

# TAXOIDES EN EL FOLLAJE DEL TEJO MEXICANO (*Taxus globosa* Schelecht.)

N. A. Ramos-Lobato<sup>1</sup>; M. Soto-Hernández<sup>1\*</sup>; F. Zavala-Chávez<sup>2</sup>; M. T. Rodríguez-González<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Especialidad de Botánica IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México.  
Tel. 2-02-00 ext. 1300 y 1301. Fax (595) 2-02-47 (\*Autor responsable).

<sup>2</sup>Departamento de Ecología y Silvicultura. División en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo.  
Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. México. Tel. (595) 2-15-00 ext. 5331. Fax 01 (595) 4-19-57.

## RESUMEN

Taxol, deacetilbaccatina III y cefalomanina fueron cuantificadas en el follaje del tejo mexicano a la sombra de un dosel del bosque y en un sitio cercano expuestos a la luz solar. En los análisis se consideró el sexo de las plantas, la estación del año para recolectar las plantas y el diámetro del tronco. El tejido mostró diferencias en concentraciones de deacetilbaccatina III en árboles no sombreados, por otro lado, en aquellos árboles expuestos al sol, se encontró a la cefalomanina en niveles más altos que la deacetilbaccatina III y taxol. El taxol fue ligeramente más alto en árboles expuestos al sol (la concentración de taxoides varía con el sexo de las plantas). Los árboles macho mostraron la concentración más alta de deacetilbaccatina III y cefalomanina que árboles hembra; pero el taxol fue ligeramente alto en árboles hembra en comparación con los árboles macho. La concentración de taxoides también varía con la clase diamétrica de los árboles. En los de 16 a 35 cm, deacetilbaccatina III fue más alta que el taxol y cefalomanina, en los de 5 a 15 cm el orden fue deacetilbaccatina III, cefalomanina y taxol. Con relación a la estación, enero fue el mes donde se observa una concentración mayor de deacetilbaccatina III, cefalomanina y taxol.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** Deacetilbaccatina, cefalomanina, taxol, sexo de planta, cromatografía.

## TAXOIDS FROM THE FOLIAGE OF THE MEXICAN YEW (*Taxus globosa* Schelecht.)

## SUMMARY

Taxol, deacetylbaaccatine III, and cephalomannine were measured in the foliage of Mexican yew trees growing under the shade of a forest canopy, and in a nearby site, exposed to full sunlight. Also considered in the measurements were the sex of the plants, season of the year to collect the plants, and trunk diameter. The tissue showed differences in concentration of deacetylbaaccatine III in non-shaded plants, while those trees exposed to direct sunlight had greater quantities of cephalomannine than deacetylbaaccatine III and taxol. Taxol concentration was slightly higher in sun-exposed trees (the concentration of taxoids varies with the sex of the plants). The male trees showed higher concentration of deacetylbaaccatine III and cephalomannine than the female trees, but taxol was slightly higher in female trees than in male trees. The concentration of the taxoids also varies with the diameter class of the trees. In those trees 16 to 35 cm in diameter, concentration of deacetylbaaccatine III was higher than that of taxol and cephalomannine, and in those of 5 to 15 cm the order was deacetylbaaccatine III, cephalomannine and taxol. January was the month in which a greater concentration of deacetylbaaccatine III, cephalomannine, and taxol was observed.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** Taxol, deacetylbaaccatine III, cephalomannine, plant sex, chromatography.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos en general, los principios activos de las plantas a los que se les atribuyen efectos curativos pueden utilizarse en el tratamiento de un gran número de enfermedades, tal es el caso del taxol, un fármaco que ha encontrado un uso potencial principalmente

en el tratamiento del cáncer ovárico, y este caso resalta la inquietud acerca del manejo de los recursos naturales y su interés terapéutico. El taxol es una amida de complejo diterpénico aislado de la corteza del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia* Nutt.). En 1962 el Instituto Nacional del Cáncer realizó estudios en extractos crudos de la corteza de *Taxus*, más tarde el taxol fue identificado por Wani *et al.* (1971) como un constituyente activo del extracto de la corteza. Su

desarrollo clínico se retardó debido a su toxicidad y dificultades en su formulación, pero principalmente debido a su escasez (Theodoris y Verpoorte, 1996). Para obtener 1.0 g de taxol se requieren 10 kg de corteza que se aíslan de tres árboles de 100 años de edad, en los cuales la planta alcanza dimensiones de 25 cm de diámetro y de 6 a 9 m de altura (Hartzell, 1991).

Los individuos del género *Taxus* son árboles dioicos que se reproducen por semilla, se distribuyen a lo largo de las zonas templadas del hemisferio Norte de América. *Taxus globosa* Schelecht. es un árbol perennifolio de 6 a 10 m de alto y de 30 a 50 cm de diámetro, se le encuentra esporádicamente en México desde la parte central de Nuevo León y Tamaulipas pasando por la cuenca del Golfo y Eje Neovolcánico Transversal hasta el sur de Honduras en Centro América.

Por otra parte son escasos los estudios en *Taxus globosa* que enfocan su interés al aspecto químico biológico, por ejemplo, Soto *et al.* (2001), estudiaron por técnicas cromatográficas el contenido de análogos del taxol en el follaje de *T. globosa*; encontrando niveles comparables a los de otras especies de *Taxus*. Sin embargo, para la realización de dichas técnicas se utilizaron grandes cantidades de follaje en la obtención de los resultados.

Herrera (1998) observó la presencia de uno de los análogos del taxol, la deacetilbaccatina III (DAB III) aislando cantidades razonables del follaje ( $0.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de peso seco). Dadas las pequeñas cantidades de taxol y sus análogos (Figura 1) y la dificultad del análisis por los métodos convencionales, en este trabajo se consideró la conveniencia de estandarizar un método lo suficientemente sensible para detectar los niveles de concentración en los taxoides.

Por tanto, la presente investigación se enfocó a estudiar el efecto de las variables: sexo de la planta, época de recolecta, sitio de colecta y clase en diámetro en la acumulación de taxoides en el follaje de *Taxus globosa*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta del follaje de *Taxus* para este estudio se realizó en El Parque Nacional "El Chico" ubicado en la parte central del estado en la porción Occidental de la sierra de Pachuca, Hidalgo, México. Se localiza entre las coordenadas geográficas latitud Norte  $20^\circ 13'$  y longitud Oeste  $98^\circ 44'$  y a una altitud de 2500 a 2600 m. De acuerdo a la clasificación de Köppen, modificada por García (1981), el clima del Mineral El Chico es del tipo Cb (m) (w) (i) g, que corresponde a un templado con verano fresco y largo, la precipitación del mes más seco es menor de 40 mm; el porcentaje con lluvia invernal es entre 5 y 10.2 mm de la anual.

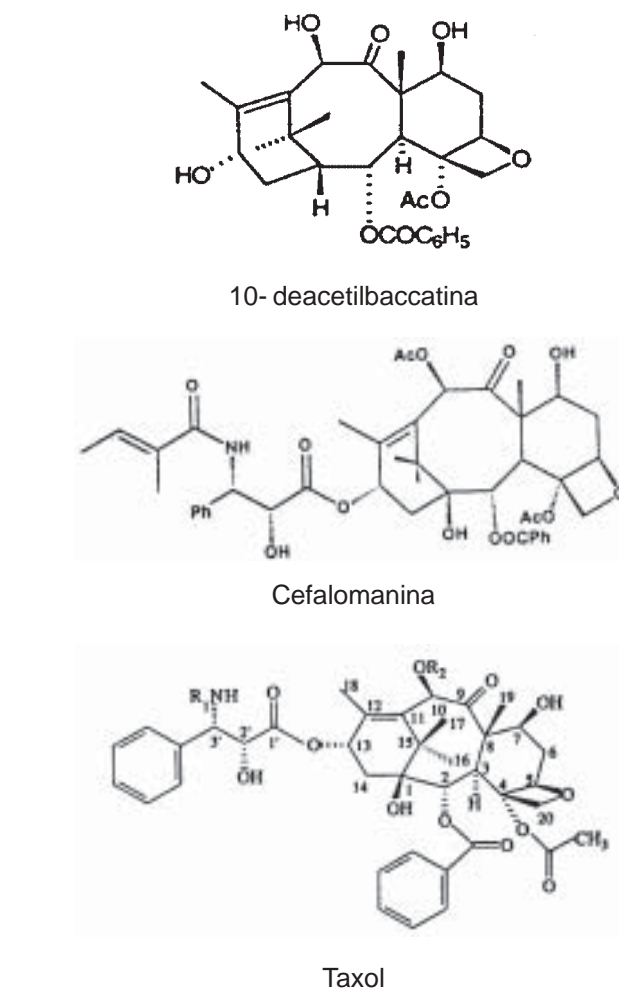


Figura 1. Estructuras químicas de algunos taxoides

Se realizaron tres muestreos en tres épocas del año (enero, mayo y octubre) en dos sitios diferentes. El primero con mayor exposición a los rayos solares (la Cañada del cuervo) y el segundo con menor exposición denominado como "Los Corrales". En cada sitio se seleccionaron al azar ocho árboles, de los cuales cuatro eran machos y cuatro hembras. Estos a la vez se agruparon por diámetro, correspondiendo dos árboles al diámetro comprendido entre 5 y 15 cm y dos entre 16 y 35 cm. De cada árbol se tomó aproximadamente 30 g de follaje verde, que se colocó en bolsas de plástico y se transportó a baja temperatura, en presencia de hielo, hasta el laboratorio donde se mantuvieron en refrigeración por 12 h, posteriormente se secaron a una temperatura de  $40^\circ \text{C}$ .

## Extracción de los taxoides

La extracción, separación y purificación de los taxoides de *Taxus globosa* se llevó a cabo según la técnica descrita por Kaufman *et al.* (1998).

De cada muestra de follaje seco de *Taxus* se tomaron 0.5 g y se molieron en un mortero con 2 ml de metanol frío;

el sobrenadante se colocó en un tubo para centrífuga. El mortero se lavó una vez con metanol hasta completar un volumen de 4 ml, el cual se centrifugó a  $4800 \times g$  por 30 minutos. Posteriormente, se separó el sobrenadante del tejido vegetal y se le agregó 3 ml de agua destilada (grado HPLC).

### Separación de los taxoides

El sobrenadante se pasó a través de un cartucho Catridge LiChrolut RP-18, Merck, se le efectuaron tres lavados: el primero con 3 ml de metanol al 35 %, el segundo con 3 ml de metanol al 55 % y el tercero con 2 ml de metanol al 65 %. El último lavado se colectó para cuantificar los taxoides que son solubles en esta proporción de metanol. Las muestras se filtraron a través membranas filtrantes de 0.45 mm (Whatman), se colocaron en viales.

### Cromatografía de líquidos de alta resolución

Las muestras del tejido vegetal se analizaron en un Cromatógrafo Agilent technologies modelo 1100 equipado con una bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos. Los estándares se analizaron usando el HP Chemstation software A05. Las separaciones se hicieron en fase reversa a  $15^{\circ}\text{C}$  en una columna Hypersil ODS C-18 de 5 mm ( $150 \times 4.6$  mm). La fase móvil consistió en agua/acetonitrilo 66:44 (v:v) a una velocidad de flujo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  y detección a 228 nm. Los cromatogramas de las muestras se compararon con la de los estándares para obtener los resultados. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Compuestos de referencia: taxol, cefalomanina se adquirieron de Sigma USA y deacetilbaccatina III fueron proporcionados por el Prof. D. Kingston de Virginia Polytechnic USA.

Los tiempos de retención de los estándares fueron: deacetilbaccatina III 2.35 min; cefalomanina 9.9 min y taxol 12.22 min.

### Análisis de datos

Los datos se analizaron con un diseño completamente al azar, el modelo estadístico empleando fue con cuatro criterios de clasificación con interacción. Donde los factores fueron sitio, clase en diámetro, sexo y época de colecta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que de las tres épocas de muestreo donde se encontró mayor concentración de compuestos fue en el mes de enero. En el sitio 1 de colecta con menor exposición a los rayos solares se observaron los valores más altos de 10-deacetilbaccatina ( $66.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), en el sitio 2 con mayor exposición se detectó

mayor concentración de cefalomanina ( $44.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y de taxol  $33 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de follaje seco, valor que es estadísticamente superior al registrado en el sitio con menor exposición, en donde solo se obtuvieron  $13.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de follaje seco.

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de taxoides por diferente grado de exposición al sol y en tres épocas de año.

Los resultados contrastan con los datos de Kelsey y Vance (1992) quienes evaluaron el efecto de la luz solar sobre la concentración de taxol y cefalomanina, ellos encontraron que no hubo diferencia en concentración de taxol en el follaje tanto para árboles sombreados como para los no sombreados, mientras que cuando estudiaron el taxol procedente de la corteza si encontraron efecto de sombra, de tal manera que en los árboles que estuvieron sombreados la concentración de taxol fue de 0.076 % y para los árboles expuestos al sol la cantidad de taxol obtenida fue de 0.042 %.

De los datos obtenidos para cefalomanina, sólo los de mayo y octubre coinciden con los de Kelsey y Vance (1992) quienes detectaron una mayor concentración de este taxoide en los árboles sombreados, ya que en el muestreo de enero los datos indican una mayor concentración para los árboles expuestos a los rayos solares. Es importante señalar que los rayos solares tienen influencia en el grosor de la corteza, así los expuestos al sol tienen la corteza 1.6 veces más gruesa que los expuestos a la sombra, Kelsey y Vance (1992). Estos autores señalaron que las diferencias en las cantidades de taxol comparadas con las obtenidas por Witherup *et al.* (1990) pueden deberse a varios factores, entre ellos el manejo postcosecha, el almacenaje, el procedimiento de extracción y al tipo de tejido.

**CUADRO 1. Contenido de taxoides ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de follaje seco) de *Taxus globosa* Schelecht. en dos sitios con diferente exposición a rayos solares, muestreado en tres épocas del año.**

| Época   | Taxano               | Exposición           |         | P>F |
|---------|----------------------|----------------------|---------|-----|
|         |                      | Menor                | Mayor   |     |
| Enero   | 10-Deacetilbaccatina | 66.00 a <sup>z</sup> | 0.00 b  | *** |
|         | Cefalomanina         | 28.40 b              | 44.20 a | *** |
|         | Taxol                | 13.40 b              | 33.00 a | *** |
| Mayo    | 10-Deacetilbaccatina | 63.80 a              | 21.20 b | *** |
|         | Cefalomanina         | 20.00 a              | 1.00 b  | **  |
|         | Taxol                | 0.00                 | 0.00    | -   |
| Octubre | 10-Deacetilbaccatina | 51.20 a              | 14.00 b | *** |
|         | Cefalomanina         | 8.60 a               | 0.40 b  | *** |
|         | Taxol                | 0.00                 | 0.00    | -   |

NS, \*, \*\*, \*\*\*: no significativo, significativo a una  $P \leq 0.05$ , 0.01, 0.001, respectivamente.

<sup>z</sup>Valores con la misma literal dentro de la hilera son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

También se observó que el sexo del árbol tuvo influencia sobre la concentración de taxoides, de tal manera que al estudiar el promedio para la 10- deacetilbaccatina observamos que hay un menor valor para hembras (29.7 mg·g<sup>-1</sup>) que para los machos (42.2 mg·g<sup>-1</sup>). De igual forma, en los árboles macho se obtuvo una mayor concentración de cefalomanina con valor de 24.7mg·g<sup>-1</sup> sobre 9.4 mg·g<sup>-1</sup> para los árboles hembra. En el caso del taxol sólo se registró en el mes de enero y los valores más altos fueron registrados en follaje de árboles hembra (Cuadro 2). En los muestreos de mayo y octubre no se detectó la presencia de taxol en ningún sexo.

**CUADRO 2. Contenido de taxoides (mg·g<sup>-1</sup> de follaje seco) de *Taxus globosa* Schelecht. analizados por sexo de árbol en tres épocas del año**

| Época   | Taxano               | Sexo                 |         | P>F |
|---------|----------------------|----------------------|---------|-----|
|         |                      | ♀                    | ♂       |     |
| Enero   | 10-Deacetilbaccatina | 12.20 b <sup>z</sup> | 53.60 a | *** |
|         | Cefalomanina         | 19.80 b              | 52.80 a | *** |
|         | Taxol                | 26.80 a              | 19.60 b | *** |
| Mayo    | 10-Deacetilbaccatina | 51.20 a              | 33.60 b | **  |
|         | Cefalomanina         | 5.40 a               | 15.40 a | NS  |
|         | Taxol                | 0.00                 | 0.00    | -   |
| Octubre | 10-Deacetilbaccatina | 25.80 a              | 39.40 a | NS  |
|         | Cefalomanina         | 3.00 a               | 6.00 a  | NS  |
|         | Taxol                | 0.00                 | 0.00    | -   |

NS, \*, \*\*\*, no significativo, significativo a una P≤0.05, 0.01, 0.001, respectivamente.

<sup>z</sup>Valores con la misma literal dentro de la hilera son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una P≤0.05.

Por otra parte en la variable clase en diámetro se observó que en aquella de 16 a 35 cm presentó una mayor presencia de 10- deacetilbaccatina (Cuadro 3), tanto en el muestreo de enero como en el de mayo con valores diferentes (P<0.05). En el muestreo realizado en octubre la 10-deacetilbaccatina está presente en mayor cantidad en la clase diamétrica de 5 a 15 cm. Para la cefalomanina sólo se encontró diferencia en el muestreo realizado en enero (P<0.05), mientras que en mayo y octubre no hubo diferencia. El taxol sólo se detectó en el muestreo realizado en enero y el valor más alto fue para la clase de 16 a 35 cm con 42.4 mg·g<sup>-1</sup> de follaje seco.

Fang *et al.* (1993) estudiaron la concentración de taxol, cefalomanina, 10-deacetiltaxol, 10-deacetilcefalomanina en corteza de tallo, corteza de raíz, raíz fibrosa, ramitas y follaje de *Taxus cuspidata* en árboles de 8 y 15 años de edad; concluyeron que el taxol y sus análogos varían en las diferentes partes de la planta. Ellos encontraron que los compuestos son más abundantes en la corteza del tallo que en cualquier otra parte de la planta y que el contenido de taxoides en la corteza de la raíz es muy similar a la que se encuentra en la corteza del tallo. También encontraron

que el contenido de taxoides está relacionado con la edad de las plantas, de tal manera que a mayor edad hay una mayor concentración de metabolitos. Aunque en este estudio no se evaluó la edad de los árboles, sólo dos clases en diámetro, se puede inferir que los datos son congruentes con los obtenidos por Fang *et al.* (1993).

**CUADRO 3. Contenido de taxoides (mg·g<sup>-1</sup> de follaje seco) de *Taxus globosa* Schelencht. analizados por clase en diámetro en tres épocas del año**

| Época   | Taxano               | Clase de diámetro (cm) |         | P>F |
|---------|----------------------|------------------------|---------|-----|
|         |                      | 5 a 15                 | 16 a 35 |     |
| Enero   | 10-Deacetilbaccatina | 24.00 b <sup>z</sup>   | 41.80 a | **  |
|         | Cefalomanina         | 15.60 b                | 57.00 a | *** |
|         | Taxol                | 4.00 b                 | 42.40 a | *** |
| Mayo    | 10-Deacetilbaccatina | 30.80 b                | 54.00 a | *** |
|         | Cefalomanina         | 10.00 a                | 11.00 a | NS  |
|         | Taxol                | 0.00                   | 0.00    | -   |
| Octubre | 10-Deacetilbaccatina | 48.60 a                | 16.60 b | *** |
|         | Cefalomanina         | 5.00 a                 | 4.00 a  | NS  |
|         | Taxol                | 0.00                   | 0.00    | -   |

NS, \*, \*\*\*, no significativo, significativo a una P≤0.05, 0.01, 0.001, respectivamente.

<sup>z</sup>Valores con la misma literal dentro de la hilera son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una P≤0.05.

## CONCLUSIONES

Se estandarizó una metodología por cromatografía de líquidos para el análisis de taxol y sus análogos (10-deacetilbaccatina y cefalomanina).

En la clase diamétrica de 16 a 35 cm se encontró mayor proporción de los tres compuestos.

De las tres fechas de recolecta donde se encontró mayor concentración de compuestos identificados fue en enero.

Los árboles macho mostraron mayor concentración de estos compuestos en comparación con los árboles hembra.

El material que se colectó en el sitio con menor exposición a los rayos solares mostró mayor concentración de 10-deacetilbaccatina en los tres muestreos realizados. Para cefalomanina y taxol la cantidad mayor se detectó en el sitio con mayor exposición.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para realizar esta investigación bajo el proyecto "Análisis de taxoides en

el follaje de *Taxus globosa* Schelecht. por cromatografía de líquidos (HPLC)”, Proyecto KO 128-B.

### LITERATURA CITADA

- FANG, W.; WU, Y.; ZHOU, J.; CHENY, W.; FANG, Q. 1993. Qualitative and quantitative determination of taxol and related compounds in *Taxus* Sieb. et Zucc. *Phytochemical Analysis* 4: 115-119.
- GARCÍA, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones climáticas de la República Mexicana). Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México. 217 p.
- HARTZELL, H. Jr. 1991. The Yew Tree. A Thousand Whispers. Hulogosi, Oregon, USA. pp. 57-73
- HERRERA, A. R. 1998. Metabolitos secundarios del tejo mexicano (*Taxus globosa* Schelecht). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México. 98 p.
- KAUFMAN, P.B.; CSEKE, L. J.; OKUBO, A. 1998. Bioseparation of compounds, pp 228-225. *In*: Natural Products From Plants.
- Kaufman P. B.; Cseke, L.J.; Warber, S.; Duke, J. A.; Brielmann H.L. (eds). CRC Press Boca Ratón Florida, USA.
- KELSEY, R. G.; VANCE, N. 1992. Taxol and cephalomanine concentrations in the foliage and bark of shade- grown and sun-exposed *Taxus brevifolia* trees. *Journal of Natural Products* 7: 912-917.
- SOTO, M.; SANJURJÓ, M.; GONZÁLEZ, M. T.; CRUZ, D.; GIRAL, F. 2001. Taxol from the Mexican Yew (*Taxus globosa* Schelecht). *Ciencia Ergosum* 7(3): 277-279.
- THEODORIDIS, G.; VERPOORTE, R. 1996. Taxol analysis by high performance liquid chromatography: a review *Phytochemical Analysis* 7:169-184.
- WHITHERUP, K. M.; LOOK, S.A.; STASKO, M.W.; GHIORZI, T. J.; MUSCHICK, G. M. 1990. *Taxus* spp needles contain amounts of taxol comparable the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation *Journal Natural Products* 53(5): 1249-1255.
- WANI, M. C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T. 1971. Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* trees. *Journal American Chemical Society* 93: 2357.