

Recibido: 07/19/2015  
Aprobado: 28/04/2016**Generalidades del fármaco Taxol: una revisión sistemática***Taxol generalities : a systematic review*

Hebert Jair Barrales-Cureño<sup>1\*</sup>,  
 Angélica Farrera Roa<sup>2</sup>,  
 César Reyes Reyes<sup>1</sup>,  
 Itzia Yamiri Hernández Flores<sup>1</sup>,  
 Edgar García Arzate<sup>1</sup>,  
 Salvador Chávez Salinas<sup>1</sup>

**RESUMEN**

La biosíntesis del taxol tiene lugar en la familia Taxaceae, una familia de coníferas del orden Cupressales, que incluye especies de *Taxus* de todo el mundo. La biomasa de las especies de *Taxus* contiene diferentes compuestos tales como los isoprenoides, flavonoides, fenilpropanoides y derivados del fenol. El taxol y compuestos análogos se utilizan para tratar el cáncer de seno, cabeza, cuello, pulmón y ovarios. Actualmente las ventas anuales de este medicamento, comercializado con el nombre de Taxol por Bristol-Myers Squibb, se calculan en 1,600 millones de dólares. Uno de los problemas más difíciles para la producción del taxol se debe a las bajas concentraciones que se encuentran en las subespecies de *Taxus*. Estos problemas pueden ser resueltos mediante cuatro métodos alternativos para obtener el taxol sin afectar a los bosques: síntesis total, semisíntesis a partir de su precursor natural, producción de taxol por hongos o bacterias y cultivo *in vitro* de callos, células vegetales u órganos tales como el tallo, estróbilos y raíces, ya sea por sistemas de inmersión temporal o mediante el uso de biorreactores. Los principales objetivos de este artículo de revisión científica son: conceptualizar el significado de los taxoides y su importancia en el área de la oncología humana; definir el mecanismo de acción biológico-específico del taxol; las ventajas y desventajas de los métodos biotecnológicos alternativos utilizados en la producción del taxol tales como: la síntesis química total, la semisíntesis orgánica y mediante el cultivo *in vitro* de protoplastos; así como la producción de

1 División de Ingeniería en Biotecnología,  
 Universidad Politécnica del Valle de Toluca.

2 Departamento de Ingeniería Bioquímica,  
 Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

\*Autor de Correspondencia: Correo electrónico: [barrales.hebert@colpos.mx](mailto:barrales.hebert@colpos.mx)

la enzima taxadieno sintasa mediante ingeniería genética en microorganismos; finalmente se menciona la biosíntesis del taxol junto con sus compuestos análogos.

Palabras clave: Taxol, cáncer, semisíntesis de Holton, citotoxicidad.

## ABSTRACT

Taxol biosynthesis takes place in the Taxaceae family, a family of the order Cupressales conifers, including *Taxus* species from all over the world. The biomass of *Taxus* species containing different compounds such as isoprenoids, flavonoids, phenylpropanoids and derivatives of phenol. Taxol and analogues are used to treat breast cancer, head, neck, lung and ovarian, among others. Currently, the annual sales of this drug, sold under the name Taxol by Bristol-Myers Squibb, are estimated at 1,600 million dollars. One of the most difficult problems for the production of taxol is due to the low concentrations found in *Taxus* subspecies. These problems can be solved by four alternative methods for taxol without affecting forests: total synthesis, semi-synthesis from natural precursor of taxol production by fungi or bacteria and *in vitro* callus culture, plant cells or organs. The main objectives of this scientific review article are: conceptualize the meaning of the taxoids and its importance in the area of human oncology; define the mechanism-specific biological action of taxol; the advantages and disadvantages of alternative biotechnological methods used in the production of taxol such as total chemical synthesis, semi-organic synthesis and by *in vitro* protoplast culture;

and the production of taxadiene synthase enzyme genetically engineered microorganisms; taxol biosynthesis finally with their analogous compounds mentioned.

**Key words:** Taxol, cancer, Holton semisynthesis, cytotoxicity.

**INTRODUCCIÓN.** La biosíntesis del taxol tiene lugar en la familia Taxaceae, en la que se incluyen 24 especies y 55 variedades. Conocida comúnmente como Tejo, es una planta gimnosperma que incluye especies de *Taxus* alrededor del mundo (entre las principales destacan: *T. brevifolia* de Norteamérica; *T. baccata* de Europa; *T. x media*, *T. cuspidata* y *T. chinensis* de Asia, *T. canadensis* de Canadá, *T. globosa* de México y dos híbridos reconocidos: *Taxus x media* como resultado del cruzamiento entre *T. baccata* y *T. cuspidata* y *Taxus x hunnewelliana* del cruzamiento entre *T. cuspidata* y *T. canadensis*).

Aproximadamente más de 400 taxoides han sido aislados de *Taxus* spp., de los cuales cerca de 120 se han extraído tan sólo a partir del tejo japonés, *T. cuspidata* (Kobayashi & Shigematsu, 2004). La biomasa (hojas, ramas, corteza y raíces) de todas las especies de *Taxus* contiene diferentes compuestos divididos en grupos tales como los isoprenoides, flavonoides, fenilpropanoides y derivados del fenol. Los taxoides son protoalcaloides diterpénicos, componente molecular clave y específico de las especies de *Taxus*, que incluyen tanto al taxol como a compuestos análogos (Altstadt et al., 2001). La estructura química del taxol contiene un núcleo de taxano, cuatro anillos

de oxetano en las posiciones C-4 y C-5, y una cadena lateral de N-benzoil-3-fenilisoserina en la posición C-13. El taxol es un polvo cristalino blanco, altamente lipófilo, insoluble en agua, soluble en algunos disolventes orgánicos como el alcohol etílico, metanol, cloroformo y sulfóxido de dimetilo; se funde alrededor de 216 hasta 217 °C. La fórmula empírica del taxol es  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , tiene un peso molecular de 853,91 g/mol, y una densidad de 0.2 g/cm. El taxol está aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (US Food and Drug Administration) como agente quimioterapéutico potente que se utiliza para tratar una amplia variedad de cánceres humanos que el cáncer de seno, pulmón y ovario, (Barrales & Soto, 2011). El problema más difícil para la producción del taxol se debe tanto a los mínimos contenidos encontrados en la corteza de las especies de *Taxus*, por ejemplo, *T. brevifolia* contiene aproximadamente de 0,01 a 0,05% de peso seco, como al lento crecimiento de los árboles de tejo. Estos problemas se pueden resolver parcialmente mediante el aislamiento de taxol y sus precursores a partir de las ramas y hojas jóvenes en lugar de la corteza (Fu et al., 2008; Li et al., 2009), ya que son recursos renovables con una biomasa mayor que la de la corteza. Además, los taxoides 10 diacetil baccatina III, cefalomanina, entre otros, se obtienen de las agujas que se utilizan para la producción de taxol a través de la semisíntesis (Ballero et al., 2003; Barrales et al., 2009). En general, se han estudiado las especies de *Taxus* por investigadores en áreas de la química y bioquímica (Wani, Taylor, Wall, Coggon & McPhail, 1971), biología vegetal y biotecnología (Yukimune, Tabata, Higashi &

Hara, 1996), genética y genómica (Trapp & Croteau, 2001), farmacología y farmacia (Ojima et al., 1999), microbiología (Stierle, Strobel & Stierle, 1993) y toxicología (Brown & Hull, 1951). Actualmente existen cuatro métodos alternativos para obtener el taxol sin afectar a los bosques: 1. síntesis total, 2. semisíntesis a partir de su precursor natural, 3. producción por hongos o bacterias y 4. cultivo de células vegetales. La síntesis total de los taxoides es costosa, presenta bajos rendimientos y además no es una buena alternativa para su obtención comercial, sin embargo, hasta el presente, la semisíntesis es el modo principal de producción industrial para la producción de taxol y otros taxoides análogos (Commerco, Bourzat, Didier & Lavelle, 1995). El taxol también es producido por hongos endófitos que crecen y se desarrollan junto al tejo, pero a concentraciones mucho más bajas, por ejemplo, *Taxomyces andreanae*. Un dato importante, es el de la producción de 418  $\mu\text{g L}^{-1}$  de taxol, en una cepa mutada del hongo *N. silviforme*, aislado de *T. cuspidata* (Zhou et al., 2005), que comparado con la producción de taxol del primer hongo aislado por Stierle et al., 1993 (*T. andreanae*) es 15,000 veces mayor. La producción de cultivos *in vitro* de callos (Barrales et al., 2011) y células en suspensión de *Taxus*, y el aislamiento de taxol y compuestos relacionados de tales cultivos se ha descrito por autores (Fett-Neto, Dicosmo, Reynolds & Sakata, 1992).

La proporción de los taxoides comunes varía de acuerdo con la especie o variedad de cultivo de tejo probada. Algunas investigaciones han demostrado que el contenido de taxol disminuye cuando el tamaño de los agregados celulares

aumenta o viceversa (Kolewe, Gaurav & Roberts, 2008). Las estrategias de elicitation mediante elicidores bióticos o abióticos para la estimulación y producción del taxol y compuestos análogos es una alternativa eficiente y factible en sistemas *in vitro*. Actualmente, el taxol se manufactura en los laboratorios Bristol-Myers Squibb en un proceso de semisíntesis de nueve pasos a partir del precursor 10-DAB, originalmente se aisló y purificó de especies como *T. baccata* en un proceso de multipasos. La corporación Aphios también manufactura taxol, utilizando un proceso de cuatro pasos mediante un costo factible y ambientalmente amigable (Kewal, 2013).

Este proceso produce 10-diacetil baccatina III, un precursor de los taxoides y la cefalomanina como subproducto, que pueden ser semi-sintéticamente transformados a taxol en un proceso de tres pasos. Aunque la semisíntesis es eficiente, la purificación de los precursores a partir de los tejidos vegetales es difícil. Por otro lado, el aislamiento del taxol en cultivos de células de *Taxus* requiere menos pasos que la purificación del tejido intacto (Barrales et al., 2015). Por lo tanto, los cultivos celulares pueden producir un rango de taxol y taxoides análogos que pueden proveer una alternativa biotecnológica viable, para el conocimiento de la bioquímica, enzimología y biología molecular de la biosíntesis de los taxoides (Zhong, 2002).

### **Mecanismo biológico y actividad anti-cáncer del taxol**

Clínicamente, el cáncer es el nombre de un gran conjunto de enfermedades, varía en: la

edad de comienzo, tasa de crecimiento celular, estado de diferenciación celular, porcentaje de detectabilidad del diagnóstico (biopsia, microscopia), invasión, potencial metastásico, respuesta al tratamiento y pronóstico. El cáncer ocurre cuando las células continúan dividiéndose al formar nuevas células sin ningún control, ni orden. Normalmente, las células se dividen cuando el cuerpo las necesita, si se dividen cuando no se necesitan, se forma una masa de exceso de tejido, llamada tumor (Barrales & De la Rosa, 2012). Los tumores pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Las células de los tumores malignos pueden dañar e invadir tejidos y órganos cercanos. Las células cancerosas pueden también desprenderse del tumor maligno y viajar a través del torrente sanguíneo para formar nuevos tumores en otras partes del cuerpo, proceso denominado metástasis. El taxol se utiliza comúnmente como uno de los agentes antimitóticos más potentes para una gran variedad de tumores cancerosos en: seno, pulmón, ovario, linfoma, esófago, vejiga, endometrio, cuello del útero, cáncer de cabeza y cuello (Woo, Miao, Pelayo & Woolf, 1994).

Varios estudios reportan el uso del taxol para tratar otras enfermedades como las disfunciones renales y la artritis reumatoide (Arsenaulta, Lhotáka, Hunter, Banquerigoc & Brahn, 1998). El mecanismo de acción del taxol involucra la unión en la  $\beta$ -subunidad de la tubulina, al promover la polimerización de la tubulina e inhibir la despolimerización o el desensamblamiento de los microtúbulos (Xiao, Verdier-Pinard, Fernández-Fuentes, Burd, 2006).

El taxol en concentraciones subnanomolares bloquea la mitosis e inhibe la proliferación

Hebert Jair Barrales-Cureño, Angélica Farrera Roa, César Reyes Reyes,  
Itzia Yamiri Hernández Flores, Edgar García Arzate, Salvador Chávez Salinas

celular. La determinación de la conformación del complejo microtúbulo-taxol se complica ante la imposibilidad de cristalizar microtúbulos (Lowe, Downing & Nogales, 2001). Aunque se ha determinado la estructura del dímero de  $\alpha/\beta$  tubulina mediante difracción de rayos X a una resolución de 3,5 Å a partir de láminas de tubulina inducidas por zinc y estabilizadas con taxol (Lowe, Downing & Nogales, 2001). El heterodímero de  $\alpha/\beta$  tubulina es la unidad básica que compone los microtúbulos. La tubulina es una proteína altamente conservada entre todos los organismos eucariotas. Cada monómero de tubulina tiene unos 450 aminoácidos y un nucleótido de guanina; existen muchos isotipos de cada uno y ambos son susceptibles de sufrir multitud de modificaciones postraduccionales. La estructura de cada monómero consiste en un núcleo de dos láminas  $\beta$  rodeadas de hélices  $\alpha$  y se divide en tres dominios funcionales: el dominio amino terminal que contiene la región de unión a nucleótido con un plegamiento tipo Rossmann, común en las proteínas que unen nucleótidos, formado por seis cadenas  $\beta$  paralelas alternando seis hélices  $\alpha$ , un dominio intermedio que comprende el sitio de unión a taxol y contiene cuatro cadenas  $\beta$  y tres hélices  $\alpha$  y un dominio carboxilo terminal que consta de dos hélices antiparalelas y forma parte de la cara externa del microtúbulo siendo, probablemente, la zona de unión de las proteínas motoras y las proteínas asociadas a microtúbulos (Downing & Nogales, 1999). Los farmacóforos responsables de la unión de la tubulina son el excepcional anillo de oxetano, el benzoato en C2, el acetato en C4, y la cadena lateral de benzoilfenilisoserina en N-C13 (Downing & Nogales, 1999).

El taxol inhibe la despolimerización de los microtúbulos debido a que interfiere con los contactos laterales entre los protofilamentos, desde que interactúa con la N-terminal final y el bucle M, el cual se involucra en interacciones laterales con los microtúbulos. Por otro lado, el taxol induce la hiperfosforilación de Bcl-2 (una proteína antiapoptótica) para promover la apoptosis. La activación de enzimas que controlan el ciclo celular, por ejemplo, la quinasa cdc2 (control-2 de la división celular) y la inducción de TNF- $\alpha$ , una citocina que se caracteriza por ser citotóxica en células cancerosas, que también contribuyen a la apoptosis. Además, el taxol inhibe la actividad de la arilamina de la N-acetiltransferasa (NAT) y su expresión génica. Esto afecta el proceso mitótico normal y eventualmente resulta en muerte celular (Schrijvers & Vermorken, 2000).

### Síntesis química total del taxol

La complejidad molecular del taxol ha cautivado a los químicos sintéticos desde el informe de su dilucidación estructural en el año 1971. El taxol es un diterpeno perteneciente a la clase de productos naturales, que se distingue por presentar un sistema de anillos tricíclicos 6-8-6 altamente oxigenados con una distintiva cadena lateral del grupo éster. Del total de los once centros quirales presentes en el esqueleto molecular del taxol, el anillo de seis miembros que lleva un grupo funcional oxetano contiene cinco centros quirales contiguos. Seis síntesis químicas totales independientes para producir taxol se han llevado a cabo (Kingston, 2001). Las dos primeras síntesis, que se publicaron en 1994,

fueron de los laboratorios Nicolaou (Nicolaou et al., 1994) y Holton (Holton et al., 1994), con rendimientos de producción de 0,07 y 2,7%, respectivamente. Poco después, en 1995, el grupo de Danishefsky informó sobre su síntesis (Masters, Link, Snyder, Young & Danishefsky, 1995), seguido por los grupos de Wender en 1997 (Wender et al., 1997); Kuwajima en 1998 (Morihira et al., 1998); Mukaiyama en 1999 (Mukaiyama et al., 1999).

La Figura 1 muestra el número de pasos necesarios para la obtención del producto natural taxol a partir de los materiales de partida respectivos elegidos por cada grupo. Hasta la fecha, la síntesis de taxol de Wender es un método corto y eficiente, de tan sólo 37 pasos, en el cual se obtiene un rendimiento global de 0.4% a partir de la verbenona (Wender et al., 1997). De hecho, es notablemente considerable que una molécula tan compleja como el taxol se pueda sintetizar en tan sólo 37 pasos químicos (una hazaña que difícilmente hubiera sido imposible tan sólo quince años antes). Por otra parte, se puede argumentar que existe, sólo un pequeño grupo de laboratorios en todo el mundo con los recursos, la capacidad y la habilidad para sintetizar esta compleja molécula.

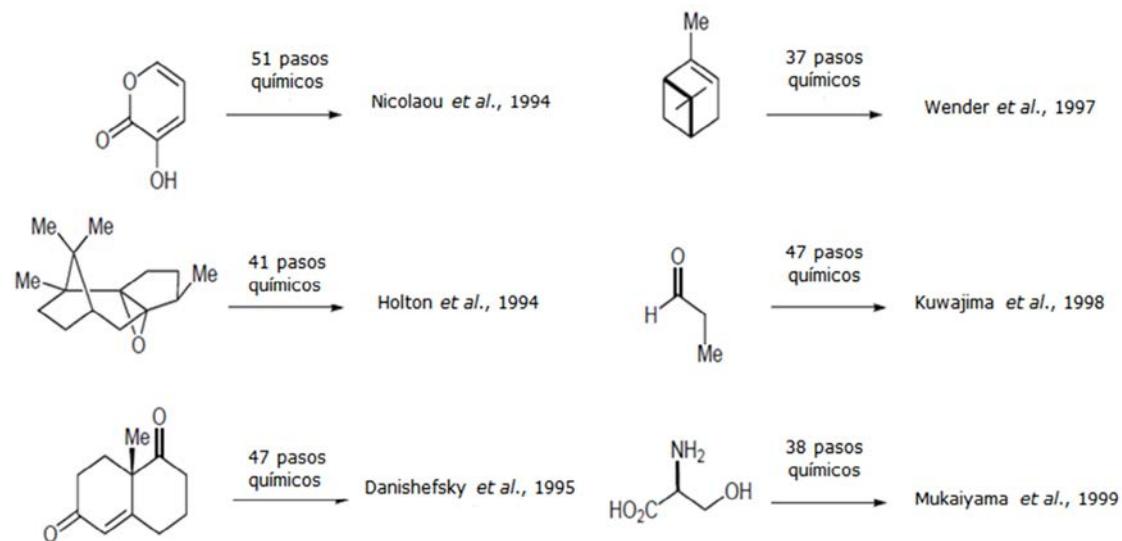


Figura 1. Principales síntesis químicas del fármaco taxol (Modificado de Wender et al., 1997).

Hebert Jair Barrales-Cureño, Angélica Farrera Roa, César Reyes Reyes,  
Itzia Yamiri Hernández Flores, Edgar García Arzate, Salvador Chávez Salinas

Sin embargo, también se debe reconocer que la síntesis más eficiente lograda hasta la fecha aún no puede emplearse para suministrar elevadas cantidades de taxol a una escala adecuada para proporcionar una terapia global (0,4 % de rendimiento sería prohibitivo en relación con el costo de los bienes y fabricación), debido a que se requieren al menos 2 g de taxol para un completo régimen de tratamiento antitumoral durante varios meses en un paciente enfermo de cáncer (Morihira et al., 1998; Mukaiyama et al., 1999; Xiong, Yang, Zhao & Wang, 2013). Por otra parte, el taxol no es de ninguna manera un producto único en este aspecto en cuanto a rendimientos. De hecho, el número total de agentes medicinales aislados de forma natural (en todas las áreas terapéuticas) que se han producido a gran escala mediante la síntesis total es menor a cuatro, esto es una estadística impactante que parece contradecir fuertemente la noción generalizada de que la síntesis total debe ser un “campo maduro”.

### Semisíntesis orgánica del taxol

En 1998, Patel *et al.*, reportaron la semisíntesis del taxol a partir de 10-diacetil baccatina III, obtenida de hojas de árboles de *T. brevifolia*, y en ese mismo año, la compañía BMS (Nueva York), comercializó la producción de taxol por este método (Patel, 1998). El método semisintético de Holton es actualmente una de las rutas comercialmente viables para la producción de taxol (Figura 2).

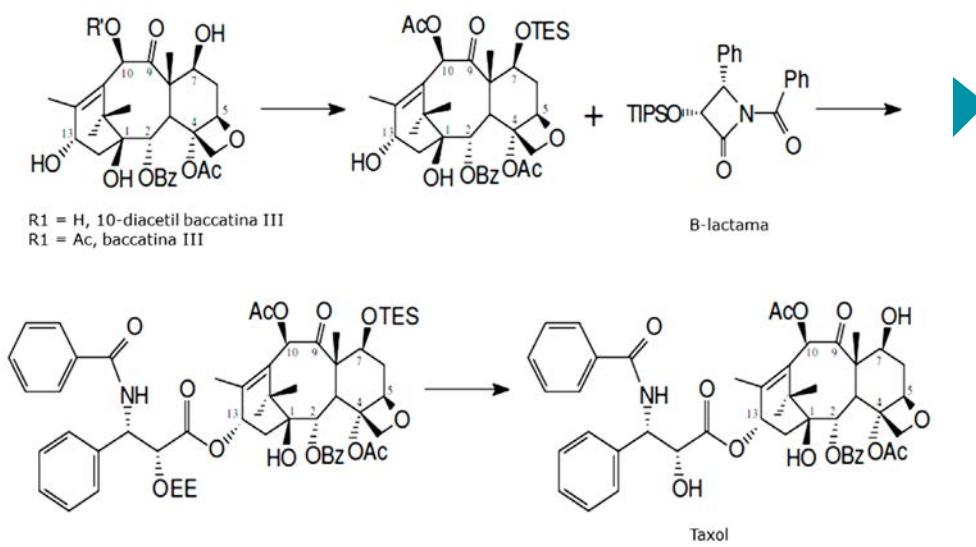


Figura 2. Esquema de la semisíntesis de Holton del fármaco taxol mediante 10-diacetil baccatina III y el precursor sintético beta-lactama de la cadena lateral de N-benzoilfenilisoserina. TIPS: triisopropilsilil; TES: trietilsilil; EE: etoxietilo. (Modificado de Patel, 1998).

Sin embargo, este método tiene ciertas limitaciones porque la extracción de los precursores del material vegetal dependen de la variación significativa en su contenido de taxoides a causa de factores epigenéticos y ambientales. Además, como ya se ha señalado es limitado por el crecimiento lento de los tejos y por la purificación difícil y costosa de los precursores, a partir del tejido vegetal, dado las abundantes resinas fenólicas y lípidos que se encuentran en los árboles. Tanto el taxol como su análogo el taxotere, se han producido semi-sintéticamente a través de la acilación de 10-deacetilbaccatina III, pero conlleva bajos rendimientos de producción y efectos secundarios irreversibles e indeseables en pacientes con cáncer debido al compuesto (Barrales & Soto, 2012; Zu et al., 2006).

### Producción de taxol a través de cultivos de protoplastos

Se han aislado protoplastos (células sin pared celular) viables a partir de callos de veinte días de edad de *T. yunnanensis*. Estos protoplastos se cultivaron y mantuvieron en medio B5 con vitaminas, suplementado con 0,45 M de fructosa, 3,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (Luo, Mu & Gu, 1999). Los protoplastos derivados de tales colonias variaron en términos de crecimiento y producción de taxol. Aunque estas colonias no fueron promisorias para la producción de taxol, proveen una fuente importante para obtener futuras líneas celulares con alta producción de taxol después de la mutagénesis. Aoyagi reportó seis veces más acumulación de taxol en cultivo de protoplastos de *T. cuspidata* después de la inmovilización en gel de agarosa en cultivos de

matraces, comparado con los cultivos celulares (Aoyagi, DiCosmo & Tanaka, 2002), siendo una alternativa biotecnológica promisoria para la producción de taxoides.

### Biosíntesis del taxol y compuestos análogos

La ruta de la biosíntesis del taxol aún no está dilucidada completamente (Mustafa, Yinghua, Robert, Rodney & David, 2011; Hezari, Lewis & Croteau, 1995; Han et al., 1994; Huang, Huang, Wildung, Croteau & Scott, 1998; Huang, Roessner, Croteau & Scott, 2001). Existen más de 400 estructuras de taxoides que se conocen por tener propiedades farmacológicas (Baloglu & Kingston, 1999; Itokawa, 2003). Estos compuestos pueden desempeñar un papel importante en la defensa del árbol (Daniewski et al., 1998), como antibióticos (Young, Michelotti, Swindell & Krauss, 1992) o toxinas para disuadir a los mamíferos herbívoros (Ogden, 1988). El núcleo de taxano se forma a través de la ruta plastidial de 2-C-metil-D-eritritol 4 fosfato (MEP) (Eisenreich, Menhard, Hylands, Zenk y Bacher, 1996), en la que el isopentenil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP), precursores universales de todos los terpenos (Rohmer, 1999), se construyen a partir de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato a través del intermediario 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) (Eisenreich, Rohdich & Bacher, 2001; Kuzuyama & Seto, 2003; Koepp et al., 1995).

Hebert Jair Barrales-Cureño, Angélica Farrera Roa, César Reyes Reyes,  
Itzia Yamiri Hernández Flores, Edgar García Arzate, Salvador Chávez Salinas

La etapa inicial de la secuencia de biosíntesis del taxol (paclitaxel) y taxoides relacionados (Figura 3) es una etapa lenta que inicia con la ciclización del geranilgeranildifosfato, un producto intermedio de tipo isoprenoide ubicuo, catalizada por la enzima taxadieno sintasa, una diterpeno ciclasa. El producto de esta reacción es la olefina original con un esqueleto de taxano, taxa-4(5),11(12)-dieno. El esqueleto tricíclico del taxadieno se modifica por varias citocromo P450 monooxigenasas y aciltransferasas para producir taxol u otros compuestos taxoides, siendo esencial para comprender la regulación de la ruta biosintética e incrementar el flujo hacia los compuestos deseados (Ketchum et al., 2003). Después de la ciclización inicial del geranilgeranil difosfato, existen muchos puntos de ramificación que dan lugar a una gran diversidad de estructuras de taxoides, por ejemplo, 14 $\beta$ -hidroxi-taxoides y derivados del 13-acetilo. La formación del esqueleto taxa-4(5),11(12)-dieno continua con una secuencia de ocho reacciones de hidroxilación que requieren oxígeno (Eisenreich et al., 1998). Esto indica que las reacciones se catalizan por enzimas citocromo P450-monooxigenasas, típico de muchas reacciones de monooxigenación de las vías metabólicas secundarias (Schuler, 1996). También se propuso el orden de las hidroxilaciones en C5 y C10, seguido por C2 y C9, a continuación C13 y C7 y finalmente en C1, basado en el patrón de hidroxilaciones de taxoides conocidos aisladamente (Floss & Mocek, 1995). Tres de estos grupos hidroxilo están además acilados, y se incluyen dos acetilaciones y una benzoilación, aunque hasta el momento estas reacciones no están completamente dilucidadas (Walker, Fujisaki, Long & Croteau, 2002).

Las estructuras complejas de taxoides, tales como bacatina III, requieren de una mayor oxidación del grupo hidroxilo en C9 y la posterior formación del anillo de oxetano en C4, C5. Los últimos pasos implican la unión de una cadena lateral de  $\beta$ -fenilalanoil en C13 seguido de 2'-hidroxilación y N-benzoilación. Reacciones relacionadas unen el N-tigloilo y N-hexanoilo en cefalomanina y taxol C, respectivamente (Baloglu & Kingston, 1999), siendo estas las principales etapas de la ruta de biosíntesis. La molécula de taxol ha sufrido varias modificaciones químicas con el propósito de estudiar la relación existente entre su estructura y su actividad biológica (Gueritte-Voeglein, Guenard & Potier, 1987; Wildung & Croteau, 1996; Croteau & Ketchum, 2006).

Las posiciones oxigenadas alrededor de su sistema de anillos (carbonos 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10 y 13) han sido uno de los objetivos favoritos (Kingston & Newman, 2007). La pérdida del grupo hidroxilo en C-7 no tiene efectos sustanciales en la citotoxicidad del fármaco (Chaudhary & Kingston, 1993; Chen et al., 1993). De igual forma la diacetilación en C-10 no supone una diferencia evidente en la toxicidad (Chaudhary & Kingston, 1993; Chen et al., 1993). Sin embargo el cambio del acetilo en C-4 tanto por un hidroxilo (Neidigh et al., 1994) como por un hidrógeno (Chordia, Chaudhary, Kingston, Qing & Hamel, 1994) da lugar a moléculas menos activas. El efecto de la inclusión de sustituyentes en el anillo benzoilo del carbono 2 depende de la posición en la que estos sustituyentes se encuentren de manera que, por ejemplo, el compuesto que presenta un grupo azida en

posición para es prácticamente inactivo, mientras que esta sustitución en posición meta da lugar a una molécula unas seis veces más citotóxica que el taxol (Chaudhary et al., 1994). Al igual que la cadena lateral de C-2 la de C-13 admite ciertas modificaciones pero su presencia es esencial para la actividad biológica de la molécula (Kingston, Bane & Snyder, 2005).

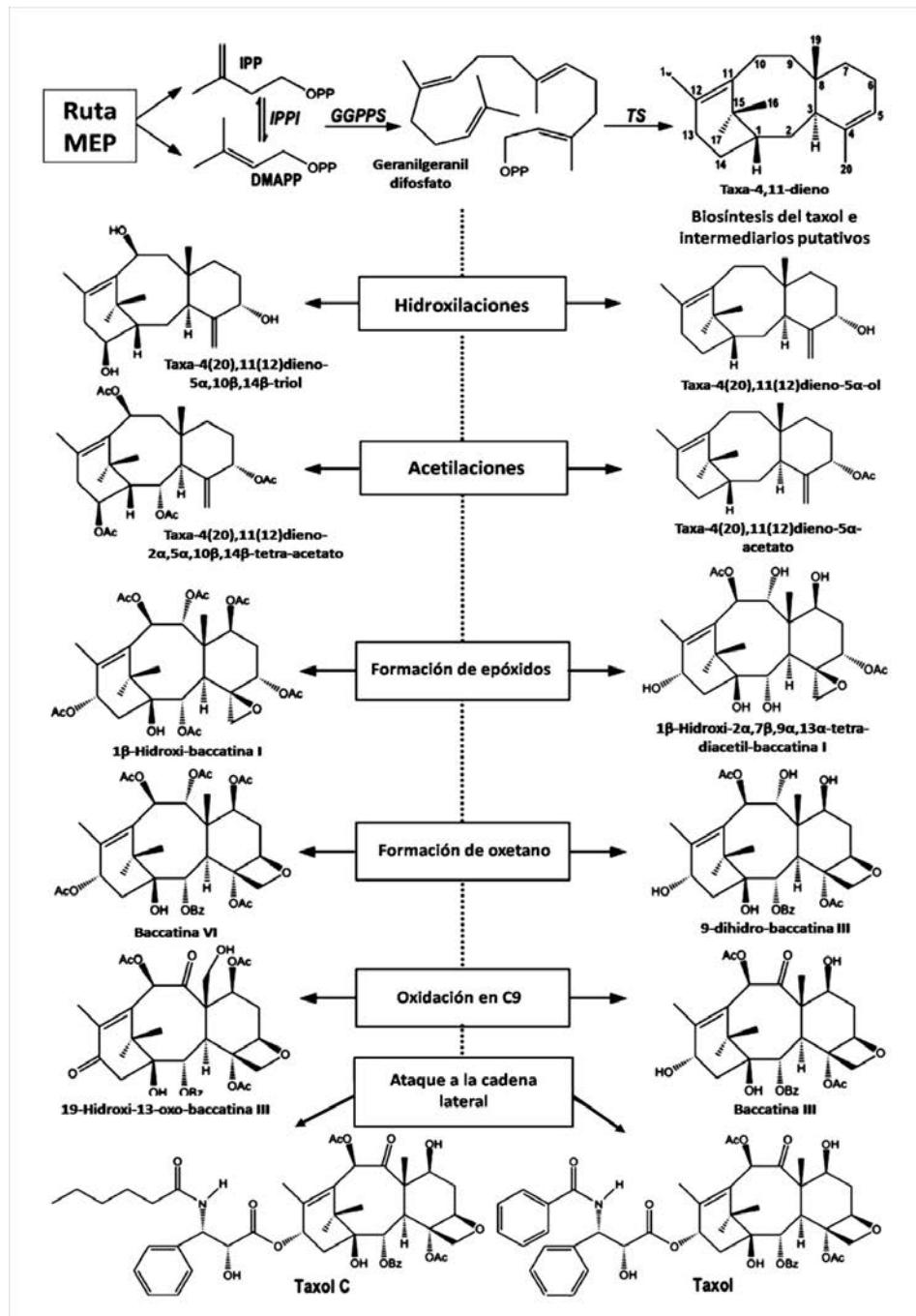


Figura 3. Ruta de biosíntesis del fármaco taxol (Modificado de Barrales, Chávez y Reyes, 2015).

Hebert Jair Barrales-Cureño, Angélica Farrera Roa, César Reyes Reyes,  
Itzia Yamiri Hernández Flores, Edgar García Arzate, Salvador Chávez Salinas

## Forma farmacéutica y dosis.

El taxol presenta solubilidad acuosa baja, disolviéndose en agua a 25 °C en una concentración de 0.55-0.59 µg/mL. La molécula del taxol es sensible a la luz y el pH, y durante su descomposición se forman productos biológicamente inactivos. El taxol se administra en forma inyectable vía intravenosa y en la formulación se utiliza un vehículo para drogas insolubles en agua, compuesto por partes iguales de Cremofor (aceite de ricino polioxietilado) y etanol deshidratado. El taxol así vehiculizado se diluye con solución inyectable de glucosa al 5% y cloruro de sodio al 0.9%; la concentración de taxol no debe exceder de 1.2 mg/mL. Estas soluciones se mantienen estables durante 24 h y se pueden controlar turbidimétricamente en forma visual. Para mejorar la dispersión y asegurar la estabilidad de los preparados, se han propuesto otras formulaciones con vehículos emulsionantes y disolventes como DEHP (di-2-ethylhexil ftalato), PVC, ésteres de triricinoleato de glicerilo etoxilados, entre otros. En los humanos, el taxol se metaboliza principalmente por el citocromo P450 (CYP) 2C8 y por el CYP3A4. El metabolismo mediado por CYP2C8 comienza con la formación de 6 $\alpha$ -hidroxi-paclitaxel, mientras que el metabolismo mediado por CYP3A4 comienza con la formación de 30-p-hidroxipaclitaxel. Ambos metabolitos se metabolizan por CYP3A4 y CYP2C8, respectivamente, para formar 6 $\alpha$ ,3'-p-dihidroxipaclitaxel.

## Fitoquímica de *Taxus spp.*

Las especies del género *Taxus* también contienen compuestos no alcaloídicos, no contienen canales secretores y por lo tanto no contienen oleo-resinas, presentan por lo tanto ácido fórmico, efedrina, bis-flavonoides y rodoxantina (pigmento carotenoide presente en el arilo que envuelve a las semillas de *Taxus spp.*, no es tóxico y contiene glúcidos). En sus ramas presenta heterósidos del tipo taxicatina o taxicantósido), el aglucón taxicantigenina (éster dimetílico del forogluclinol), forma enlace O-glucosídico con una molécula de glucosa. Las taxinas están presentes en las hojas y semillas. El arilo no contiene taxinas. Las taxinas representan el 0.5 a 2% de alcaloides totales, la mezcla se denomina taxina, con varios compuestos complejos con un esqueleto diterpénico no nitrogenado, polihidroxilados y parcialmente esterificados con ácido acético y ácido dimetilamino-3-fenil-3 propiónico (Barrales, Reyes y Chávez, 2015).

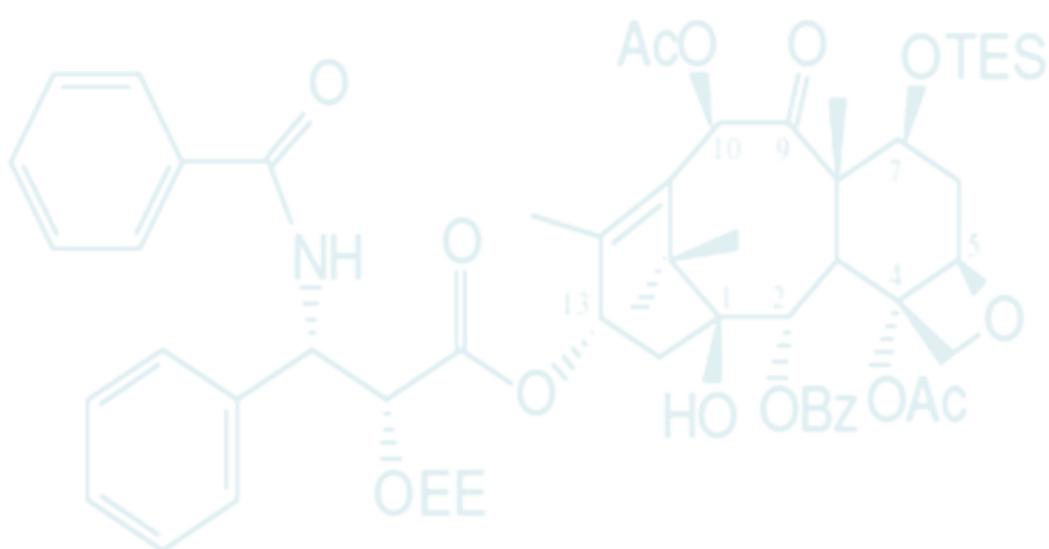
## CONCLUSIONES

El espectro de enfermedades neoplásicas que se tratan con taxol son: carcinoma de ovario avanzado, carcinoma gástrico, carcinoma de colon, carcinoma escamoso de cabeza y cuello, adenocarcinoma metastásico de mama, carcinomas testiculares, carcinoma de pulmón de células pequeñas, melanoma metastásico, leucemia linfoblástica aguda y leucemia mielocítica aguda. El taxol es una biomolécula altamente funcionalizada lo que dificulta en gran medida su síntesis por métodos exclusivamente

químicos, por lo que es necesario partir de intermediarios de su ruta biosintética u otros metabolitos similares conocidos como taxoides. El principal problema del taxol es la baja concentración que se presenta en el extracto de la corteza del tejo, lo que incrementa en gran medida los gastos de purificación. La biosíntesis del taxol a partir del geranilgeranil difosfato implica diecinueve pasos enzimáticos y se divide en varias reacciones enzimáticas distintas. Varios de los genes codificantes de estas enzimas ya han sido identificados y purificados, pero otros aún no, por lo que no se puede reconstruir la ruta por completo. El punto clave en la ruta de este fármaco se lleva a cabo por la enzima taxadieno sintasa, encargada de provocar una triple ciclización para formar la molécula de tax-4(5),11(12)-dieno. Por lo tanto, el desarrollo de mejores procesos biotecnológicos debe basarse en un conocimiento detallado de la ruta de biosíntesis de taxol, las enzimas responsables que catalizan las secuencias de reacción y sus mecanismos de acción, así como los genes que codifican estas enzimas.

## Agradecimientos

Los autores expresan su máximo agradecimiento al Consejo Mexicano de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por el nombramiento otorgado como Candidato a Investigador Nacional. Así mismo se agradece al Rector Dr. Luis Carlos Barros González de la Universidad Politécnica del Valle de Toluca, al M. en C. Felipe de Jesús Castillo Hernández, Director de la División de Ingeniería en Biotecnología y al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP).



Hebert Jair Barrales-Cureño, Angélica Farrera Roa, César Reyes Reyes,  
Itzia Yamiri Hernández Flores, Edgar García Arzate, Salvador Chávez Salinas

## Referencias Bibliográficas

1. Altstadt, T. J, Fairchild, C. R, Golik, J, Johnston, K. A, Kadow, J. F, Lee, F. Y, Long B. H, Rose W. C, Vyas D. M, Wong Z. H, Wu M. L, Wittman M. D, (2001). Synthesis and antitumor activity of novel C-7 paclitaxel ethers: discovery of BMS-184476, *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4577-4583.
2. Aoyagi, H, DiCosmo F, Tanaka H, (2002). Efficient paclitaxel production using protoplasts isolated from cultured cells of *Taxus cuspidata*. *Planta Medica*, 68(5), 420-424.
3. Arsenault, A. L, Lhotáka S, Hunter W. L, Banquerigoc M. L. C, Brahn E, (1998). Taxol involution of collagen-induced arthritis: Ultrastructural correlation with the inhibition of synovitis and neovascularization. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 86, 280-289.
4. Baloglu, E, Kingston D. G, (1999). The taxane diterpenoids. *Journal of Natural Products*, 62(10), 1448-1472.
5. Barrales, C. H. J, De la Rosa M. R, Villegas, O. S, (2012). Hacia una genética celular del cáncer. *Revista la Ciencia y el Hombre*, 25, 1-6.
6. Barrales, C. H. J, Soto, H. M, (2011). Bioquímica de los taxoides utilizados contra el cáncer. *Revista de Educación Bioquímica*, 30(1), 12-20.
7. Barrales, C. H. J, Soto, H. M, Ramos, V. A, Trejo, T. L, Martínez, V. M, Ramírez, G. M, López, U. J, (2011). Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas *in situ* y en callos inducidos *in vitro* de *Taxus globosa* Schlecht. *Spanish Journal of Rural Development*, 2, 103-114.
8. Barrales, C. H. J, Soto, H. M, (2012). Taxoides: metabolitos secundarios del árbol del tejo (*Taxusspp.*). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(2), 207-21.
9. Ballero, M, Loi, M. C, Van Rozendaal, E. L. M, van Beek, T. A, van de Haar, C, Poli F, Appendino G, (2003). Analysis of pharmaceutically relevant taxoids in wild yew trees from Sardinia. *Fitoterapia*, 74, 34-39.
10. Barrales, C. H. J, Reyes, R. C, Chávez, S. S, (2015). Producción *in vitro* de taxoides anticancerígenos de *Taxus spp.* Editorial Académica Española. 76 pag.
11. Barrales, C. H. J, Soto, H. M, Ramos, V. A, Luna, P. G, Trejo, T. L, Martínez, V. M, Ramírez, G. M, (2009). Inducción de callos *in vitro* de *Taxus globosa* a partir de acículas. *Revista Latinoamericana de Química. Suplemento especial ISNN 0370-5943*, pp. 89.
12. Brown, R. G, Hull, F. E, (1951). *Taxus* (yew) poisoning of cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 118, 398-399.
13. Commercon, A, Bourzat, J. D, Didier, E, Lavelle, F, (1995). Taxane anticancer agents: Basic Science and Current Status (Georg Gl, Chen TT, Ojima I, Vyas DM eds.) American Chemical Society, Washington DC. 233-246.
14. Chaudhary, A. G, Gharpure, M. M, Rimoldi, J. M, Chordia, M. D, Kingston, D. G. I, Grover S, Lin, C. M, Hamel, E, Gunatilaka, A. A, (1994). Leslie Unexpectedly Facile Hydrolysis of the 2-Benzoate Group of Taxol and Syntheses of Analogs with Increased Activities. *Journal of the American Chemical Society*, 116(9), 4097-4098.
15. Chaudhary, A. G, Kingston, D. G. I, (1993). Synthesis of 10-deacetoxytaxol and 10-deoxytaxotere. *Tetrahedron Letters*, 34(31), 4921-4924.

16. Chen, S. H, Huang, S, Kant, J, Fairchild, C, Wei, J, Farina, V, (1993). Synthesis of 7-Deoxy- and 7, 10-Dideoxytaxol via Radical Intermediates. *Journal of Organic Chemistry*, 58, 5028-5029.
17. Chordia, M. D, Chaudhary, A. G, Kingston, D. G. I, Qing, J. Y, Hamel, E, (1994). Synthesis and biological evaluation of 4-deacetoxypaclitaxel. *Tetrahedron Letters*, 35(37), 6843-6846.
18. Croteau, R, Ketchum, R. E. B, Long, R. M, Kaspera, R, Wildung, M. R, (2006). Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews*, 5, 75-97.
19. Daniewski, W. M, Gumulka, M, Anczewski, W, Masnyk, M, Błoszyk, E, Gupta, K. K, (1998). Why the yew tree (*Taxus baccata*) is not attacked by insects. *Phytochemistry*, 49(5), 1279-1282.
20. Downing, K. H, Nogales, E, (1999). Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. *Cell Structure Function*, 24(5), 269-275.
21. Eisenreich, W, Menhard, B, Hylands, PJ, Zenk, M. H, Bacher, A, (1996). Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 93(13), 6431-6436.
22. Eisenreich, W, Rohdich, F, Bacher, A, (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Science*, 6(2), 78-84.
23. Eisenreich, W, Schwarz, M, Cartayrade, A, Arigoni, D, Zenk, M. H, Bacher, A, (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology*, 5(9), 221-233.
24. Fett-Neto, A. G, Dicosmo, F, Reynolds, W. F, Sakata, K, (1992). Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Biotechnology*, 10, 1572-1575.
25. Floss, H. G, Mocek, U, (1995). Biosynthesis of taxol. *Taxol: Science and Application*. M, S. Boca Raton, CRC Press: 191-208.
26. Fu, Y. J, Zu, Y. G, Li, S. M, Sun, R, Efferth, T, Liu, W, Jiang, S. G, Luo, H, Wang, Y, (2008). Separation of 7-xylosyl-10-deacetyl paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III from the remainder extracts free of paclitaxel using macroporous resins. *Journal of Chromatography*, 1177, 77-86.
27. Gueritte-Voegelein, F, Guenard, D, Potier, P, (1987). Taxol and derivatives: a biogenetic hypothesis. *Journal of Natural Products*, 50(1), 9-18.
28. Han, K. H, Fleming, P, Walker, K, Laper, M, Chilton, W. S, Mocek, U, Gordon, M. P, Floss, H. G, (1994). Genetic transformation of mature *Taxus*: An approach to genetically control the *in vitro* production of the anticancer drug, taxol. *Plant Science*, 95, 187-196.
29. Hezari, M, Lewis, N. G, Croteau, R, (1995). Purification and characterization of taxa-4(5),11(12)-diene synthase from pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 437-444.
30. Holton, R. A, Somoza, C, Kim, H. B, Liang, F, Biediger, R. J, Boatman, D, Shindo, M, Smith, C. C, Kim, S, Nadizadeh, H, Suzuki, Y, Tao, C, Vu, P, Tang, S, Zhang, P, Murthi, K. K, Gentile, L. S, Liu, J. H, (1994). First total synthesis of taxol. I. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 1597-1598.
31. Huang, K. X, Huang, Q. L, Wildung, M. R, Croteau, R, Scott, A. I, (1998). Overproduction in *Escherichia coli*, of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the taxol biosynthetic pathway. *Protein expression and purification*, 13, 90-96.

Hebert Jair Barrales-Cureño, Angélica Farrera Roa, César Reyes Reyes,  
Itzia Yamiri Hernández Flores, Edgar García Arzate, Salvador Chávez Salinas

32. Huang, Q, Roessner, C. A, Croteau, R, Scott A. I, (2001). Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 2237-2242.
33. Itokawa, H, (2003). Introduction. *Taxus. The Genus Taxus*. H. Itokawa, K.-H. L. London, New York Taylor and Francis: 1-18.
34. Ketchum, R. E. B, Rithner, C. D, Qiu, D, Kim, Y. S, Williams, R. M, Croteau, R. B, (2003). *Taxus* metabolomics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus* x media cell cultures. *Phytochemistry*, 62(6), 901-909.
35. Kewal, K. J. Applications of Biotechnology in Oncology (2013) SpringerLink: *Bücher Springer Science & Business Media*, 855 pp.
36. Kingston, D. G, Bane, S, Snyder, J. P, (2005). The taxol pharmacophore and the T-taxol bridging principle. *Cell Cycle*, 4(2), 279-289.
37. Kingston, D. G. I, (2001). Taxol, a molecule for all seasons. *Chemical Communications*, 10, 867-880.
38. Kingston, D. G, Newman, D. J, (2007). Taxoids: cancer-fighting compounds from nature. *Current opinion in drug discovery & development Journal*, 10(2), 130-144.
39. Kobayashi, J, Shigemoto, H, (2004). Biological activity and chemistry of taxoids from the Japanese yew, *Taxus cuspidata*. *Journal of Natural Products*, 67(2), 245-256.
40. Koepp, A. E, Hezari, M, Zajicek, J, Vogel, B. S, Lafever, R. E, Lewis, N. G, Croteau, R, (1995). Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to tax-4(5),11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in pacific yew. *Journal of Biological Chemistry*, 270(15), 8686-8690.
41. Kolewe, M. E, Gaurav, V, Roberts, S. C, (2008). Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Molecular Pharmacology*, 5(2), 243-256.
42. Kuzuyama, T, Seto, H, (2003). Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Natural Product Reports*, 20(2), 171-183.
43. Li, S. M, Fu, Y. J, Zu, Y. G, Sun, R, Wang, Y, Zhang, L, Luo, H, Gu, C. B, Efferth, T, (2009). Determination of paclitaxel and other six taxoids in *Taxus* species by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 81-89.
44. Lowe, J, Li, H, Downing, K. H, Nogales, E, (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 313(5), 1045-1057.
45. Luo, J. P, Mu, Q, Gu, Y. H, (1999). Protoplast culture and paclitaxel production by *Taxus yunnensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 25-29.
46. Masters, J. J, Link, J. T, Snyder, L. B, Young, W. B, Danishefsky, S. J, (1995). A total synthesis of taxol. *Angewandte Chemie International Edition*; 34(16), 1723-1726.
47. Morihira, K, Hara, R, Kawahara, S, Nishimori, T, Nakamura, N, Kusama, H, Kuwajima, I. J, (1998). Enantioselective total synthesis of taxol. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 12980-12981.
48. Mukaiyama, T, Shiina, I, Iwadare, H, Saitoh, M, Nishimura, T, Ohkawa, N, Sakoh, H, Nishimura, K, Tani, Y. I, Hasegawa, M, Yamada, K, Saitoh, K. Chem, (1999). Asymmetric total synthesis of Taxol (R). *European Journal*, 5, 121-161.

49. Mustafa, K, Yinghua, J, Robert, M. C, Rodney, C, David, W. C, (2011). Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature*, 469, 116-122.
50. Neidigh, K. A, Gharpure, M. M, Rimoldi, J. M, Kingston, D. G. I, Qing, J. Y, Hamel, E, (1994). Synthesis and biological evaluation of 4-deacetylpaclitaxel. *Tetrahedron Letters*, 35(37), 6839-6842.
51. Nicolaou, K. C, Zang, Z, Liu, J. J, Ueno, H, Nantermet, P. G, Guy, R. K, Claiborne, C. F, Renaud, J, Couladouros, E. A, Paulvannan, K, Sorensen, E. J, (1994). Total synthesis of taxol. *Nature*, 367, 630-634.
52. Ogden, L, (1988). *Taxus* (Yews) a Highly Toxic Plant. *Veterinary and Human Toxicology*, 30(6), 563-564.
53. Ojima, I, Chakravarty, S, Inoue, T, Lin, S, He, L, Horwitz, S. B, Kuduk, S. D, Danishefsky, S. J, (1999). A common pharmacophore for cytotoxic natural products that stabilize microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A*, 96, 4256-4261.
54. Patel, R. N, (1998). Tour of paclitaxel. *Annual Review of Microbiology*, 98, 361-395.
55. Rohmer, M, (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports*, 16(5), 565-574.
56. Schrijvers, D, Vermorken, J. B, (2000). Role of taxoids in head and neck cancer. *The Oncologist*, 5, 199-208.
57. Schuler, M. A. Plant cytochrome P450 monooxygenases, 1996). *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15(3), 235-284.
58. Stierle, A, Strobel, G, Stierle, D, (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260, 214-216.
59. Trapp, S. C, Croteau, R. B, (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 158(2), 811-832.
60. Walker, K, Fujisaki, S, Long, R, Croteau, R, (2002). Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 12715-12720.
61. Wani, M. C, Taylor, H. L, Wall, M. E, Coggon, P, Mcphail, A. T, (1971). Plant antitumor agents. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* *Journal of the American Chemical Society*, 93, 2325-2326.
62. Wender, P. A, Badham, N. F, Conway, S. P, Floreancig, P. E, Glass, T. E, Granicher, C, Houze, J. B, Janichen, J, Lee, D, Marquess, D. G, McGrane, P. L, Meng, W, Mucciaro, T. P, Muhlebach, M, Natchus, M. G, Paulsen, H, Rawlins, D. B, Satkofsky, J, Shuker, A. J, Sutton, J. C, Taylor, R. E, Tomooka, K, (1997). The pinene path to taxanes: 5. Stereocontrolled synthesis of a versatile taxane precursor. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 2755-2756.
63. Wildung, M. R, Croteau, R, (1996). A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16), 9201-9204.
64. Woo, D. D. L, Miao, S. Y. P, Pelayo, J. C, Woolf, A. S, (1994). Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease. *Nature*, 368, 750-753.
65. Hui Xiao, Pascal Verdier-Pinard, Narcis Fernández-Fuetes, Berta Burd, Ruth Angeletti, Andras Fiser, Susan Band Horwitz and George A. Orr. 2006. Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 103. No. 27. 10166-10173.

Hebert Jair Barrales-Cureño, Angélica Farrera Roa, César Reyes Reyes,  
Itzia Yamiri Hernández Flores, Edgar García Arzate, Salvador Chávez Salinas

66. Xiong, Z. Q. Yang, Y. Y. Zhao, N. Wang, Y. (2013). Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media*. *Microbiology*, 13:71-80.
67. oung, D. H. Michelotti, EL, Swindell, C. S. Krauss, N. E. (1992). Antifungal Properties of Taxol and Various Analogs. *Experientia*, 48(9), 882-885.
68. Yukimune, Y. Tabata, H. Higashi, Y. Hara, Y. (1996). Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnology*, 14, 1129-1132.
69. Zhong, J. (2002). Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Bioscience Bioengineering*, 94(6), 591-599.
70. Zhou, D. Zhao, K. Ping, W. Ge, J. Ma, X. Jun, L. (2005). Study on the mutagénesis of protoplasts from paclitaxel-producing fungus *Nodulisporium sylviciforme*. *The Journal of American Science*, 1(1), 55-62.
71. Zu, Y. G. Fu, Y. J. Li, S. M. Sun, R. Li, Q. Y. Schwarz, G. (2006). Rapid separation of four main taxoids in *Taxus* species by combined LLP-SPE-HPLC (PDA) procedure. *Journal of Separation Science*, 29, 1237-44.