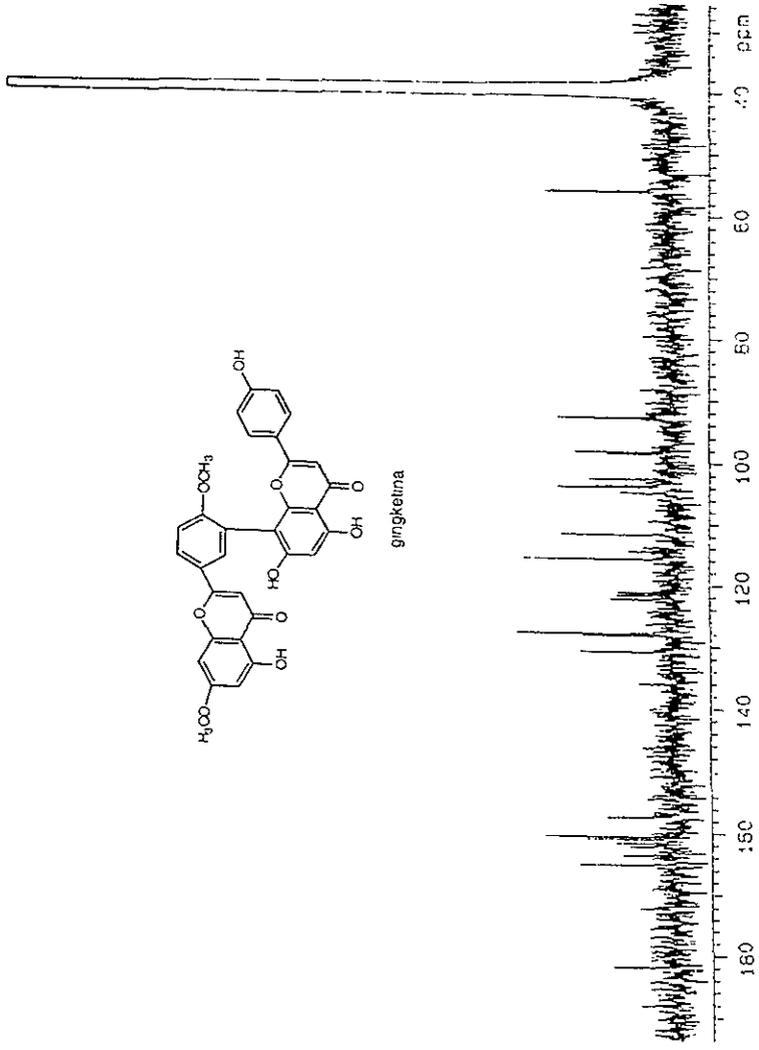
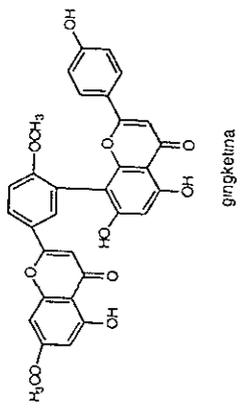
Espectro 24. HETCOR (DMSO- d_6 , 300 MHz) de ponasterona (41).



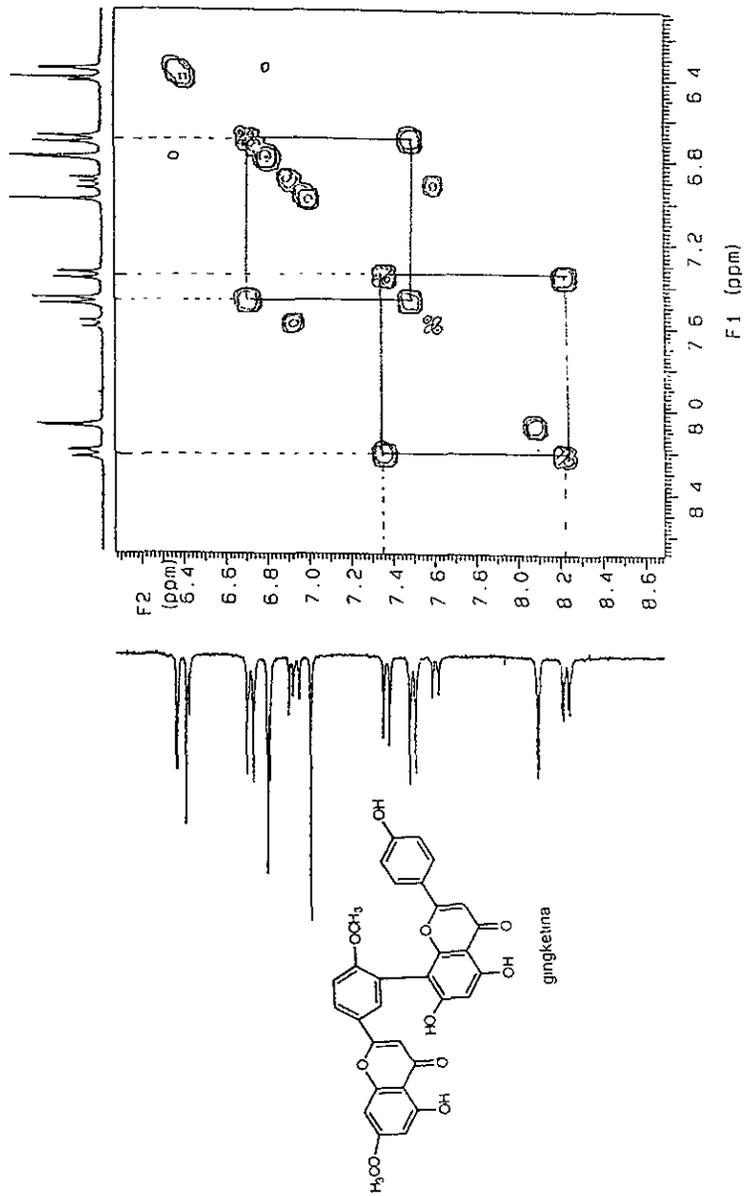
Espectro 25. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) derivado acilado de ponasterona (41a).



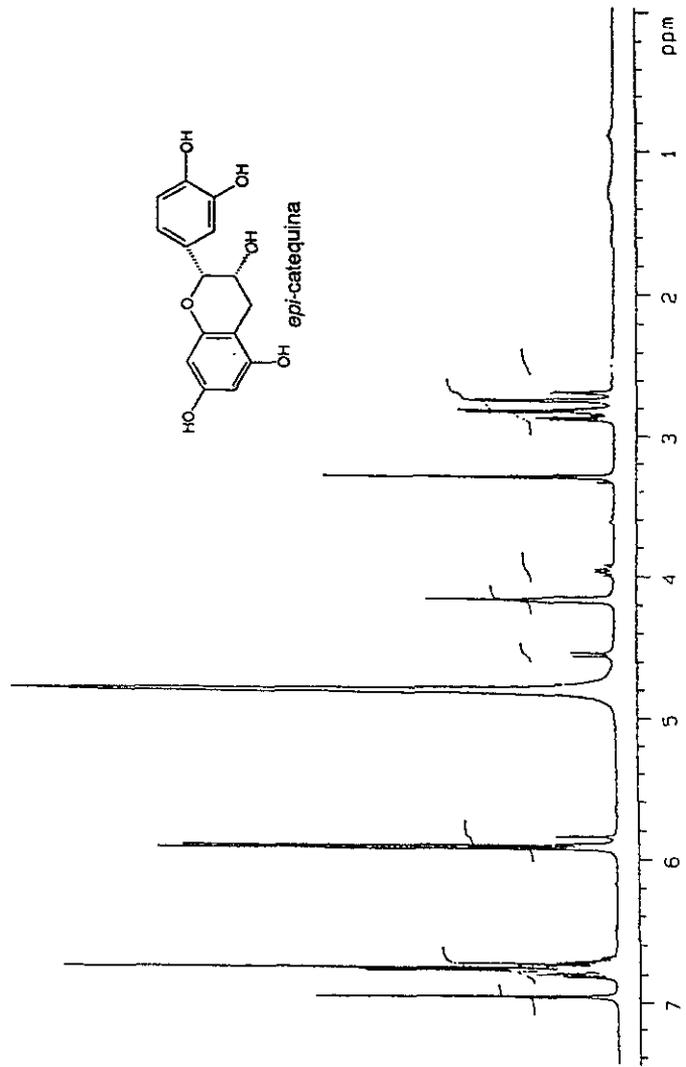
Espectro 26. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) de Ginkgetina (49).



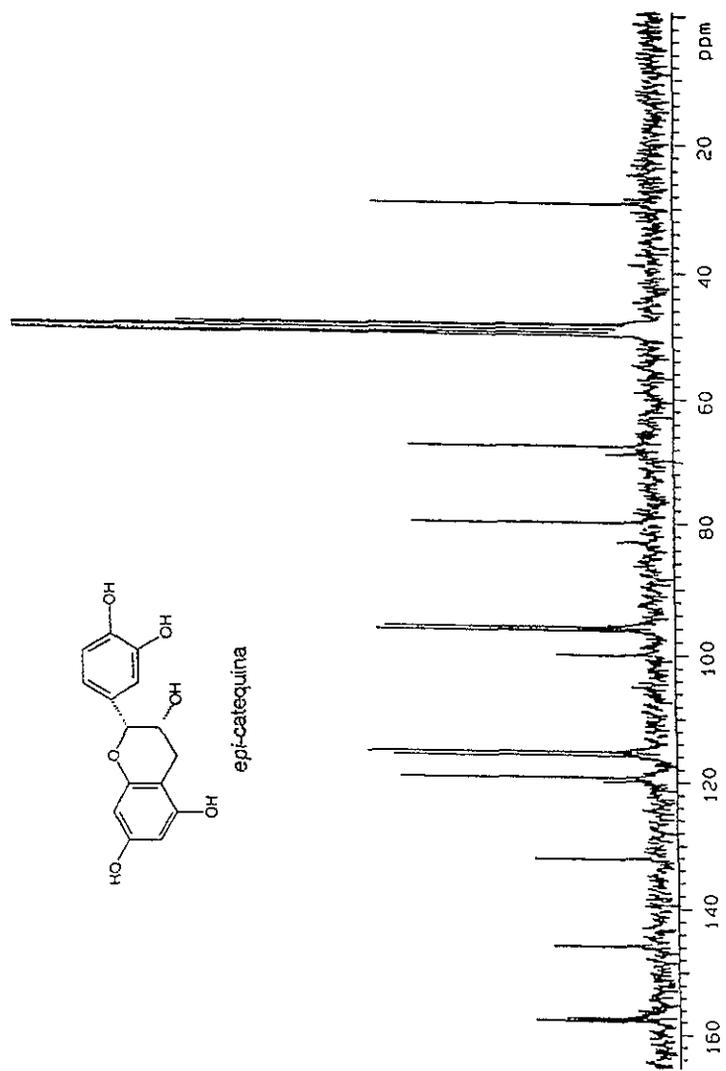
Espectro 27. RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75 MHz) de Ginkgetina (49).



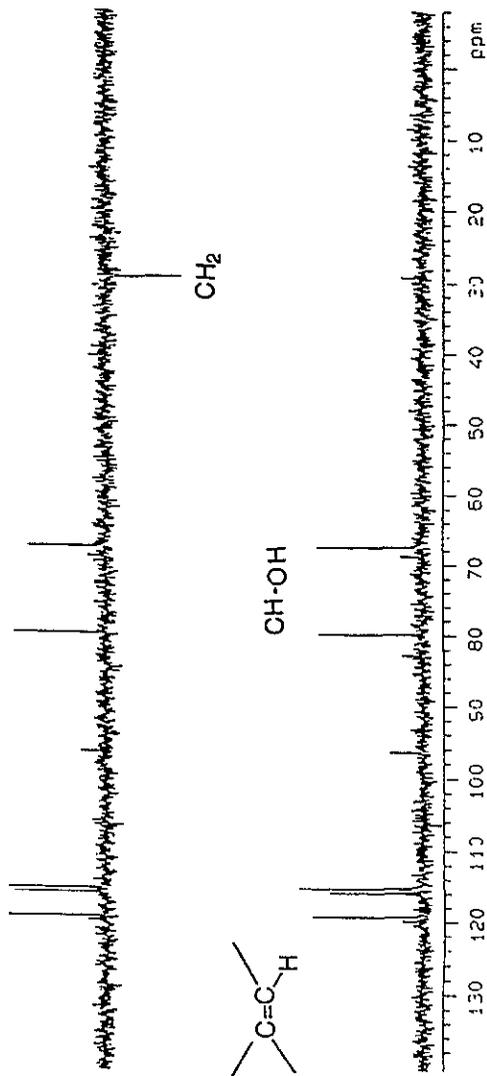
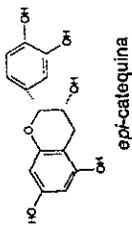
Espectro 29. COSY (DMSO- d_6 , 300 MHz) de Ginkgetina (49).



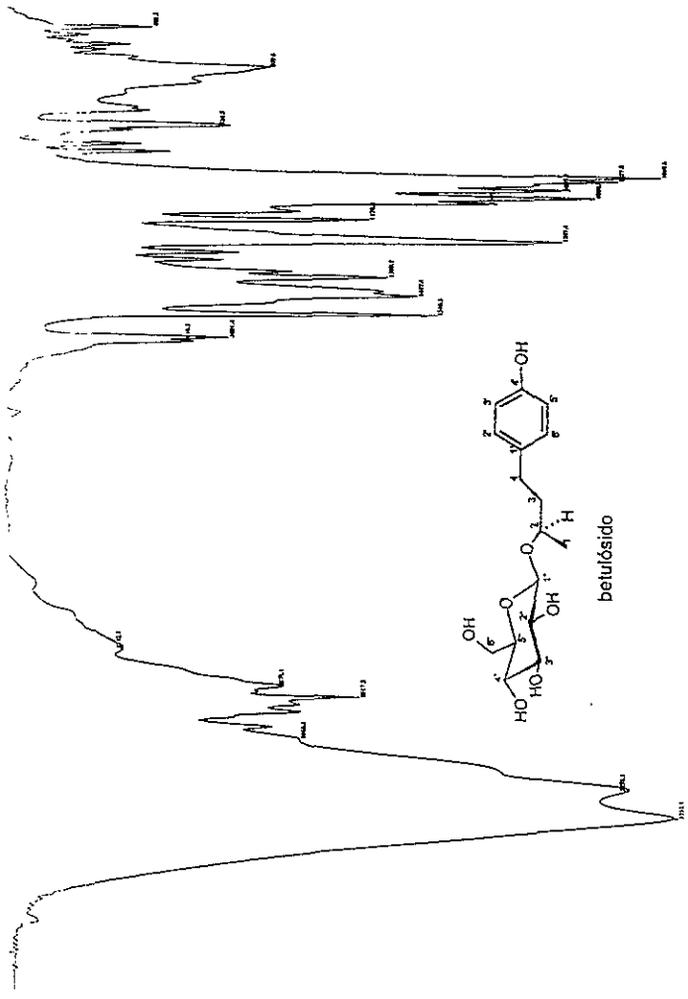
Espectro 30. RMN ¹H (MeOH-d₄, 300 MHz) Epi-catequina (56).



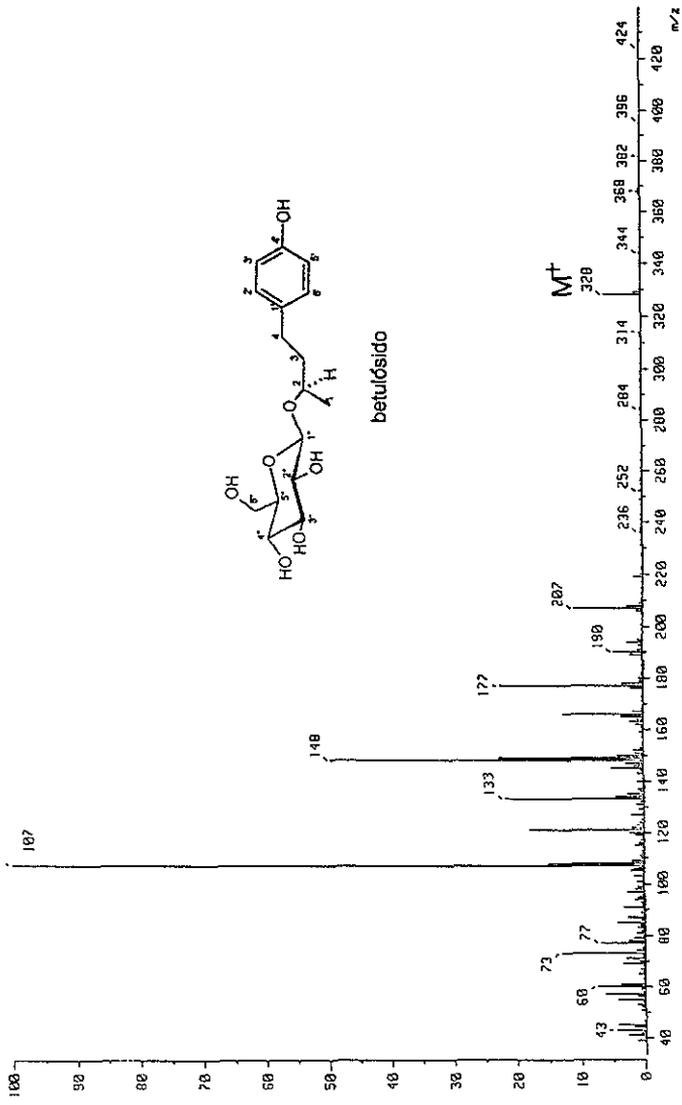
Espectro 31. RMN ^{13}C (MeOH- d_4 , 75 MHz) Epi-catequina (56).



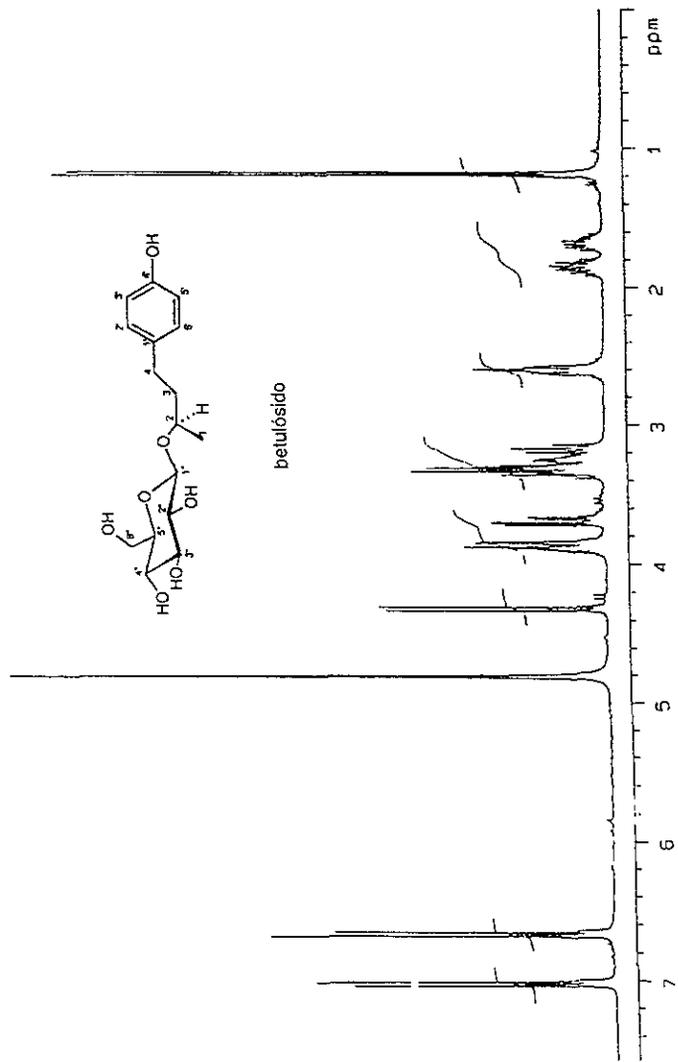
Espectro 32. DEPT (MeOH-*d*₄, 75 MHz) Epi-catequina (56).



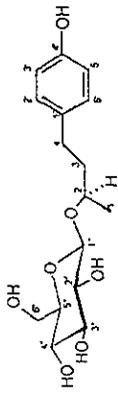
Espectro 33. IR (MeOH) de betulósido (57).



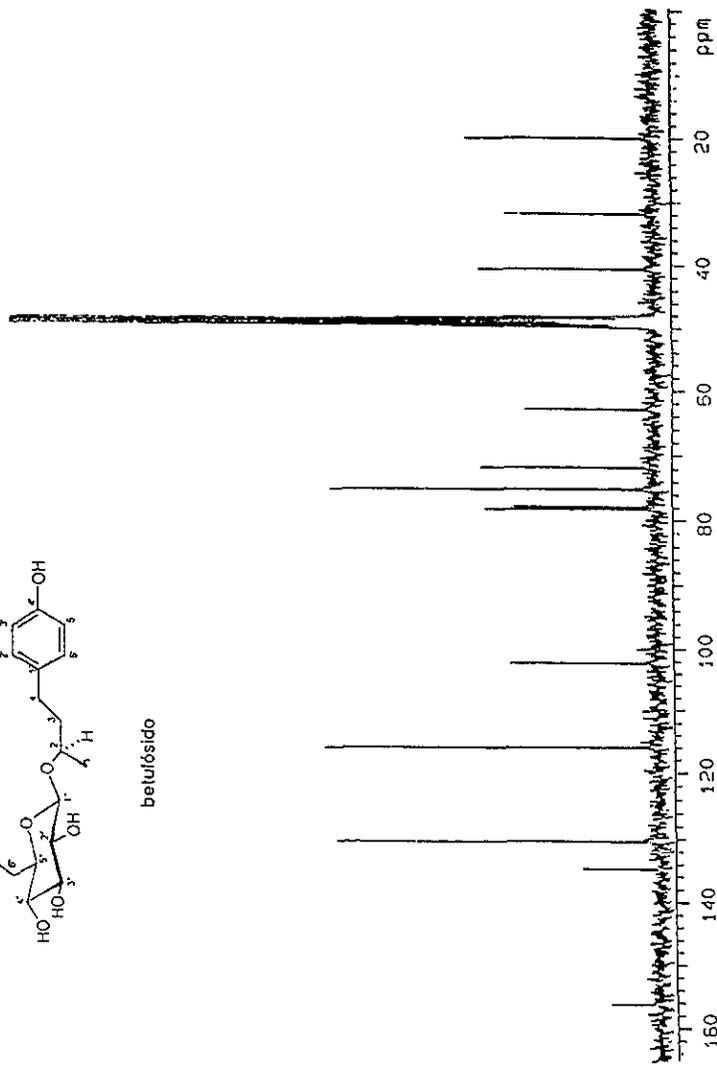
Espectro 34. EM (IE, 70 eV) de betulosido (57).



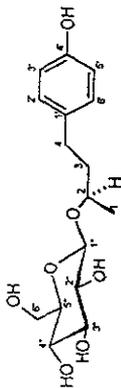
Espectro 35. RMN ^1H (MeOH- d_4 , 300 MHz) de betulósido (57).



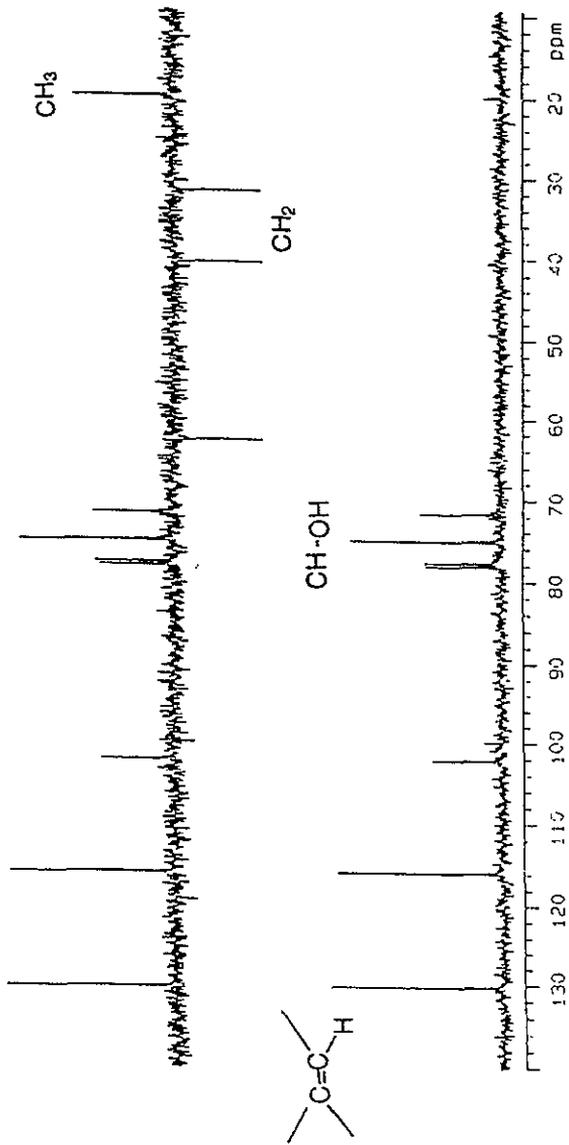
betulosido



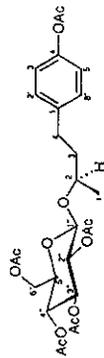
Espectro 36. RMN ¹³C (MeOH-d₄, 75 MHz) de betulosido (57).



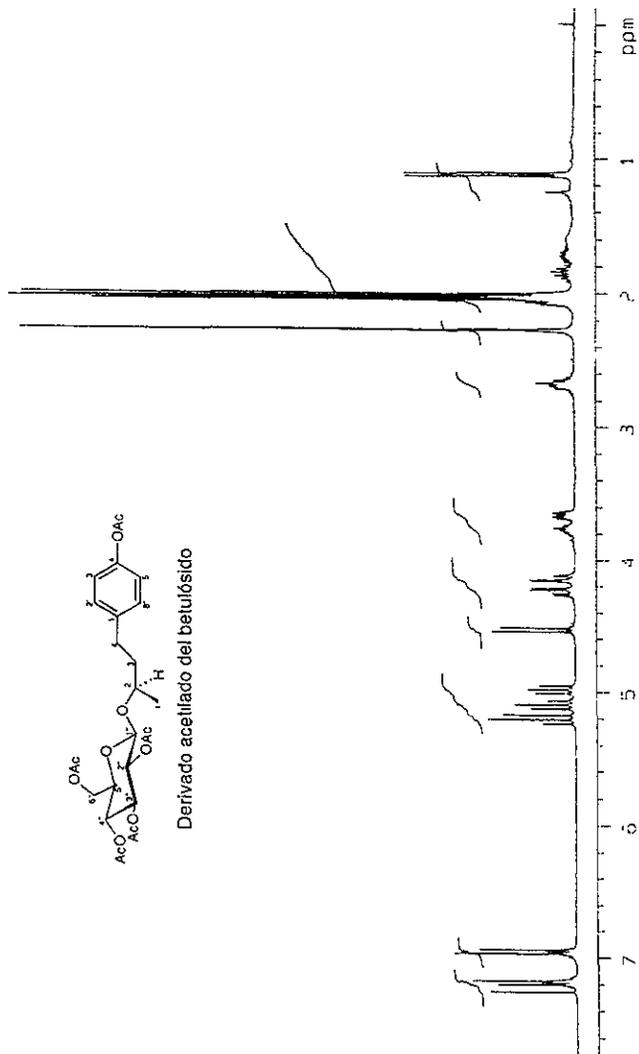
betulósido



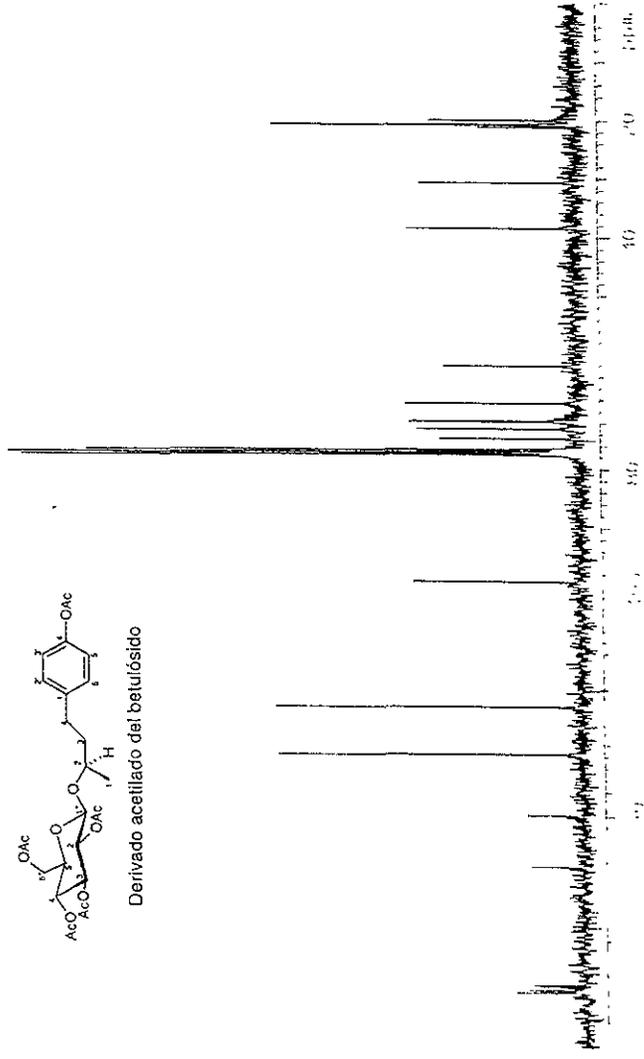
Espectro 37. DEPT (MeOH-*d*₄, 75 MHz) de betulósido (57).

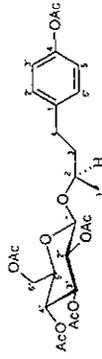


Derivado acetilado del betulósido

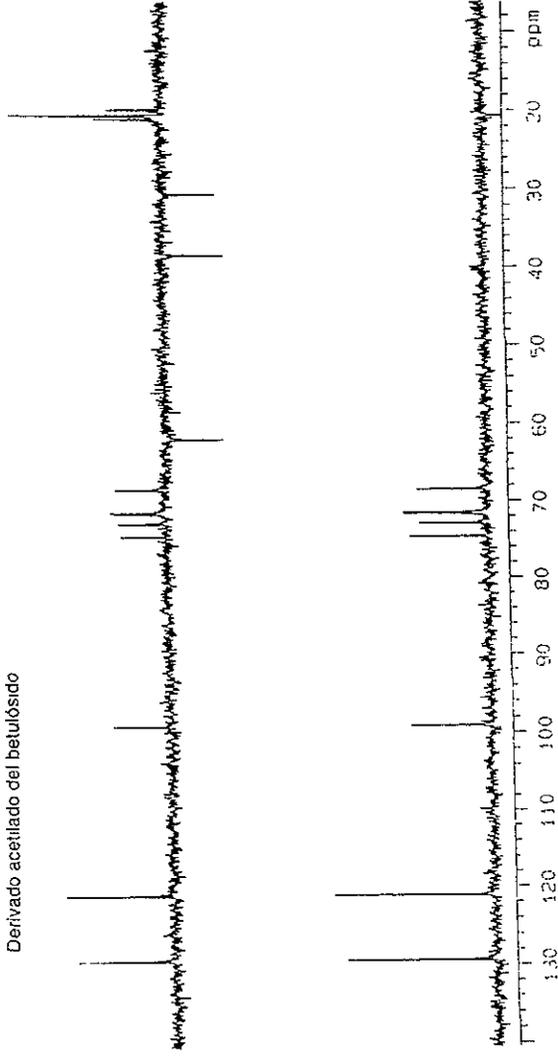


Espectro 38. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del derivado acetilado de betulósido (57).

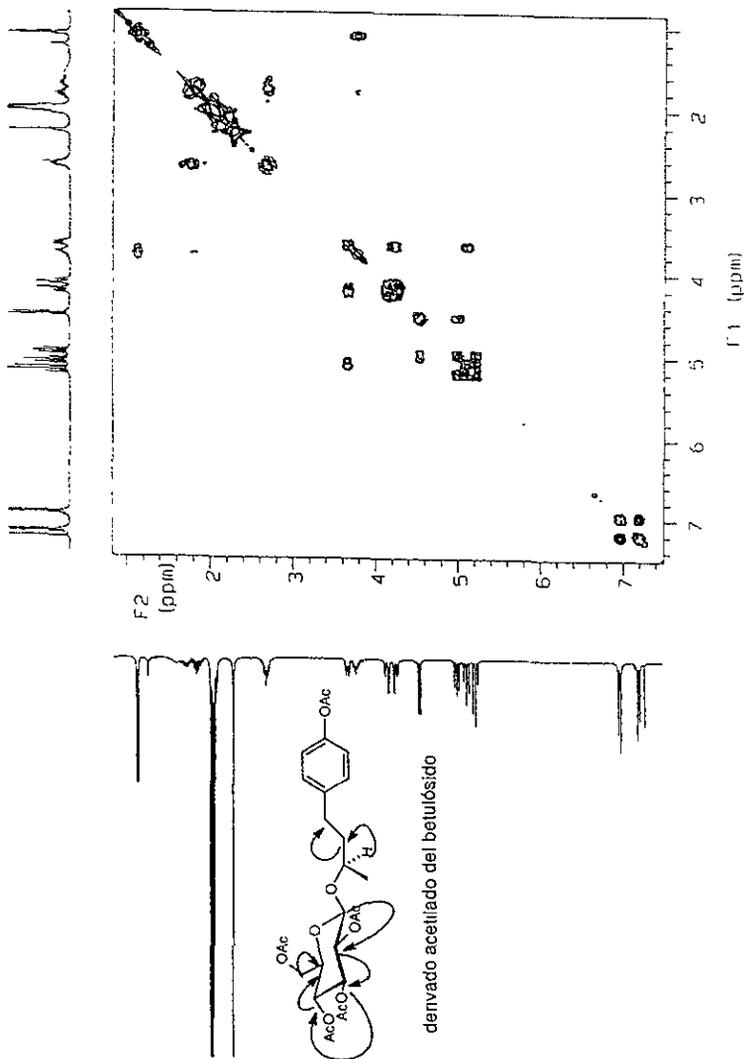




Derivado acetilado del betulósido



Espectro 40 DEPT (CDCl_3 , 75 MHz) del derivado acetilado de betulósido (57).



Espectro 41. COSY (CDCl₃, 300 MHz) del derivado acetilado de betulósido (57).

- 1.- Hartwell, J. L., *Plants Used Against Cancer, A Survey. Lloydia*, **1971**, *34*, 204.
- 2.- a) Jardine, I., *Anticancer Agents Based on Natural Product Models*, Academic Press, 1980, 319.
b) Karwell, J. L. and Schrecker, A. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 2909.
- 3.- a) Wall, M. E., Wani, M. C., Cook, C. E., Palmer, K. H., McPhail, A. T. and Sim, G. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 3808.
b) Wall, M. E. and Wani, M. C., *Anticancer Agents Based on Natural Product Models*, Academic Press, 1980, 417.
- 4.- Johnson, Y. S., Armstrong, J., G., Gorman, M. and Barnette, P. J. Jr., *Cancer Res.*, **1963**, *23*, 1390.
- 5.- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2325.
- 6.- Holmes, F. J., Kudellewa, A. P. Kavanagh, J. J., Huber, M. H., Ajsni, J. A., Valero, V., *Taxane Anticancer Agents: Basic Science and Current Status*, *Am. Chem. Soc.*, Washington. D. C., pp 3, 1995.
- 7.- a) Horwitz, S. B., *Trends. Pharmacol. Sci.*, **1992**, *13*, 134.
b) Jordan, M. A. Wilson, L., *Taxane Anticancer Agents: Basic Science and current Status* (Georg, Chen, Ojima), Washington. D. C , pp 138, 1995.
- 8.- Nicolau, K. C., Yang, Z., Lin, J. J., Veno, H., Nantermet, P. G., et al., *Nature*, **1994**, *367*, 630.
- 9.- Holton, R. A., Somoza, C., Kim, H. B., Kim, H. B., Liang, F. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1597.
- 10.- Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F., Potier, P., *Acc Chem. Res.*, **1993**, *26*, 160.
- 11.- Holton, R. A., Biedger, R. J., Boatman, P. D., *Taxol. Science and Applications* (Suffness, M. Ed.), CRC. Press, Boca Ratón, 1995, 97.
- 12.- Borman, S., *Chem. Eng. News*, **1992**, *70*, 30.
- 13.- Nicolau, K. C., Dar, W. - M., Guy, R. K., *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 15.
- 14.- Wickremesinhe, E. and Arteca, R. N., *Plant. Cell, Tissue Org. Cult.*, **1993**, *35*, 181.
- 15 - Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., *Science*, **1993**, *260*, 214.
- 16.- Price, R.A., *J. Arnold Arb.*, **1990**, *71*, 69.
- 17.- Embarger, L., *Les Plantes Fossiles*, Masson y Cie, Paris, 1968, 583.

- 18.- Li, H. L., *Evolution*, **1953**, 7, 245
- 19.- Florín, R., *Acta Horti Berg.*, **1963**, 20, 121.
- 20.- De Laubenfels, D. J., *Flora Malesiana*, Vol 10, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1988, 337.
- 21.- Rushfort, K., *Conifers*, New York, 1987.
- 22.- Graves, R., *The White Goddess*, Farrar, Straus y Giroux, New York, 1948, 193.
- 23.- Graves, R., *The Greek Myths*, Penguin Books, Harmondsworth, 1960, 183.
- 24.- Hartzell, Jr, H. R., *Taxol: Science and Applications* (Suffness, M. Ed.), CRC. Press, Boca Ratón, 1995, 27.
- 25.- Duke, J., *Handbook of Northeastern Indian Medicinal Plants*, Quartermain, Lincoln, 1986, 156.
- 26.- 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**.
- 27.- Vohora, S.B., Kumar, I., *Planta Med.*, **1971**, 20, 100.
- 28.-Guerrero, B., Aislamiento Y Elucidación Estructural De Un Peracetiltaxano Y Otros Constituyentes Del Tejo Mexicano, *Taxus globosa* Schlecht (Taxaceae)., Tesis UNAM, (1997).
- 29.- Lucas, H., *Arch Pharm.*, **1856**, 85, 145.
- 30.- Tekol, I., *Planta Med.*, **1985**, 357.
- 31.- Ettouati, L., Ahond, A., Poupat, C., Potier, P., *J. Nat. Prod.*, **1991**, 54, 1455.
- 32.- Baxter, J. N., Lythgoe, B., *J. Chem. Soc.*, **1962**, 2964.
- 33.- Castellano, E. E., Hodder, O. J., *Acta Crystallogr., Sect. B*, **1973**, 29, 2566.
- 34.- Swindell, C. S., Issacs, T. F., y Kanes, K. J., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 289.
- 35.- Woods, M.C., Nakanishi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 522.
- 36.- Gueritte, F., Potier, P., *Acad. Sci. Ser. 2*, **1984**, 299, 1039.
- 37.- Kingston, D. G. Y., Molinero, A. A., Rimoldi, J. M., *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **1993**, 61, 1.

- 38.- Della Casa de Marcano, D. P., Halsall, T. G., *Chem. Commun.*, **1969**, 1282.
- 39.- Chiang, H. C., Woods, M. C., Nakadaira, Y., Nakanishi, K., *Chem. Commun.* **1967**, 1201.
- 40.- Kingston, D. G., Hawkins, D. R., Ovington, L., *J. Nat. Prod.*, **1982**, *45*, 466.
- 41.- Appendino, G., Ozen, H. C., Gariboldi, P., Gabetta, B., Zini, G., Bombardelli, E., *Fitoterapia*, **1993**, *64 S1*, 47.
- 42.- Ettouati, I., Ahond, A., Convert, O., Laurent, D., Paupat, C., Potier, P., *Bull Soc. Chim. Fr.*, **1988**, 749.
- 43.- Appendino, G., Gariboldi, P., Pisetta, A., Bombardelli, E., Gabetta, B., *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 4253.
- 44.- Beutler, A., Chmurny, G. M., Look, S. A., Witherup, K. M., *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, 893.
- 45.- Della Casa de Marcano, D. P., Halsall, T. G., *J. Chem. Soc. D.*, **1970**, 1381.
- 46.- Zamir, L. O., Nedeá, M. E., Bélair, S., et al, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3173.
- 47.- Ettouati, I., Ahond, A., Convert, O., Laurent, D., Paupat, C., Potier, P., *Bull Soc. Chim. Fr.*, **1989**, 687.
- 48.- Della Casa de Marcano, D. P., Halsall, T. G., *J. Chem. Soc. D.*, **1975**, 366.
- 49.- Chu, A., Zajicek, J., Davin, L. B., Lewis, N. G., Crotten, R. B., *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 4249.
- 50.- Powell, R. G., Miller, R. W., Smith, C. R., et al, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1979**, 102.
- 51.- Miller, R. W., Powell, R. G., Smith, C. R., et al, *J. Org. Chem.*, **1981**, *40*, 1469.
- 52.- Torregiani, E., Barbani, L., Rafarani, G., Lambertucci, C., Appendino, G., *Gazzetta Chim. Ital.*, **1996**, *126*, 809
- 53.- Fuji, K., Tanaka, K., Li, B., Singu, T., and Taga, T., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 7915.
- 54.- Appendino, G., Barboni, L., Gariboldi, P., Bombardelli, E., Gabetta, B., and Viterbo, D., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1993**, 1587.
- 55.- Georg, G.I., Gollapudi, S.R., Gunn, C. W., et al, *Bioorg. Med. Chem Lett.* **1993**, *3*, 1345.

- 56.- Appendino, G., Gariboldi, P., Gabetta, B. and Bombardelli, E., *Fitoterapia* **1993**, *64*, S1, 37.
- 57.- Samaranayake, G., Magri, N. F., Jitrangri, C., Kingston, D. G., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 5114.
- 58.- Pattenden, G., Jackson, C. B., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 3393.
- 59.- Begley, M.J., Jackson, C.B. and Pattenden, G., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 3397.
- 60.- Fang, W.- S., Fang, Q. - C., Liang, X. - T., Lu, Y. and Zheng, Q. - T., *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 8483.
- 61.- Appendino, G., Cravotto, G., Enriu, R., Jakupovic, J., Gariboldi, P., Gabetta, B. and Bombardelli, E., *Phytochemistry*, **1994**, *36*, 407.
- 62.- Chiari, G., Appendino, G. and Nano, G. M., *J. Chem Soc. Perkin Trans II*, **1986**, 263.
- 63.- Ueda, K., Uyeo, S. Yamamoto, Y. and Maki, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1963**, 2167.
- 64.- Zamir, L. O., Nedeá, M. E. and Garneau, F. X., *Tetrahedron Lett*, **1992**, 5235.
- 65.- Eisenreich, W., Menhard, B., Hynlands, P. J., Zenk, M. H., Bacher, A., *Proc., Natl. Acad. Sci. USA* **93**, **1996**, 6431.
- 66.- Schwer, J., Seemann, M. Lichtenthaler, H. R., Rohmer, M., *Biochem. J.*, **1996**, *316*, 73.
- 67.- Koepp, A. E., Hezari, M., Zajicek, J., Stoter Vogel, B., Lafever, R. E., Lewis, N. G., Croteau, R., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 8686.
- 68.- Hezari, M., Lewis, N. G., Croteau, R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, *322*, 437.
- 69.- Lin, X., Hezari, M., Koepp, A. E., Floss, H. E., Croteau, R., *Biochemistry*, **1996**, *35*, 2968.
- 70.- Croteau, R., Hezari, M., Hefner, J., Koepp, A. E., Lewis, N. G., *Taxane Anticancer Agents: Basic Science and Current Status*. (Georg., Chen, T., Ojima, Eds). American Chemical Society, Washington, D. C. **1995**, 72.
- 71.- Hefner, J., Croteau, R., *Methods Enzymol*, **1996**, *272*, 243.
- 72.- Hezari, M., Croteau, R., *Planta Med.*, **1997**, *63*, 291.
- 73.- a) Magri, N. F., Kingston, D. G., Jitrangri, C., Piccariello, T., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 3239.

- b) Guéritte-Voegelein, F., Senilh, V., David, B., Guénard, D., Potier, P., *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 4452.
- 74.- Denis, J. N., Greene, A. E., Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F., Mangatal, L., Potier, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 5910.
- 75.- Kobayashi, T., Kurono, M., Soto, H., Nakanishi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 2863.
- 76.- Hanson, R. L., Wosylyk, J. M., Manduri, V. B., Patel, R. N., Szarka, L. J., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 22145.
- 77.- Kingston, D.G. I., Gunatilaka, A. A. L., Ivey, C. A., *J. Nat. Prod.*, **1992**, *55*, 259.
- 78.- Beckvermit, J. T., Anziano, D., J., Muirray, C. K., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 9038.
- 79.- Pandey, R. C., YanKov, L. K., Pouleu, A., Nair, R., Caccamese, S., *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 57.
- 80.- Bonnert, R. V., Jenkins, P. R., *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, **1987**, 1540.
- 81.- Kingston, D. G., Samaranyake, G. Ivey, C. A., *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 1.
- 82.- Wahl, A. Guénte-Voegelein, G., Guénard, D., Le Gaff, M. - T., Potier, P., *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 6965.
- 83.- Appendino, G., Fenoglio, I., VanderVelde, D. G., *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 464
- 84.- Chen, S. H., Combs, C. M., Hill, S. E., Farina, V. and Doyles, T. W., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 7679.
- 85.- Gunatilaka, A. A., Chordia, M. D., Kingston, D. G., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 3775.
- 86.- Rose, W. C. en *Taxol: Science and Applications (Suffness, M. Ed.)*, CRC. Press, Boca Ratón, 1995, 209.
- 87.- Swindell, C., Krauss, N. E., Horwitz, S: B., Ringel, Y., *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 1176
- 88.- Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F., Potier, P., *Acc Chem. Res.*, **1993**, *26*, 160.
- 89.- Nakano, K., Nahara, T., Tomimatsy, T., Nishikawa, M., *Phytochemistry*, **1992**, *21*, 2749.
- 90.-a) Burns, B. G., Gilgan, M. W., *Can. J. Chem*, **1976**, *55*, 1129.
b) Imar, S., Fujioka, S., Nakanishi, K., Kareeda, M., *Steroids*, **1967**, *10*, 557.
- 91.-a) Erdtman, H., Tsuno, K., *Phytochemistry*, **1969**, *8*, 931.
b) Das, B., Ro, P., Srinivas, N, S Yadra, J. S., *Phytochemistry*, **1995**, *38*, 715.

- 92.- a) Nahrstedt, A., *J. Chromatogr.*, **1979**, *177*, 157.
b) Ud-Din Khan, N., Parveen, N., *J. Sci. Ind. Res.*, **1987**, *43*, 425.
- 93.- Baker, W., Finch, A. C. M., Ollis, W. D., Robinson, K. W., *J. Chem. Soc.*, **1963**, 1477.
- 94.- Hong, S.-S., Song, B.-K., Kim, J.-H., Lim, C.-B., Lee, H.-S., Kim, K.-W., Kang, I.-S., Park, H.-B., *Chem. Abstr.*, **1997**, *126*, 37053r (PCT Int. Appl. WO 96 34,973).
- 95.-Choi, H.-K., Adams, T.L., Stahlut, R.W., Kim, S.-I, Yun, J.-H., Song, B.-K., Kim, J.-H., Song, J.-S., Hong, S.-S., Lee, H.-S., *Chem. Abstr.*, **1997**, *126*, 17878k (PCT Int. Appl. WO 96 34,110).
- 96.- a) Yang, S. J., Fang, J. M., Cheng, Y. S., *Phytochemistry*, **1996**, *43*, 839
b) Chen, W.M., Zhang, P.L., Wu, B., Zheng, Q.T., *Acta Pharm. Sinica*, **1991**, *26*, 747.
- 97.- Appendino, G., Gariboldi, P., Gabetta, B., Pace, R., Bombardelli, E., Viterbo, D., *J. Chem Soc. Perkin Trans I*, **1992**, 2925
- 98.- Zhang, Z., Jia, Z., *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 3673.
- 99.- McLaughlin, J. L., Miller, R. W., Powell, R. G., Smith, C. R., *J. Nat. Prod.* **1981**, *44*, 312
- 100.- a) Barboni, L., Gariboldi, P., Torregiani, E., Appendino, G., Gabetta, B., Zini, G., Bombardelli, E., *Phytochemistry*, **1993**, *33*, 145.
b) Chattopadhyay, S. K., Saha, G. C., Kulshreshtha, M., Sharma, R.P., Kumar, S., *Indian. J. Chem.* **1996**, *35B*, 175
- 101.- Makhram, K. R., Sheppard, C., Geiger, H., *Phytochemistry*, **1987**, *26*, 3335.
- 102.- Baker, W., Finch, A. C. M., Ollis, W. D., Robinson, K. W., *J. Chem. Soc.*, **1963**, 1477
- 103.- Reddy, B. P., Krupadanam, D.G.I., *Indian J. Chem.*, **1996**, *35B*, 283
- 104.-a) Thompson. R. S., Jacques, D., Haslam, E. y Tanner, R. J. N., *J. Chem Soc. Perkin Trans I*, 1972, 1387
b) Hsu, F.-L., Nonaka, G.-I., y Nishioka, I., *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, 3142
- 105.- a) Chattopadhyay, S. K., Tripathi, V. K., Thakur, R. S., Sharma, R.P., Jain, S.P., *Indian J. Chem.*, **1994**, *33B*, 409.
b) Smite, E., Lundgrem, L. N., Andersson, R., *Phytochemistry*, **1993**, *32*, 365.
- 106.- Parmar, V. S., Vardhan, A., Taneja, P., Sinha, R., Patnaik, G. K., Tripathi, S.C., Boli, P. M., Larsen, S., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1991**, 2687.

107. Vohora, S.B., Kumar, I., Shah, S. A., Khan, M. S. Y., *Indian J. Med. Res.*, **1980**, *71*, 815.
108. Doss, R. P., Carney, J. R., Shanks, C. H., Williamson, R. T., Chamberlain, J. D., *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 1130