



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**BÚSQUEDA DE INHIBIDORES NATURALES DE
UPR PARA EL CONTROL DE HONGOS
FITOPATÓGENOS**

Tesis que presenta

LINA FERNANDA SILVA CASTRO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, Noviembre de 2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **LINA FERNANDA SILVA CASTRO** titulado “**BÚSQUEDA DE INHIBIDORES NATURALES DE UPR PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS**”, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología, en la línea de Productos Naturales, en el laboratorio de Química orgánica del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 30 de Noviembre de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Lina F. Silva C.

Lina Fernanda Silva Castro

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por enriquecer mi formación profesional, por incentivar-me a aprender cada día algo nuevo, y además por ser el excelente ser humano que es, por su apoyo, amabilidad y dedicación a lo largo de mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada número 730204 para mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la Unidad de Biotecnología por el uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto y el apoyo económico para la realización de mi estancia en Angers.

A la Dra. Séverine Derbré, por su constante dedicación, tiempo y valiosa ayuda durante mi estancia en el laboratorio SONAS, en Angers.

A mi comité tutorial y revisores de tesis: Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, Dra. Anne Marie Le Ray, Dra. Daisy Pérez, Dr. Ignacio Islas y Dr. Fernando Echeverri por sus recomendaciones y sugerencias durante el proceso de realización de mi tesis.

A Karlina García y Gabriel Dzib, por su ayuda y apoyo durante la realización de este trabajo de investigación.

Al laboratorio Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux (SONAS) por el uso de instalaciones durante mi estancia en Angers, Francia.

A mis abuelitos, por ser una luz en mi vida; a Meme, por amarme tanto y ser siempre un apoyo, a mi mamá, por su amor maternal y por colocar en mi rostro una sonrisa diaria por cada una de sus ocurrencias, a mi Tía Melva, por estar siempre pendiente de mí y cuidarme, a mi Amor y a mi tío Lucho, por ser mis consejeros e impulsarme a llegar cada día más

lejos, a Diego, por quererme como a una hermana; a todos porque siempre han sido un apoyo incondicional.

A Lauren y Diobel, por su amistad y convertirse en mi familia en México; y a Jair, por los momentos que siempre llevaré en mi corazón.

A Mary, Nati, Anama, Lu, Nathi B, Jose, mis amigos en Colombia, por su apoyo y compañía, aunque estuviesen a cientos de kilómetros. A Clau, por ser una excelente amiga, mi compañía y apoyo durante mucho tiempo, y especialmente durante estos dos últimos años.

A Dominique Brochard y su familia, por su amabilidad y calidez humana, que hicieron que mi estancia en Francia fuese agradable aún con confinamiento incluido.

DEDICATORIA

A mi familia,
especialmente a Meme.

Los amo

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 FUNGICIDAS ALTERNATIVOS	3
1.2 PLANTAS PRESENTES EN EL CONTINENTE AMERICANO CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	3
1.2.1 Plantas mexicanas con actividad antifúngica.....	3
1.3 METABOLITOS ANTIFÚNGICOS	4
1.4 SITIO DE ACCIÓN DE ANTIFÚNGICOS NATURALES	4
1.5 RESPUESTA A PROTEÍNAS DESPLEGADAS/ MAL PLEGADAS (UPR)	5
1.5.1 Activación de UPR mediada por IRE1	6
1.5.2 Inductores de UPR	7
1.5.3 Estudios de UPR en hongos	8
1.5.4 Inhibidores de UPR	9
1.6 FAMILIA CLUSIACEAE	11
1.6.1 Fitoquímica de la familia Clusiaceae	11
1.6.2 Actividad antifúngica.....	14
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16

OBJETIVOS	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
CAPÍTULO II	19
2.1 INTRODUCCIÓN	19
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.2.1 Procedimientos experimentales generales	20
2.2.2 Material vegetal	21
2.2.3 Extracción del material vegetal.....	21
2.2.4 Partición líquido-líquido de los extractos crudos.....	22
2.2.5 Bioensayo antifúngico de difusión de disco: Prueba de germinación de esporas.....	22
2.2.6 Purificación de los extractos	23
2.2.6.1 Corteza de <i>G. intermedia</i>	23
2.2.6.2 Corteza de <i>C. brasiliense</i> (Calakmul).....	24
2.2.6.3 Corteza de <i>C. brasiliense</i> (Mérida).....	24
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
2.3.1 Localización de especies de la familia Clusiaceae en la Península de Yucatán	24
2.3.1 Partición líquido-líquido de los extractos crudos.....	26

2.3.2 Bioensayo antifúngico de difusión de disco: Prueba de germinación de esporas.....	29
2.3.3 Purificación de los extractos	30
□ <i>Garcinia intermedia</i>	31
□ <i>Calophyllum brasiliense</i>	36
2.4 CONCLUSIONES	38
CAPÍTULO III	41
3.1 RESUMEN.....	41
3.2 USING ¹³ C-NMR DEREPLICATION TO AID IN THE IDENTIFICATION OF XANTHONES PRESENT IN THE STEM BARK EXTRACT OF <i>Calophyllum brasiliense</i>	42
3.2.1 Abstract	42
3.2.2 Introduction.....	43
3.2.3 Methodology	44
3.2.3.1 General experimental procedures.	44
3.2.3.2 Plant material.	45
3.2.3.3 Extraction and fractionation of plant material.	45
3.2.3.4 ¹³ C NMR dereplication analyses.....	46
3.2.3.5 Databases.....	47
3.2.3.6 MixONat Software.	47
3.2.4 Results and discussion.....	47

3.2.5 Acknowledgements	54
CAPITULO IV.....	55
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	55
4.1 CONCLUSIONES.....	55
4.2 PERSPECTIVAS.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	57
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	74

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Ejemplos de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.....	4
Figura 1.2 Sensores de activación y su función en la UPR.	6
Figura 1.3 Ruta de activación del UPR mediada por IRE1.	7
Figura 1.4 Ejemplos de inhibidores sintéticos de UPR	10
Figura 1.5 Xantonas con actividad inhibidora de UPR aisladas a partir de especies pertenecientes al género <i>Garcinia</i>	10
Figura 1.6 Ejemplo de xantonas presentes en la familia Clusiaceae	13
Figura 1.7 Ejemplos de xantonas con actividad antifúngica presentes en la familia Clusiaceae.....	14
Figura 2.1 Esquema de la posición de los discos de papel en el bioensayo antifúngico de difusión de disco.....	23
Figura 2.2 Distribución de plantas pertenecientes a la familia Clusiacea en la Península de Yucatán	26
Figura 2.3 Perfiles cromatográficos de extractos crudos de dos individuos de <i>C. brasiliense</i>	27
Figura 2.4 Perfiles cromatográficos de fracciones obtenidas a partir del extracto crudo de corteza de dos individuos de <i>C. brasiliense</i>	27
Figura 2.5 Perfiles cromatográficos por CCD de fracciones obtenidas a partir de extracto crudo <i>G. Intermedia</i>	29
Figura 2.6 Perfiles cromatográficos por CCD de fracciones obtenidas a partir de extractos crudos de especies de <i>Clusia</i>	29
Figura 2.7. Imagen microscópica del recuento de esporas empleando una cámara de Neubauer.....	30

Figura 2.8 Resultado negativo de los ensayos de difusión en disco.....	30
Figura 2.9 Fracciones obtenidas a partir de una cromatografía Flash de la fracción hexánica de la corteza de <i>G. intermedia</i> (GIC-2A).....	31
Figura 2.10 Perfiles cromatográficos obtenidos por CG-EM de las fracciones D, F, G, H e I, obtenidas a partir de cromatografía FLASH de la fracción hexánica de la corteza de <i>G.intermedia</i> (GIC-2A).....	32
Figura 2.11 Fracciones obtenidas a partir de una VLC de la fracción de acetato de etilo de la corteza de <i>G.intermedia</i> (GIC-2B).....	33
Figura 2.12 Perfil cromatográfico obtenido por CG-MS de la fracción C obtenida a partir de una VLC de la fracción de acetato de etilo de la corteza de <i>G. intermedia</i> (GIC-2B).	34
Figura 2.13 Perfiles cromatográficos obtenidos por CG-MS de las fracciones F, G, H, I y J, obtenidas a partir de la VLC realizada a la fracción de acetato de etilo de la corteza <i>G. intermedia</i> (GIC-2B).....	35
Figura 2.14 8-desoxigatanina, xantona presente en las hojas de <i>G. intermedia</i>	36
Figura 2.15 Fracciones obtenidas a partir de una VLC de la fracción hexánica de la corteza de <i>C. brasiliense</i>	37
Figura 2.16 Fracciones obtenidas a partir de una VLC de la fracción de acetato de etilo de la corteza de <i>C. brasiliense</i>	38
Figure S3. 1 Semipurified fractions (1A to 1P) obtained from the VLC purification of the low polarity fraction of the stem bark extract from <i>C. brasiliense</i>	84
Figure S3. 2 Semipurified fractions (2A to 2N) obtained from the VLC purification of the medium polarity fraction of the stem bark extract from <i>C. brasiliense</i>	84
Figure S3. 3 Chromatographic profile (TLC) of the precipitates from fractions 1I , 1J , and 1K , obtained from the VLC purification of the low-polarity fraction.	85

Figure S3. 4 GC-MS chromatographic profile of the precipitate from fraction 1K , obtained from VLC purification of the low polarity fraction of the stem bark extract of <i>C. brasiliense</i>	85
Figure S3. 5 ¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of the precipitate from fraction 1K	86
Figure S3.6 ¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃) spectrum of the precipitate from fraction 1K	86
Figure S3.7 Expansion of HMBC experiment of the precipitate from fraction 1K	87
Figure S3.8 Part of displayed results from the ¹³ C-NMR dereplication analysis (+ DEPT-90 and 135) of fraction 1K using the <i>Calophyllum</i> DB.....	88
Figure S3.9 Part of displayed results for the ¹³ C-NMR dereplication analysis (+ DEPT-90 and 135) of fraction 1K using the Xanthonenes DB	89
Figure S3.10 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 1K	90
Figure S3.11 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 1J	90
Figure S3.12 ¹³ C-NMR (100 MHz, acetone-d ₆) spectrum of fraction 1J	91
Figure S3.13 Part of the displayed results from the ¹³ C-NMR dereplication analysis (+ DEPT-90 and 135) of fraction 1J using <i>Calophyllum</i> DB.....	92
Figure S3.14 Part of the displayed results from the ¹³ C-NMR dereplication analysis (+ DEPT-90 and 135) of fraction 1J using Xanthonenes DB	93
Figure S3.15 Part of the displayed results for the ¹³ C-NMR dereplication analysis (+ DEPT-90 and 135) of fraction 1D using <i>Calophyllum</i> DB	94
Figure S3.16 Part of the displayed results for the ¹³ C-NMR dereplication analysis (+ DEPT-90 and 135) of fraction 1D using Xanthonenes DB.....	94
Figure S3. 17 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 1D	95
Figure S3.18 Part of the displayed results for the ¹³ C-NMR dereplication analysis (+ DEPT-90 and 135) of fraction 1G using <i>Calophyllum</i> DB	96

Figure S3.19 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 1G using Xanthones DB.....	96
Figure S3.20 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2G using <i>Calophyllum</i> DB	97
Figure S3.21 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2G using Xanthones DB.....	97
Figure S3.22 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 2G	98
Figure S3.23 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 2J	98
Figure S3. 24 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2J using <i>Calophyllum</i> DB.....	99
Figure S3. 25 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2J using Xanthones DB	100
Figure S3. 26 HPLC-ELSD chromatographic profile of precipitate from fraction 2J	101
Figure S3. 27 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO-d_6) spectrum of precipitate from fraction 2J .	102
Figure S3. 28 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of the precipitate from fraction 2J using <i>Callophyllum</i> DB.....	103
Figure S3. 29 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of the precipitate from the fraction 2J using Xanthones DB	104
Figure S3. 30 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2K using <i>Calophyllum</i> DB	105
Figure S3. 31 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2K using Xanthones DB.....	105
Figure S3. 32. ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of fraction 2B	106

Figure S3. 33 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2B using <i>Calophyllum</i> DB	107
Figure S3. 34 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2B using Xanthones DB.....	107
Figure S3. 35 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2F using <i>Calophyllum</i> DB.....	108
Figure S3. 36 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 2F using Xanthones DB	108

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Taxonomía de Clusiaceae	11
Tabla 2. 1 Rendimiento de los extractos crudos obtenidos a partir del material vegetal procesado.....	22
Tabla 2. 2 Rendimientos de las fracciones obtenidas a partir de la partición de los extractos crudos procesados	22
Tabla 2. 3 Plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae presentes en México.....	25
Table 3. 1 Experimental and reported spectroscopic data for macluraxanthone (1).....	49
Table S3. 1 ¹ H NMR (400 Hz) and ¹³ C-NMR (100 Hz) spectral data (CDCl ₃) of the precipitate from fraction 1K	74
Table S3. 2 Experimental and reported spectroscopic data in CDCl ₃ for 1-3 predicted in fraction 1K	75
Table S3. 3 Experimental and reported spectroscopic data for 1 and 4 predicted in fraction 1J (acetone-d ₆).....	76
Table S3. 4 Experimental and reported spectroscopic data for 6-8 predicted in fraction 1D (CDCl ₃)	77
Table S3. 5 Experimental and reported spectroscopic data for 7, 9 and 10 predicted in fraction 1G (CDCl ₃).....	78
Table S3. 6 Experimental and reported spectroscopic data for 11, 12 and 13 predicted in fraction 2G (CDCl ₃).....	79
Table S3. 7 Experimental and reported spectroscopic data for 4 and 14 predicted in fraction 2J (Acetone-d ₆)	80
Table S3. 8 Experimental and reported spectroscopic data for 5, 14 and 15 predicted in the precipitate from fraction 2J (dimethylsulfoxide-d ₆).....	80

Table S3. 9 Experimental and reported spectroscopic data for 4 predicted in fraction 2K (Acetone-d ₆).....	81
Table S3. 10 Experimental and reported spectroscopic data for 16 and 17 predicted in fraction 2B (CDCl ₃)	82
Table S3. 11 Experimental and reported spectroscopic data for 11 , 12 and 13 predicted in fraction 2F (CDCl ₃).....	83

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF6	Factor de activador de transcripción 6
AZC	L-azetidina-2-carboxílico
BiP	Proteína de unión a inmunoglobulina
BipA	BiP de <i>Aspergillus</i> sp
bZIP	Factor de transcripción tipo cremallera de leucina
CCD/TLC	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatógrafo de gases
DB	Base de datos
DEPT	Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTT	Ditiotreitol
ELSD	Detector de dispersión de luz por evaporación
EM	Espectrómetro de masas
ERAD	Degrado asociada a retículo endoplasmático

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	Gramos
HPLC	Cromatografía de alta eficacia
Hx	Hexano
IRE1	Proteína cinasa dependiente de inositol
ITS	Espaciadores internos de transcritos
Kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
PDA	Agar papa dextrosa
PERK	Proteína cinasa del RE activada por ARN de doble cadena
ppm	Partes por millón
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
QTP1	Quimiotipo 1
QTP2	Quimiotipo 2

RE	Retículo endoplasmático
RF	Factor de retardo
RMN/NMR	Resonancia magnética nuclear
RNasa	Ribonucleasa
t	Tiempo
Tm	Tunicamicina
t_R	Tiempo de retención
tARN	Ácido ribonucleico de transferencia
UV	Ultravioleta
UPR	Unfolded protein response
VLC	Cromatografía líquida al vacío
μL	Microlitros

RESUMEN

Uno de los principales problemas en la agricultura son las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos; para combatir a estos microorganismos se emplean fungicidas sintéticos que, a menudo, representan un riesgo para la salud y el ambiente, además de favorecer la aparición de cepas de hongos resistentes a estos tratamientos. Por la razón anterior, y como una alternativa ecológica, en la actualidad se buscan fungicidas a partir de plantas y con diferentes sitios de acción a los ya establecidos. Xantonas, un tipo de metabolitos reportados en especies de plantas del género *Garcinia* spp (Clusiaceae), tienen la capacidad de inhibir la repuesta a proteínas mal plegadas (UPR), mecanismo fundamental en el proceso fitopatógeno del hongo. Con base a lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo la búsqueda de xantonas producidas por especies de la familia Clusiaceae presentes en la península de Yucatán, y que posean la capacidad de inhibir la UPR. Se emplearon técnicas cromatográficas de separación para la obtención de fracciones semipurificadas de extractos crudos etanólicos, provenientes de la corteza de *Garcinia intermedia* y *Calophyllum brasiliense*. Se realizó un análisis preliminar empleando CG-EM, lo que permitió determinar la posible presencia de xantonas en las fracciones obtenidas a partir de *Calophyllum brasiliense*. Mediante análisis de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, además de análisis bidimensionales, y la ayuda de estudios de desduplicación utilizando ^{13}C -RMN, se determinó la presencia de 1,2-dimetoxixantona, 4-hidroxixantona, 1,5-dihidroxixantona, 2-hidroxixantona, 1,7-dihidroxixantona y macluraxantona, las tres últimas descritas por primera vez en *C. brasiliense*. Macluraxantona ha sido reportada anteriormente como inhibidora de la UPR, por lo que las demás xantonas encontradas son potenciales inhibidores de esta respuesta.

ABSTRACT

One of the main problems in agriculture are diseases caused by phytopathogenic fungi; To counteract these microorganisms, synthetic fungicides are used, which often represent a risk to health and the environment, in addition to favoring the appearance of strains of fungi resistant to these treatments, for this reason, and as an ecological alternative, in the currently, fungicides are sought from plants and with different sites of action from those already established. Xanthonenes, a type of metabolites reported in plant species of the genus *Garcinia* spp (Clusiaceae), have the ability to inhibit the unfolded protein response (UPR), a fundamental mechanism in the phytopathogenic process of the fungus. Based on the above, this research has as its main objective the search for xanthonenes produced by species of the Clusiaceae family present in the Yucatan peninsula, which have the ability to inhibit UPR, for which, chromatographic separation techniques were used to obtain semi-purified fractions of ethanolic crude extracts from the stem bark of *Garcinia intermedia* and *Calophyllum brasiliense*, a preliminary analysis was carried out using GC-MS, which allowed determining the possible presence of xanthonenes in the fractions obtained from *Calophyllum brasiliense*. Through $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ analysis, in addition to two-dimensional analysis, and the help of dereplication analysis using $^{13}\text{C-NMR}$, the presence of 1,2-dimethoxyxanthone, 4-hydroxyxanthone, 1,5-dihydroxyxanthone, 2-hydroxyxanthone, 1,7-dihydroxyxanthone and Macluraxanthone, the last three described for the first time in *C. brasiliense*. Macluraxanthone has been previously reported as an inhibitor of UPR, so the other xanthonenes found are potential inhibitors of this response.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas heterótrofos, que poseen una pared celular compuesta principalmente de quitina y carecen de clorofila (Agrios, 2005). Se pueden encontrar en asociaciones con plantas, y son considerados fitopatógenos cuando las infectan causándoles una enfermedad; entre los síntomas y signos que manifestarán las plantas afectadas se encuentran la presencia de halos cloróticos, el marchitamiento, tizones, entre otros; lo que dependerá del hongo que las infecte (García, 2014).

Los hongos fitopatógenos tienen una distribución global, y entre los géneros de mayor incidencia en América se encuentran *Colletotrichum* y *Fusarium* (Ramirez y Hernandez, 2015), que afectan a una gran parte de los cultivos agrícolas, hortícolas y silvícolas. Aunque en México no hay un reporte sobre la incidencia de hongos fitopatógenos y su impacto en la economía, especies pertenecientes a los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium* han sido identificadas como agentes causales de enfermedad en cultivos de importancia en México como el maíz (*Zea mays* L.) y el chile (*Capsicum annuum* L.) (Muñiz, 2014); estos cultivos también son afectados por especies pertenecientes al género de *Macrophomina* (Leyva *et al.*, 2015).

Debido al enorme impacto generado por las infecciones causadas por hongos en plantas, se emplean fungicidas sintéticos para contrarrestar su propagación; sin embargo, los fungicidas usados actualmente poseen desventajas ya que por su naturaleza química pueden representar un riesgo de contaminación (Guerrero y Velandia, 2013; Botello *et al.*, 2005). Además, los microorganismos, incluyendo los hongos fitopatógenos, cuentan con mecanismos metabólicos que inducen resistencia a estos tratamientos (Prapagdee *et al.*, 2008; Ma y Michailides, 2005), lo que genera que la utilidad de los fungicidas disminuya.

En vista de los problemas asociados al uso de fungicidas, se ha intensificado la búsqueda de nuevos agentes de control con un menor efecto negativo al ambiente, pero con una misma o mayor eficacia que los fungicidas químicos. Una alternativa es la obtención de agentes provenientes de extractos de plantas, ya que diferentes estudios han reportado propiedades antifúngicas conferidas por el amplio espectro de metabolitos secundarios que biosintetizan (Cerqueira *et al.*, 2016). Generalmente, el mecanismo de acción de extractos de plantas o metabolitos aislados a partir de ellas, está enfocado a componentes de la

membrana celular fúngica, con el fin de disminuir la viabilidad del hongo; sin embargo, en los últimos años se han propuesto diversos blancos, que buscan afectar procesos fisiológicos relacionados con la patogenicidad de los hongos, como lo es la inhibición de reguladores o activadores de la respuesta a proteínas desplegadas o mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés), que juega un papel fundamental en la virulencia del hongo (Guillemette *et al.*, 2014).

La UPR es una respuesta presente en el retículo endoplasmático (RE), orgánulo encargado de sintetizar, plegar, modificar y realizar control de calidad de numerosas proteínas; estas funciones pueden ser alteradas cuando se afecta la homeóstasis del RE, lo que ocasionará una acumulación de proteínas mal plegadas, que llevará a la activación de la UPR (Cao y Kaufman, 2012). Cuando no hay una activación o funcionamiento correcto de esta respuesta se perturba el funcionamiento de diversos procesos fisiológicos, como los relacionados con la patogenicidad de los hongos, impidiendo así el desarrollo de la infección, lo anterior se ha demostrado principalmente en hongos necrótrofos (Guillemette *et al.*, 2014).

A la fecha, hay pocos reportes de agentes sintéticos o naturales con la capacidad de inhibir la UPR (Papandreou *et al.*, 2011), los agentes naturales de origen vegetal incluyen principalmente xantonas aisladas de la corteza de *Garcinia vieillardii* y *G. virgate*, especies pertenecientes a la familia Clusiaceae, familia reconocida por la producción de xantonas (Richomme, 2018; Bruguière *et al.*, 2016).

En este trabajo se llevó a cabo la identificación de xantonas como potenciales inhibidores de UPR. La purificación se llevó a cabo empleando técnicas cromatográficas como Cromatografía FLASH y cromatografía líquida al vacío (VLC), y la identificación se realizó empleando técnicas espectroscópicas como ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, análisis bidimensionales y de desduplicación.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 FUNGICIDAS ALTERNATIVOS

Como alternativa al uso de fungicidas sintéticos, se han desarrollado otros tipos de fungicidas, como los biofungicidas, que contienen microorganismos que actúan de forma antagónica frente al patógeno, como por ejemplo, Fungifree (Agrobiotecnia, 2018), cuyo principio activo es una cepa de *Bacillus subtilis*; otra clase de fungicidas alternativos son los de origen natural como Trilogy® (Certis USA, 2015), el cual fue desarrollado a partir de aceite de semilla de *Azadirachta indica* (árbol de Neem). También se comercializan fungicidas naturales a partir de plantas nativas de México como *Chenopodium ambrosioides* (Epazote), cuyo extracto fue empleado para la formulación de Requiem® 25 CE (Bayer CropScience, 2015), e igualmente, se encuentra en proceso de patente un fungicida creado a partir de *Larrea tridentata* conocida en México como Gobernadora (Bioamin, 2018). Estos fungicidas alternativos son desarrollados gracias a resultados de numerosas investigaciones donde se prueba la actividad antifúngica que pueden poseer plantas o metabolitos aislados de estas.

1.2 PLANTAS PRESENTES EN EL CONTINENTE AMERICANO CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Ramirez y Hernandez, 2015, realizaron una compilación de diversos estudios determinando que, en América, alrededor de 143 plantas poseen actividad tóxica frente a hongos que atacan diversos cultivos. Estas plantas hacen parte de 43 familias, entre las que se destaca la familia *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Verbenaceae*, *Euphorbiaceae* y *Poaceae*. Se han descrito alrededor de 61 plantas americanas con capacidad antagonista frente a especies pertenecientes al género *Colletotrichum*, y 42 plantas con toxicidad frente a especies de los géneros *Fusarium* y *Alternaria*, géneros de mayor incidencia en América.

1.2.1 Plantas mexicanas con actividad antifúngica

En México, se han reportado un gran número de plantas con capacidad antifúngica, por ejemplo, extractos de raíz de *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Chilcuas), presentan actividad antifúngica frente a *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum lindemuthianum*

y *Sporothrix schenckii* (Damián-Badillo *et al.*, 2008; Ramírez-Chávez *et al.*, 2000). También se han realizado estudios empleando orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) y *Agave lechuguilla*; los extractos de estas dos plantas han sido reportados como inhibidores de crecimiento de *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, y *Penicillium digitatum* (Rodríguez-Guadarrama *et al.*, 2018). *Croton chichenensis* Lundell, especie de planta que se encuentra presente en la Península de Yucatán, tiene actividad antifúngica frente a *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus* sp (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008).

1.3 METABOLITOS ANTIFÚNGICOS

Teniendo en cuenta que las plantas sintetizan un amplio espectro de metabolitos, mayormente secundarios, que pueden estar relacionados con el mecanismo de defensa frente a fitopatógenos, se han identificado varios compuestos presentes en extractos de plantas que poseen actividad fungicida (Ramírez y Hernández, 2015; Cowan, 1999). Algunos ejemplos de estos compuestos es el ácido nordihidroguaiarético (Fig. 1.1a), el cual se encuentra en la resina de la planta *Larrea tridentata* (DC.) Coville, planta conocida como “Gobernadora”; este compuesto inhibe el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum coccodes* (Vargas-Arispuro *et al.*, 2009). También se ha reportado que el citropteno (Fig. 1.1b) tiene la capacidad de inhibir la propagación de hongos como *Aspergillus* sp, esta cumarina fue aislada a partir de residuos del procesamiento industrial de *Citrus aurantifolia* Swingle (De Menezes *et al.*, 2014).

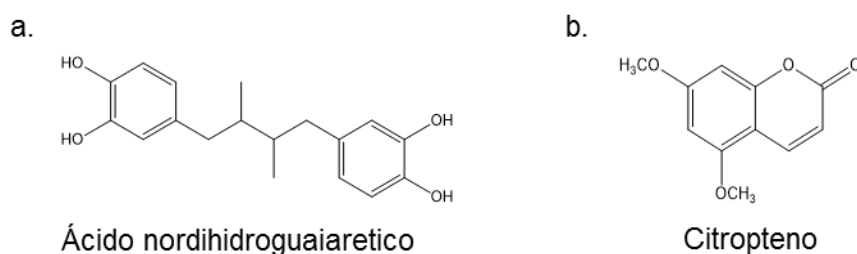


Figura 1.1 Ejemplos de metabolitos secundarios con actividad antifúngica

1.4 SITIO DE ACCIÓN DE ANTIFÚNGICOS NATURALES

La mayoría de los compuestos o extractos antifúngicos naturales, de los que se sabe su sitio de acción, están enfocados en inhibir la actividad enzimática de la enzima endo- β - (1,3) glucanasa, encargada del remodelamiento y ruptura de los enlaces β de la cadena

polisacárida (González *et al.*, 2011), además se ha demostrado que esta enzima está implicada en interacciones fúngicas patógeno-planta durante el ataque patogénico; un ejemplo de un metabolito cuyo blanco de acción sea la inhibición de endo- β - (1,3) glucanasa es el ácido nordihidroguaiarético (Vargas-Arispuro *et al.*, 2009), al igual que los extractos de *Ambrosia ambrosioides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Encelia farinosa*, *Proboscidea parviflora*, *Rizophora mangle* y *Turnera difusa* (Vargas-Arispuro *et al.*, 2017).

Otro blanco de acción de los antifúngicos naturales es el ergosterol, esterol predominante en las membranas celulares fúngicas; se ha reportado que extractos de *Phyllanthus reticula*, *Coldenia procumbens*, *Thespesia populnea* y *Senna alata* disminuyen la biosíntesis del ergosterol (Chellappandian *et al.*, 2018).

Recientemente se ha planteado la búsqueda de nuevos sitios de acción que inhiban la propagación o que afecten indirectamente la patogenicidad de los hongos, como la inhibición de reguladores o activadores de la UPR, que juega un papel fundamental en la virulencia del hongo (Guillemette *et al.*, 2014; Joubert *et al.*, 2011).

1.5 RESPUESTA A PROTEÍNAS DESPLEGADAS/ MAL PLEGADAS (UPR)

El retículo endoplasmático (RE), es un orgánulo que se encuentra en las células eucariotas y cuya función es sintetizar, plegar, modificar y realizar control de calidad de numerosas proteínas secretoras y de membrana, sin embargo, para que las proteínas puedan ser secretadas o transportadas a la superficie celular deben estar correctamente ensambladas, de lo contrario, serán retenidas y degradadas.

El correcto funcionamiento del RE puede ser alterado cuando se afecta su homeóstasis, debido a diversos factores como estrés térmico, estrés oxidativo, hipoxia, agotamiento de Ca^{2+} , privación de energía, estimulación metabólica, entre otros; lo que ocasionará una acumulación de proteínas mal plegadas (Cao y Kaufman, 2012). También se puede dar una acumulación de proteínas mal plegadas debido a mutaciones genéticas, compuestos tóxicos, o errores en el proceso de transcripción y traducción (Muñoz, 2000).

Al acumularse proteínas mal plegadas en el RE se desencadenará la activación de vías de transducción de señales intracelulares, en conjunto denominada UPR; la cual regula la expresión de genes que conservan la homeostasis en el RE, disminuyendo transitoriamente

la síntesis de proteínas, aumentando la capacidad de plegamiento del RE, y mejorando el sistema de degradación de proteínas mal plegadas; si por estas vías no se logra establecer la homeostasis del RE, la célula es llevada a apoptosis celular (Lo Presti *et al.*, 2016).

En metazoos existen tres sensores en el RE (Fig. 1.2) que activan el UPR, PERK (proteína cinasa del RE activada por ARN de doble cadena): una proteína transmembrana de tipo I con dominio citosólico de cinasa de serina/treonina, que es activada por ARN de doble cadena; un factor de transcripción, ATF6 (factor de transcripción activador 6), que inicialmente se sintetiza como una proteína transmembrana tipo II, con un dominio de factor de transcripción bZIP CREB/ATF en el extremo amino; e IRE1 (proteína cinasa dependiente de inositol), una proteína transmembrana de tipo I, dependiente de inositol, con un dominio de cinasa de serina/treonina y un dominio endoribonucleasa (RNasa) en su porción citosólica; la activación de la UPR por IRE1 es la vía más conservada, y la única presente en eucariotas inferiores. La activación de cada rama lleva a la producción de factores de transcripción, que funcionan solos o en conjunto para activar los genes objetivo de la UPR, como chaperonas que ayuden al plegamiento de proteínas o mecanismos de degradación de proteínas mal plegadas (Cao y Kaufman, 2012; Walter y Ron, 2012).

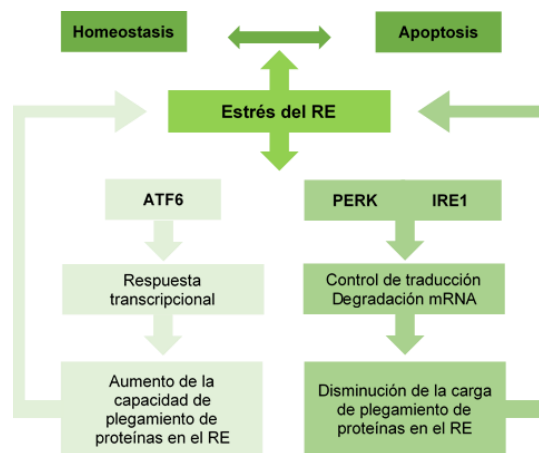


Figura 1.2 Sensores de activación y su función en la UPR.

1.5.1 Activación de UPR mediada por IRE1

La activación de IRE1 se da cuando los niveles de proteínas desplegadas son altos, lo que genera que BiP, una chaperona unida a IRE1 se disocie y se una a las proteínas desplegadas, lo que llevará a la proteína IRE1 a dimerizarse y autofosforilarse provocando la activación de su dominio RNasa. Este dominio interactúa con un ARNm denominado

HAC1 (en *Saccharomyces cerevisiae*) provocando un empalme alternativo, eliminando así un intrón no convencional (cambiando el marco de lectura), y mediante una tARN ligasa se unirán los dos fragmentos. El ARNm resultante traduce el factor de transcripción denominado Hac1p, encargado de organizar los cambios transcripcionales con el fin de devolver la homeostasis del RE, mediante chaperonas y enzimas de plegamiento. Finalmente, las proteínas que no logren ser corregidas serán eliminadas mediante la degradación asociada a RE (ERAD) (Fig. 1.3) (Krishnan y Askew, 2014). El IRE1 también puede activarse por la interacción con proteínas mal plegadas y desencadenar la activación del UPR (Walter y Ron 2012).

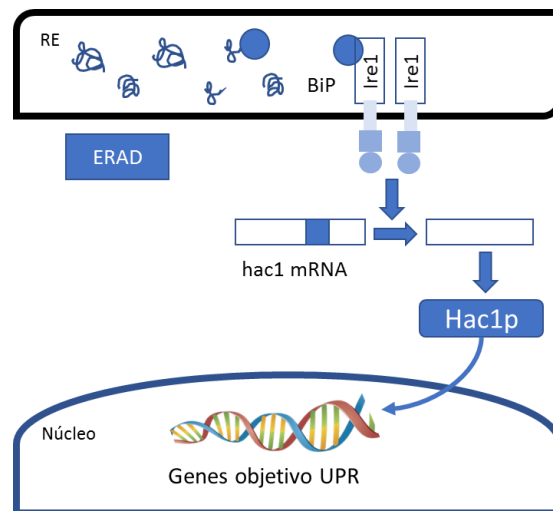


Figura 1.3 Ruta de activación del UPR mediada por IRE1. En la ruta se observa el disociamiento entre BiP e Ire1, lo que induce la interacción entre el RNAm y la porción citosólica de Ire1, que llevará a la traducción posterior del factor de transcripción dirigido a la activación de genes objetivos del UPR.

1.5.2 Inductores de UPR

Fármacos como tunicamicina (Tm) o ditiotretitol (DTT), son empleados para evaluar la expresión del UPR, ya que alteran la homeostasis del RE al afectar la N-glicosilación o al evitar la formación de enlaces disulfuro. Otro fármaco empleado en la inducción de UPR es el ácido L-azetidina-2-carboxílico (AZC), análogo de prolina que se incorpora a los polipéptidos y perturba el plegamiento de proteínas (Hawes, 2018; Wiseman *et al.*, 2018).

1.5.3 Estudios de UPR en hongos

Con el fin de determinar el papel que desempeña la UPR en la patogenicidad de los hongos, se han evaluado hongos como *Alternaria brassicicola* y *Aspergillus fumigatus*, eliminando el marco de lectura de ortólogos de HAC1 y exponiendo las cepas modificadas a inductores de estrés como Tm y DTT, lo que ha permitido observar que las cepas modificadas tienen una menor tasa de crecimiento comparadas con cepas silvestres, una morfología hifal diferente y la capacidad de asimilación de sustratos complejos es afectada, debido a la disminución en la capacidad de secreción de proteasas. Adicionalmente las cepas mutadas exhiben una mayor susceptibilidad a agentes antifúngicos cuyos mecanismos de acción estén enfocados en alterar la membrana o la pared celular (Guillemette *et al.*, 2014; Krishnan y Askew, 2014; Joubert *et al.*, 2011; Richie *et al.*, 2009).

En el caso de *A. brassicicola*, la cepa modificada es hipersensible a metabolitos de defensa del hospedador, como las fitoalexinas camalexina y brassinina, posiblemente debido a la pérdida de homeostasis en la membrana y la pared celular por la ausencia de una UPR funcional. Adicionalmente, se determinó que la cepa perdía su capacidad de virulencia, pues después de inocular hojas sanas de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica oleracea* no se observaron síntomas de enfermedad; además, se altera la germinación y la cepa pierde la capacidad para transmitirse a las semillas (Guillemette *et al.*, 2014; Joubert *et al.*, 2011).

Por otro lado, la cepa modificada de *A. fumigatus*, perdió su termotolerancia característica de esta especie, lo que puede estar asociado a la disminución de expresión de los ARNm que codifican enzimas en la ruta biosintética del ergosterol, pues este esterol, se encuentra en las membranas de los hongos y ayuda a mantener la homeostasis de esta estructura. Además, ensayos en modelos murinos demostraron que la virulencia de la cepa mutante de *A. fumigatus* fue atenuada al no observarse signos de enfermedad en los modelos expuestos (Krishnan y Askew, 2014; Richie *et al.*, 2009).

El efecto o reducción en la virulencia de otros hongos también se ha podido determinar al alterar chaperonas o moléculas implicadas en la UPR de *Pyricularia oryzae*, hongo que afecta el arroz y trigo (Qu *et al.*, 2020); o *Botrytis cinerea* que afecta entre muchas otras plantas a la uva y la fresa (Zhang *et al.*, 2019).

Además, en el caso de *Ustilago maydis* se ha determinado que para establecer una interacción con su planta huésped, *Zea mays* (maíz), necesita la secreción de proteínas efectoras; lo que ocasiona un gran aumento de proteínas nacientes en el RE, generando estrés en el orgánulo, por lo que el correcto funcionamiento de la UPR es importante para la resistencia al estrés del RE y la virulencia de *Ustilago maydis* (Schmitz *et al.*, 2019).

1.5.4 Inhibidores de UPR

A pesar de que se sabe que los hongos fitopatógenos requieren la UPR durante el proceso patogénico, lo que hace de esta respuesta un blanco terapéutico prometedor, no hay reportes de inhibidores de este evento; de los inhibidores de UPR reportados, la mayoría están dirigidos a inhibir la UPR en humanos.

Los inhibidores de UPR en humanos tienen como mecanismo de acción la inhibición del núcleo catalítico del dominio RNasa de IRE1, siendo este el blanco de acción de los inhibidores de UPR reportados: saliciladehídos, 4 μ 8C, MKC-3946, STF-083010 y toyocamicina (Fig.1.4) (Jiang *et al.*, 2015). STF-083010 y toyocamicina, también se han evaluado como inhibidores de la UPR de *Aspergillus fumigatus*, y se demostró que a pesar de que toyocamicina inhibía el UPR humano, no era capaz de afectar el crecimiento de *A. fumigatus*, por el contrario, el compuesto denominado STF-083010 inhibía el crecimiento de colonias, actuando como un fungistático, además de aumentar la toxicidad de los agentes productores de estrés y los enfocados al deterioro de la pared celular de *A. fumigatus*, además, la cepa fúngica expuesta a STF-083010 perdía la capacidad de utilizar sustratos poliméricos; con el fin de demostrar que la actividad de este compuesto estaba dirigida a la UPR, comprobaron por qPCR que se inhibía la inducción de genes diana importantes en UPR como hacA y bipA (Deck *et al.*, 2020).

Recientemente se han reportado xantonas (Fig.1.5) con actividad inhibitoria frente al UPR de una cepa modificada de *Saccharomyces cerevisiae* (Richomme, 2018); las xantonas fueron aisladas a partir de las cortezas de *Garcinia vieillardii* y *G. virgata*, especies pertenecientes a la familia Clusiaceae, la cual se destaca por la producción de xantonas polipreniladas y oxigenadas.

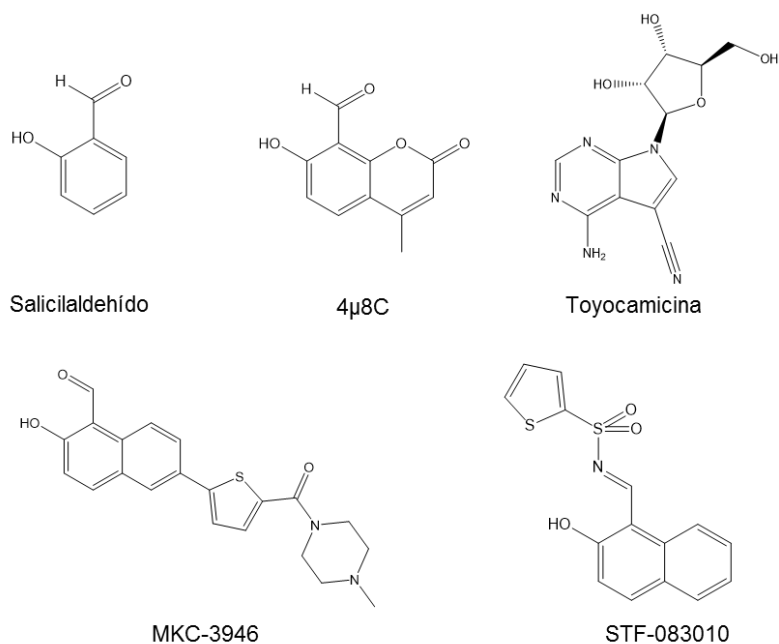


Figura 1.4 Ejemplos de inhibidores sintéticos de UPR. En diferentes estudios estos metabolitos han sido evaluados y reportados como agentes inhibidores de UPR en líneas celulares humanas.

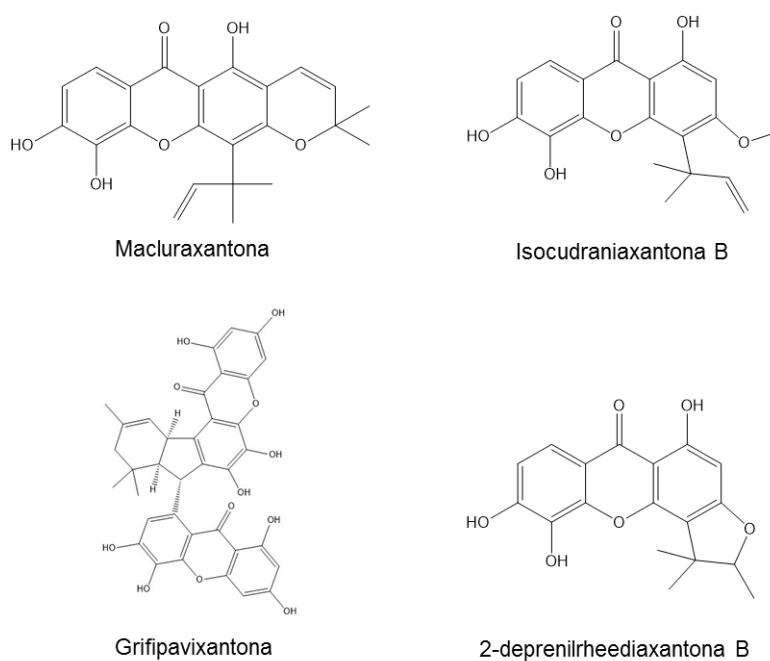


Figura 1.5 Xantonas con actividad inhibidora de UPR aisladas a partir de especies pertenecientes al género *Garcinia*

1.6 FAMILIA CLUSIACEAE

Es una familia de arbustos o árboles, que cuenta con 27 géneros y 1,090 especies (Tabla 1.1). Se encuentra distribuida principalmente en bosques húmedos, tropicales, de tierras o montañas bajas. Los géneros pertenecientes a esta familia tienen una distribución global, por ejemplo, *Garcinia* y *Calophyllum* se encuentran principalmente en Asia, pero también están presentes en el continente americano, solo que con una baja diversidad; por otro lado, el género *Clusia* sólo está presente en América (Stevens, 2007). En la Península de Yucatán se encuentran 7 especies, pertenecientes a la familia Clusiaceae: *Clusia chankiana* Lundell, *Clusia flava* Jacq., *Clusia rosea* Jacq, *Clusia suborbicularis*, *Mammea americana*, *Garcinia intermedia* (Pittier) Hammel y *Calophyllum brasiliense* Cambess (Treo-Torres y Rodríguez, 2014).

Tabla 1.1 Taxonomía de Clusiaceae

REINO	PLANTAE
DIVISIÓN	Angiospermae
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Malpighiales
FAMILIA	Clusiaceae

1.6.1 Fitoquímica de la familia Clusiaceae

Esta familia se caracteriza por la presencia de cuatro grupos importantes de metabolitos: xantonas, cumarinas, biflavonoides y benzofenonas. Cada género se caracteriza por la presencia en mayor cantidad de estos compuestos, por ejemplo en el género *Clusia* es característico detectar benzofenonas poliisopreniladas (Lokvam *et al.*, 2000), mientras que el género *Calophyllum* además de los compuestos mencionados poseen flavonoides y triterpenos (Noldin *et al.*, 2006) y el género *Garcinia* cuenta con componentes característicos como el ácido hidroxícitrico y el garcinol, además de ser una fuente enriquecida de xantonas (Hemshkhar *et al.*, 2011).

Uno de los metabolitos más característicos de la familia Clusiaceae son las xantonas (Ruan *et al.*, 2017), ya que este tipo de metabolitos no están presentes en muchas familias. Las xantonas preniladas están ampliamente distribuidas en esta familia, además de la presencia de xantonas mono y dioxigenadas (Negi *et al.*, 2013; Bennett y Lee, 1989); sin embargo, de acuerdo a cada género será común hallar determinado tipo de xantonas, por ejemplo, en el género *Callophyllum* se encontrará con mayor frecuencia xantonas simples y con patrones de oxigenación 1,5-, 1,7- y 1,5,6-; mientras que en el género *Garcinia* la presencia de xantonas preniladas será mayor; por otro lado, la presencia de xantonas en el género *Clusia* es muy escasa (Bennett y Lee, 1989).

Diversas xantonas han sido reportadas en varias especies de esta familia, por ejemplo, en *Mesua hexapetala* se ha descrito trapesifolixantona y cudraxantona G (Fig.1.6a-b) (Karunakaran *et al.*, 2016). En *Garcinia mangostana* L., una de las especies más estudiadas, se reportan más de 60 xantonas como β -mangostina, garcinona B (Fig.1.6c-d), entre otras (Obolskiy *et al.*, 2009). Otra especie a la que se le han reportado una cantidad abundante de xantonas es *Callophyllum caledonicum*, donde se reportan trece xantonas nuevas, entre ellas Caledonixantona D y dehidrocicloguanadina (Fig.1.6e-f) (Morel *et al.*, 2000). Estudios realizados a partir de la corteza del tallo, raíces, hojas y frutos de *Pentadesma grandifolia* Baker f. han mostrado la presencia de las xantonas cowagarcinona B y alfa-mangostina en esta planta (Fig.1.6g-h) (Djoufack *et al.*, 2010). Además, estudios sobre la fitoquímica de *C. brasiliense* determinaron la presencia de diversas xantonas como Jacareubina y calofilina B (Fig. 1.6i-j) (García-Zebadúa *et al.*, 2014).

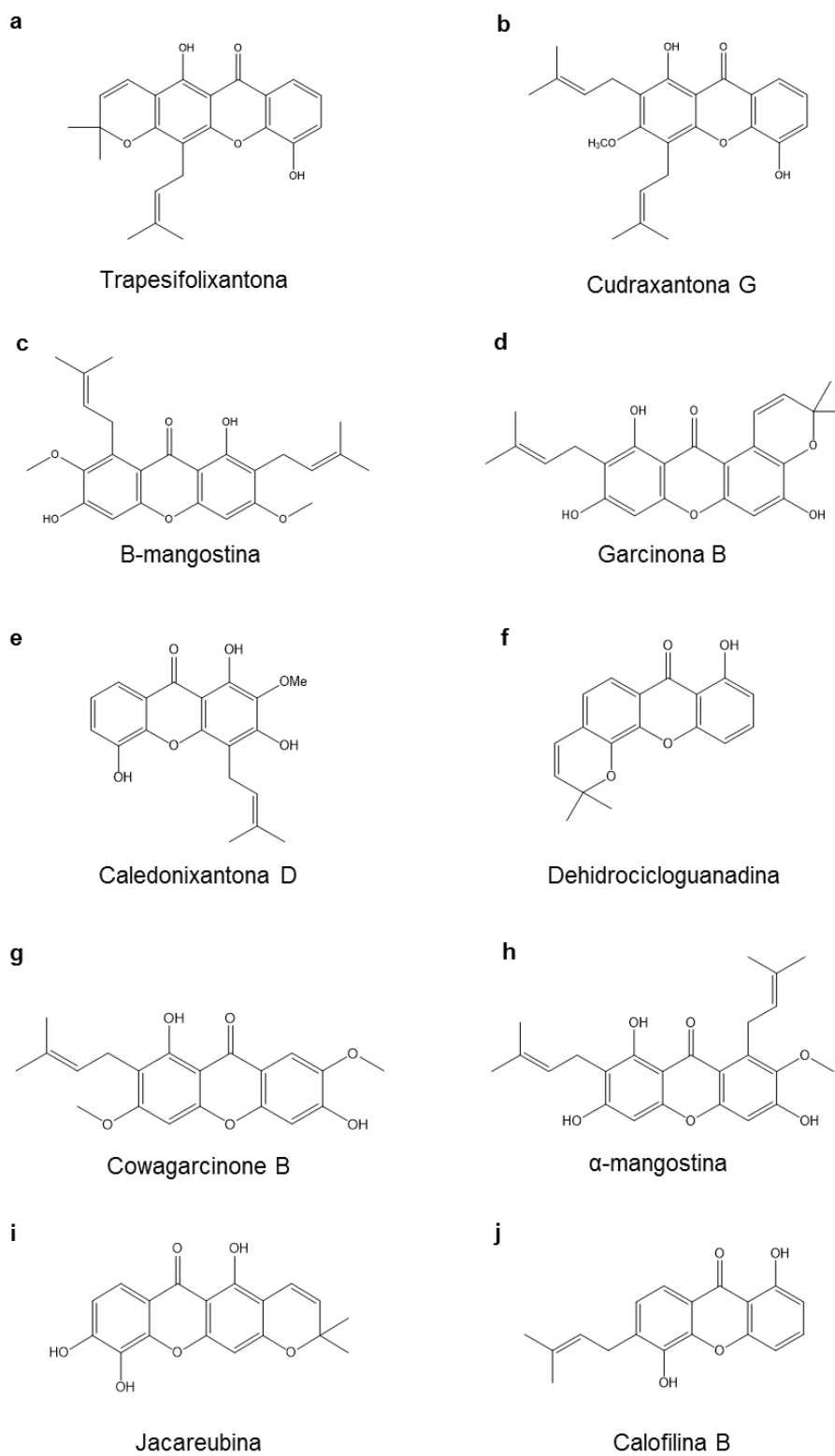


Figura 1.6 Ejemplo de xantonas presentes en la familia Clusiaceae. Estas xantonas han sido reportadas en plantas de los géneros *Mesua*, *Garcinia*, *Calophyllum* y *Pentadesma*.

1.6.2 Actividad antifúngica

En la familia Clusiaceae se han reportado diversas especies que poseen actividad antifúngica, como *Garcinia kola*, cuyo extracto tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* (Salih *et al.*, 2017), *Candida* sp y *Candida albicans* (Badger-Emeka *et al.*, 2018; Salih *et al.*, 2017), igualmente, el extracto de *Calophyllum brasiliense* tiene la capacidad de inhibir a *C. albicans* (García-Zebadúa *et al.*, 2014). También hay reportes de xantonas aisladas a partir de plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae, que tienen la capacidad de afectar el crecimiento de diferentes hongos, como xantonas aisladas a partir de *Calophyllum caledonicum*: Caledonixantona E, caledol y dicaledol (Fig. 1.7a-c), que son activas frente a *Aspergillus fumigatus* y/o *A. flavus* (Fotie y Bohle, 2006; Oger *et al.*, 2003). Este tipo de metabolitos también son activos frente a agentes fitopatógenos como *Cladosporium cucumerinum*, el cual fue inhibido por xantonas presentes en *Calophyllum thwaitesii*, como 1-hidroxi-5,6-dimetoxixantona (Fig.1.7d) (Dharmaratne *et al.*, 2009). Por otro lado, 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3- dimetilalil)-xantona (Fig.1.7e), entre otras xantonas aisladas a partir del duramen de *Calophyllum brasiliense* mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Postia placenta*, agente causal de la pudrición marrón en madera (García-Zebadúa *et al.*, 2014).

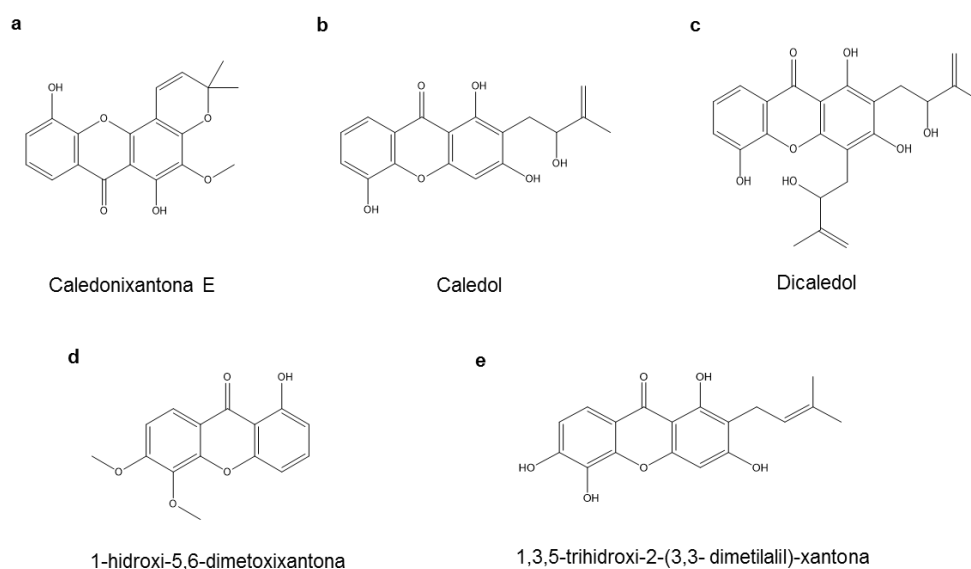


Figura 1.7 Ejemplos de xantonas con actividad antifúngica presentes en la familia Clusiaceae.

Estas xantonas fueron aisladas a partir de especies del género *Garcinia* y *Calophyllum*, y son activas frente a especies de hongos patógenos humanos como especies de *Aspergillus* y *Candida*, así como frente a fitopatógenos como *Cladosporium cucumerinum* y *Postia placenta*.

JUSTIFICACIÓN

Según estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el año 2017, en la mayoría de los países se emplearon entre 4 000 y 1 800 000 toneladas de ingredientes activos de pesticidas, entre los que se encuentran clasificados los fungicidas. Teniendo en cuenta la alta demanda de fungicidas, y las desventajas que pueden presentar los productos que existen en el mercado, se buscan nuevos antifúngicos, enfocados a otros sitios de acción diferentes a los ya establecidos; es por esto por lo que la inhibición de la UPR puede ser un objetivo para el desarrollo de nuevos fungicidas a partir de compuestos naturales, ya que esta respuesta es importante en la patogénesis de los hongos, y se ha reportado xantonas aisladas a partir de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae que tienen la capacidad de inhibir esta respuesta.

Dentro de la Península de Yucatán se encuentran *C. brasiliense* y *G. intermedia*, especies que pertenecen a la familia Clusiaceae, reconocida por la producción de xantonas. Alrededor de 40 xantonas diferentes obtenidas a partir de *C. brasiliense* han sido reportadas, y aunque no hay muchos reportes acerca de la fitoquímica de *G. intermedia*, es conocido que este género se caracteriza por la presencia de xantonas; lo que hace que estas plantas sean fuentes potenciales de xantonas con capacidad de inhibir la UPR.

HIPÓTESIS

Dado que xantonas producidas por *Garcinia vieillardii* y *G. virgata* tienen la capacidad de inhibir la UPR, es posible que *G. intermedia* y *C. brasiliense* pertenecientes también a la familia Clusiaceae, produzcan xantonas con potencial actividad inhibitoria de UPR.

OBJETIVOS

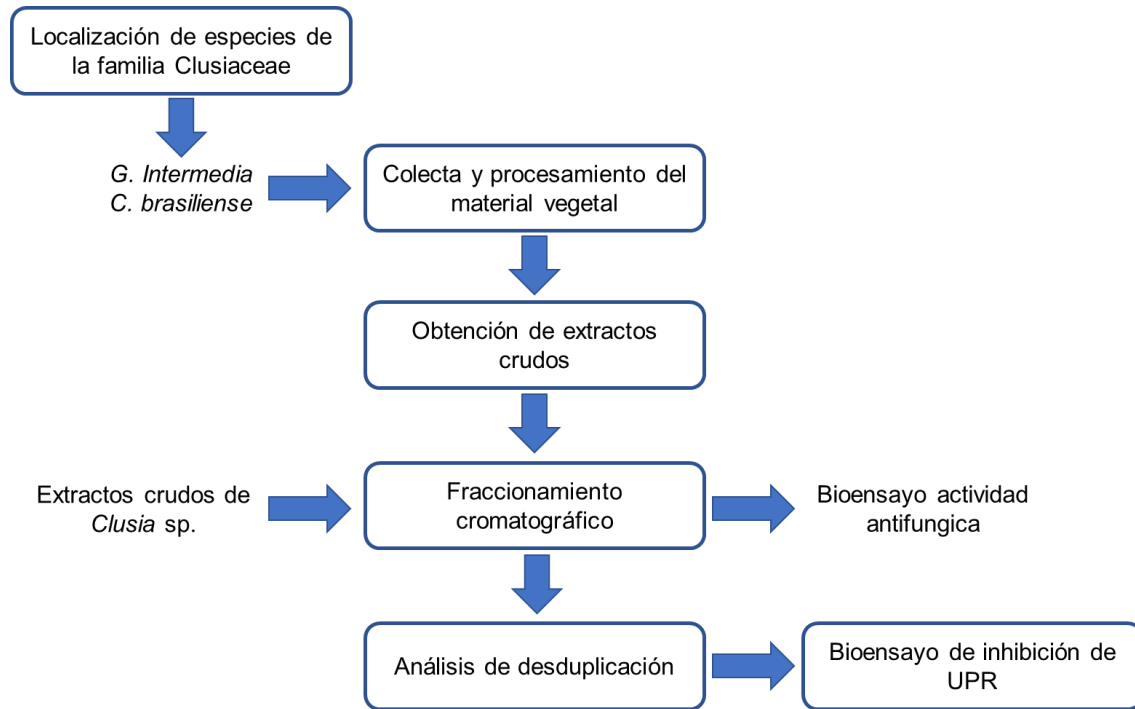
Objetivo general

Identificar xantonas producidas por *G. intermedia* y *C. brasiliense* con potencial actividad inhibitoria de la UPR.

Objetivos específicos

1. Identificar la distribución de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae en la Península de Yucatán.
2. Establecer el tipo de xantonas presentes en las fracciones semipuras obtenidas.
3. Determinar la posible capacidad inhibidora de UPR de las xantonas identificadas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

BÚSQUEDA DE XANTONAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN PLANTAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA Clusiaceae PRESENTES EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.

2.1 INTRODUCCIÓN

Las xantonas (xanton: palabra derivada de la palabra griega “xanthos”, que significa amarillo), son un tipo de metabolito compuesto por tres anillos hexacíclicos: dos anillos aromáticos fusionados a través de un grupo carbonilo y un átomo de oxígeno (Mazimba *et al.*, 2013); este tipo de metabolitos son de gran importancia en la industria farmacéutica ya que se ha descrito que tienen actividad frente a bacterias, hongos, virus y parásitos; además poseen capacidades antiinflamatorias, antidiabéticas, antitumorales, antihistamínicas, y son clasificadas como “superantioxidantes” (Mazimba *et al.*, 2013; Fotie y Bohle, 2006; Peres *et al.*, 2000). Este grupo de metabolitos secundarios se encuentran restringidos a pocas familias de plantas superiores, líquenes y hongos; en plantas son encontradas principalmente en la familia Clusiaceae (55 especies en 12 géneros) y Gentianaceae (28 especies en 8 géneros) (Ruan *et al.*, 2017; Negi *et al.*, 2013; Vieira y Kijjoa, 2005). En la familia Clusiaceae es común encontrar xantonas simples di y tetraoxigenadas, además de xantonas preniladas. Las xantonas simples monoxigenadas se encuentran con mayor frecuencia en los géneros *Calophyllum*, *Kielmeyera* y *Caraipa*, y las xantonas con patrones de oxigenación 1,5; 1,7 y 1,5,6 en los géneros *Calophyllum*, *Mesua* y *Mammea*. Por otro lado, las xantonas preniladas trioxigenadas se encuentran distribuidas ampliamente en varios géneros de la familia Clusiaceae, mientras que las xantonas preniladas di y hexaoxigenadas y las xantonas preniladas “enjauladas/caged” son encontradas principalmente y casi exclusivamente en el género *Garcinia*; en los géneros *Cudrania* y *Maclura* es usual encontrar xantonas preniladas con cuatro grupos hidroxilo, mientras que las xantonas preniladas mono y dioxygenadas pueden ser halladas en las especies pertenecientes al género *Callophyllum*. En algunos géneros pertenecientes a esta familia, como *Clusia* las xantonas se encuentran con poca frecuencia (Vieira y Kijjoa, 2005; Bennett y Lee, 1989).

Las plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae se encuentran en bosques húmedos, tropicales, de tierras o montañas bajas. Un gran número de géneros de esta familia están localizados en América, principalmente en sur América como, por ejemplo: *Clusia*, *chrysochlamys*, *Dystovomita*, *Havetiopsis*, *Lorostemon*, *Moronobeia*, *Platonía*, *Quapoya*, *Tovomitopsis*, *Tovomita*; también hay especies en el continente africano, pertenecientes a los géneros *Lebrunia*, *Allanblackia*, *Pentadesma*, *Endodesmia* y *Mammea* (también presente en América y en Madagascar). Por otro lado, el género *Calophyllum* tiene una distribución global, pues especies pertenecientes a este género pueden encontrarse tanto en América, como en África, Asia y Oceanía; en contraste con algunas especies que están restringidas a una localidad, como por ejemplo *Montrouziera*, que solo se encuentra en Nueva Caledonia y *Agasthiyamalaia* en India. Adicionalmente, el género *Garcinia* tiene varias especies en el Viejo mundo, y una baja distribución en América; y el género *Symphonia* tiene una distribución anatlántica (“Plants of the World Online | Kew Science”, s/f, 2020; Stevens, 2007). En la Península de Yucatán, hay pocas especies reportadas que hacen parte de la familia Clusiaceae, entre ellas se encuentra *Calophyllum brasiliense*, *Garcinia intermedia*, *Mammea americana*, *Clusia rosea*, *Clusia lundelli*, *Clusia suborbicularis* y *Clusia flava* (Villaseñor, 2016; Treo-Torres y Rodríguez, 2014).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Procedimientos experimentales generales

La evaporación del solvente se llevó a cabo empleando un rotoevaporador Büchi RE111 con un baño de agua a 35°C. En los análisis de cromatografía en capa fina (CCD) se emplearon placas de gel de sílice con respaldo de aluminio (60 F₂₅₄) (E.M. Merck, espesor de 0,2 mm); como agente revelador se empleó una solución de ácido fosfomolibódico (20 g) y sulfato de cerio (IV) (2,5 g) en ácido sulfúrico (500 ml, 5%), en la cual se sumergieron las placas, seguido de secado y calentamiento suave. La purificación mediante cromatografía FLASH se realizó usando gel de sílice de alta pureza (Sigma-Aldrich; tamaño de malla 200-400), mientras que las purificaciones por cromatografía líquida al vacío se llevaron a cabo usando gel de sílice grado CCD 60 F₂₅₄ (E.M. Merck). Los análisis de CG-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 7890B acoplado a un detector selectivo de masas 5977A (condiciones de CG: columna Agilent 30 m x 250 µm x 0,25 µm), velocidad de flujo (N) de 1 ml/min; el programa que se utilizó

consistió en una temperatura inicial de 110°C por 2 min; seguido de un aumento de temperatura por 15 minutos hasta llegar a 260 °C, manteniendo la temperatura por 3 minutos, seguido de una rampa de temperatura por 2 minutos alcanzado una temperatura de 280 °C que fue mantenida por 10 minutos. Los componentes detectados a partir del análisis por GC-MS fueron identificados comparando los patrones de fragmentación obtenidos con los encontrados en la librería de espectros de masa NIST/NIH/EPA.

2.2.2 Material vegetal

Se realizó una búsqueda en la base de datos del herbario de CICY, para determinar la localización de las especies pertenecientes a la familia Clusiaceae que se encuentran en la Península de Yucatán. Posteriormente, se realizaron colectas de material vegetal de las especies *Garcinia intermedia* y *Calophyllum brasiliense*, recolectando ramas y corteza. Se colectó material vegetal de *G. intermedia* en Cobá, Quintana Roo, en el mes de noviembre del 2018; en el caso de *C. brasiliense*, se realizaron dos colectas: una en Mérida, Yucatán, en diciembre del 2018 y en Calakmul, Campeche, en marzo del siguiente año. El material recolectado se secó bajo luz artificial por tres días.

En cada salida de campo se recolectó un espécimen de resguardo, el cual se depositó en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo los números de folio 70873 (*G. intermedia*), 70874 (*C. brasiliense*, colectado en Calakmul) y 72345 (*C. brasiliense*, colectado en Mérida).

2.2.3 Extracción del material vegetal

Las ramas (0,8 kg) y la corteza (1,3 kg) de *G. intermedia*; al igual que las ramas (0,3 kg) y corteza (0,4 kg) de *C. brasiliense* colectadas en Mérida y Calakmul, se sometieron a extracción etanólica, por 48 horas (3 veces) a temperatura ambiente. Después de un proceso de filtrado, los extractos se evaporaron por presión reducida.

Al concentrar bajo presión reducida se obtuvo el extracto crudo de ramas y corteza de *G.intermedia*, y de los dos individuos colectados de *C.brasiliense* (Tabla 2.1).

Tabla 2. 1 Rendimiento de los extractos crudos obtenidos a partir del material vegetal procesado

Material vegetal	<i>G. intermedia</i>	<i>C. brasiliense</i> (Mérida)	<i>C. brasiliense</i> (Calakmul)
Ramas	52.0 g (6,2 %)	22,8 g (7,7%)	14,5 g (4,4%)
Corteza	206,6 g (16,1%)	60,2 g (14,8%)	50,1 g (16,1%)

2.2.4 Partición líquido-líquido de los extractos crudos

A partir de los extractos crudos obtenidos de la ramas y corteza de *G. intermedia* y *C. brasiliense*, y de extractos crudos de corteza de *Clusia flava*, *C. rosea* y *C. suborbicularis* y fruto de *C. rosea* (obtenidos en nuestro grupo de investigación) se realizó una partición líquido-líquido, para lo cual se suspendió 1 g del extracto crudo en una mezcla de H₂O/MeOH 3:2, y el resultado de la suspensión acuosa se particionó sucesivamente con Hexano (x3, 2:1 v:v solvente: suspensión acuosa), acetato de etilo (x3, 2:1), y butanol saturado con agua (1:1), obteniendo así fracciones de baja, media y alta polaridad (Tabla 2.2).

Tabla 2. 2 Rendimientos de las fracciones obtenidas a partir de la partición de los extractos crudos procesados

		Fracción hexánica	Fracción de acetato de etilo	Fracción butanólica
<i>G. intermedia</i>	Ramas	183.0 mg (18.3%)	635.2 mg (63.5%)	27.7 mg (2,8%)
	Corteza	209.1 mg (20.9%)	587.2 mg (58.7%)	36.2 mg (3.6%)
<i>C. brasiliense</i> (Mérida)	Ramas	200.4 mg (20.0%)	222.2 mg (22.2%)	33.3 mg (3.3%)
	Corteza	551.3 mg (55.1%)	319.2 mg (31.9%)	10.0 mg (1.0%)
<i>C. brasiliense</i> (Calakmul)	Ramas	249.2 mg (25.1%)	122.0 mg (12.2%)	31.8 mg (3.2%)
	Corteza	530.4 mg (53.0%)	293.3 mg (29.3%)	13.8 mg (1.4%)
<i>Clusia flava</i>	Corteza	73.8 mg (7.4%)	289.3 mg (28.9%)	3,2 mg (0.3%)
<i>C. suborbicularis</i>	Corteza	186.1 mg (18.6%)	759.2 mg (76.0%)	24.2 mg (2.4%)
<i>C. rosea</i>	Corteza	116.8 mg (11.7%)	448.2 mg (44.8%)	32.9 mg (3.3%)
	Fruto	67.3 mg (6.7%)	133.3 mg (13.3%)	8.4 mg (0.8%)

2.2.5 Bioensayo antifúngico de difusión de disco: Prueba de germinación de esporas

El extracto crudo y las fracciones de hexano, acetato de etilo y butanol de todos los extractos crudos particionados se disolvieron, separadamente en una mezcla de MeOH/CH₂Cl₂ 1:1, de tal forma que se obtuvo el extracto o las fracciones a una concentración de 50 mg/mL (5%). Posteriormente, se aplicó 10 µL sobre un disco de papel filtro (6mm, Whatman No.1) y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una suspensión de esporas (0,5 mL) a una concentración de 1×10^6 esporas/mL de los hongos a evaluar (*Fusarium oxysporum* o *Colletotrichum gloeosporioides*) se distribuyó uniformemente sobre la superficie de una caja de agar PDA, con ayuda de un cepillo estéril. Los discos impregnados con los extractos se colocaron sobre la superficie del agar inoculado, siguiendo el esquema de la Figura 2.1.

Como control positivo se empleó Neomicol (4 μ L/disco) y una mezcla de MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 como control negativo. Los agares se incubaron a temperatura ambiente y luz natural, por 72 horas. Este procedimiento se realizó por duplicado.

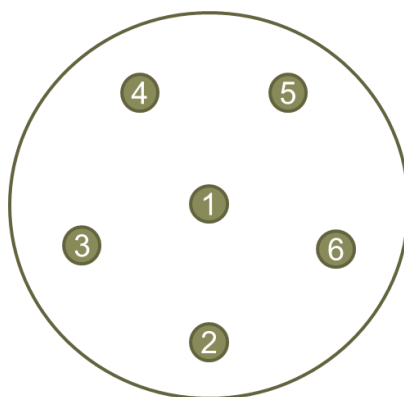


Figura 2.1 Esquema de la posición de los discos de papel en el bioensayo antifúngico de difusión de disco. 1: Neomicol; 2: MeOH/CH₂Cl₂ 1:1; 3: Extracto crudo; 4: Fracción de hexano; 5: Fracción de Acetato de Etilo; 6: Fracción de Butanol.

2.2.6 Purificación de los extractos

2.2.6.1 Corteza de *G. intermedia*

La fracción de baja polaridad (2,3 g) obtenida a partir del extracto crudo de la corteza de *G. intermedia* se purificó por cromatografía flash usando una elución isocrática de CH₂Cl₂:Hx:MeOH (40:28:2 v/v) y empleando una columna de 50mm; mediante seguimiento a través de CCD se reunieron las fracciones con perfiles similares obteniendo 10 fracciones principales (GIC-2A-A a GIC-2A-J).

La fracción de acetato de etilo (9 g) obtenida a partir del extracto crudo de *G. intermedia* se purificó usando VLC, se utilizó una columna de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura y una elución con mezclas de polaridad creciente de Hx:An:MeOH (100:0:0 – 60:38:2) (*G. intermedia*). Se colectaron fracciones de 200 mL, fueron monitoreadas por CCD y

combinadas en fracciones principales según su perfil cromatográfico, con lo que se obtuvieron 11 fracciones (GIC-2B-A a GIC-2B-K).

2.2.6.2 Corteza de *C. brasiliense* (Calakmul)

A partir de la corteza de *C. brasiliense* (Calakmul) se obtuvieron 9 g de fracción hexánica, los cuales se purificaron mediante VLC, utilizando una columna de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura y una elución con mezclas de polaridad creciente de Hx:An (100:0 – 70:30). Se colectaron fracciones de 200 mL, fueron monitoreadas por CCD y combinadas en 13 fracciones principales según su perfil cromatográfico (CBC-2A-A a CBC-2A-M).

Se empleó VLC para purificar la fracción de acetato de etilo (8 g), utilizando una columna de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura y una elución con mezclas de polaridad creciente de Hx:An (100:0 – 88:12). De acuerdo con el seguimiento por CCD, se obtuvieron 12 fracciones principales (CBC-2B-A a CBC-2B-L).

2.2.6.3 Corteza de *C. brasiliense* (Mérida)

La fracción hexánica (18 g) obtenida a partir del extracto crudo de la corteza de *C. brasiliense* (colectado en Mérida), se purificó mediante cromatografía líquida al vacío (VLC), utilizando una columna de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura y una elución con mezclas de polaridad creciente de Hx:An (100:0 – 70:30). Se colectaron fracciones de 200 mL, fueron monitoreadas por CCD y combinadas en 16 fracciones principales según su perfil cromatográfico (CBM-2A-A a CBM-2A-P).

Se empleó VLC para purificar la fracción de acetato de etilo (7g), utilizando una columna de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura y como fase móvil, una elución con mezclas de polaridad creciente de Hx:An (100:0 – 88:12). De acuerdo con el seguimiento por CCD se obtuvieron 14 fracciones principales (CBM-2B-A a CBM-2B-N).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Localización de especies de la familia Clusiaceae en la Península de Yucatán

De acuerdo con Stevens, 2007, la familia Clusiaceae cuenta con 27 géneros y 1090 especies. En México, solo se encuentran 7 géneros y 23 especies pertenecientes a esta familia (Villaseñor, 2016) y específicamente en la Península de Yucatán se encuentran

localizadas 4 géneros y 7 especies (Treo-Torres y Rodríguez, 2014) (Tabla 2.3); y de acuerdo con la base de datos del Herbario del CICY, estas especies tienen una gran distribución en la Península de Yucatán, aunque en esta base de datos no se encuentren reportes de *M. americana* (Fig. 2.2).

Tabla 2. 3 Plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae presentes en México.

Género	N° de especies	Especies en México
<i>Calophyllum</i>	186	<i>C. brasiliense</i> *
<i>Chrysochlamys</i>	4	<i>C. nicaraguensis</i> <i>C. guatemaltecana</i>
<i>Clusia</i>	300	<i>C. belizensis</i> <i>C. flava</i> * <i>C. gentlei</i> <i>C. guatemaltensis</i> <i>C. lundellii</i> * <i>C. lusoria</i> <i>C. massoniana</i> <i>C. minor</i> <i>C. ovigera</i> <i>C. pringlei</i> <i>C. quadrangula</i> <i>C. rosea</i> * <i>C. salvinii</i> <i>C. suborbicularis</i> * <i>C. tetra-trianthera</i>
<i>Garcinia</i>	260	<i>G. macrophylla</i> <i>G. intermedia</i> *
<i>Mammea</i>	75	<i>M. americana</i> *
<i>Marila</i>	40	<i>M. laxiflora</i>
<i>Symphonia</i>	23	<i>S. globulifera</i>

Un asterisco (*) indica que esas especies se encuentran en la Península de Yucatán

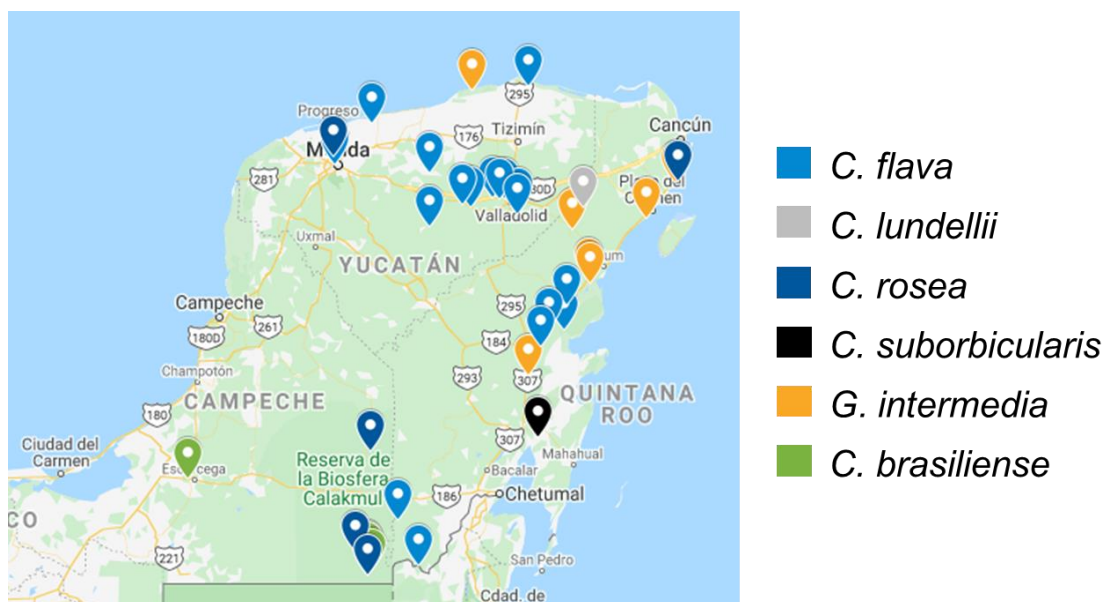


Figura 2.2 Distribución de plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae en la Península de Yucatán

2.3.1 Partición líquido-líquido de los extractos crudos

Durante la colecta de material vegetal, se recolectaron dos individuos de *C. brasiliense* de poblaciones diferentes: uno fue colectado en el centro de la ciudad de Mérida, Yucatán; y el otro en la reserva natural de Calakmul, Campeche. A partir de los perfiles cromatográficos de los dos individuos se pudo establecer que a pesar de que posiblemente tengan metabolitos en común, algunos metabolitos sólo están presentes en uno de los individuos de *C. brasiliense*, o por lo menos en una mayor concentración. Por ejemplo, en los perfiles cromatográficos de ramas de los dos individuos, se observó un metabolito (RF:0,5) que solo está presente en el individuo colectado en Calakmul, mientras que, en el individuo colectado en Mérida, se observó un metabolito con RF de 0,6 únicamente en este ejemplar. De igual forma, en los perfiles de la corteza de los dos individuos de *C. brasiliense*, se comprobó que hay metabolitos que están presentes en solo uno de los individuos, en este caso los metabolitos con RF: 0,7 y 0,9 solo estaban presentes en el individuo colectado en Calakmul, y el individuo colectado en Mérida era el único que contenía metabolitos observables bajo radiación UV (Fig. 2.3).

De igual forma, los perfiles cromatográficos de las fracciones de baja y mediana polaridad obtenidas a partir del extracto crudo de la corteza de los dos individuos de *C. brasiliense*

colectados, mostraron diferencias entre los individuos, ya que algunos metabolitos solo estaban presentes en uno de ellos (Fig.2.4).

Sistema de solventes empleado Hx:AcOEt:MeOH 75:23:2.
Reveladores: A. Ácido fosfomolibdico B: UV (366 nm)

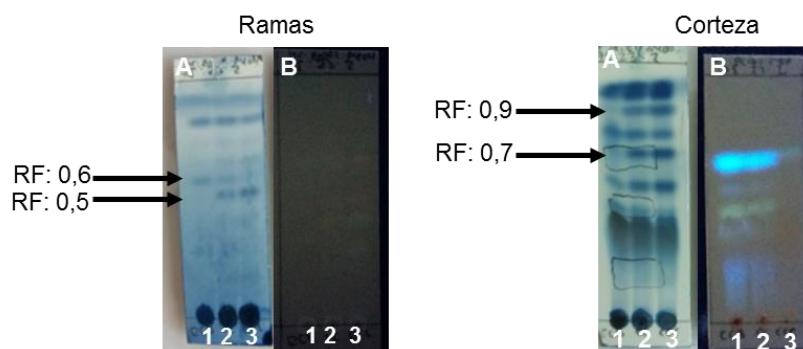


Figura 2.3 Perfiles cromatográficos de extractos crudos de dos individuos de *C. brasiliense*.
1: Mérida 2: Co-cromatografía 3: Calakmul

Sistema de solventes empleado: CH₂Cl₂:Hx: MeOH 80:18:2.
Revelador: Ácido fosfomolibdico

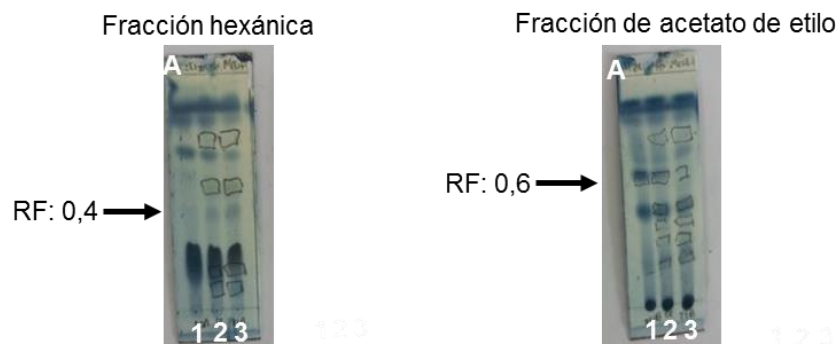


Figura 2.4 Perfiles cromatográficos de fracciones obtenidas a partir del extracto crudo de corteza de dos individuos de *C. brasiliense*.
1: Calakmul 2: Co-cromatografía 3: Mérida

Las diferencias en la fitoquímica de los dos individuos de *C. brasiliense* observadas en los perfiles cromatográficos (Fig. 2.3 y 2.4), puede ser el resultado del ambiente al que cada uno estaba expuesto, recordando que uno de los individuos fue colectado en la ciudad y el otro en una reserva natural. Se ha reportado que factores como el nivel de CO₂ afecta la composición química de las plantas, y que los metabolitos secundarios sintetizados por las

plantas al ser importantes para interactuar con el medio ambiente donde crecen y superar las condiciones de estrés a las que están expuestas (como la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de agua, la composición del suelo, entre otras) serán diferentes de acuerdo a las condiciones a las que la planta se encuentre sometida (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Adicionalmente, se ha reportado en México la presencia de 2 quimiotipos de *C. brasiliense*, basados en la fitoquímica de las hojas: El quimiotipo uno (QTP1), contiene en sus hojas principalmente cumarinas tipo mammea, mientras que las hojas del quimiotipo dos (QTP2) cuentan con cromanonas, como componentes mayoritarios y dipiranocumarinas tetracíclicas, como componentes minoritarios; de acuerdo a su composición el QTP1 posee actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares, mientras que el QTP2 tienen capacidad antiviral. Las diferencias entre la fitoquímica de los dos quimiotipos puede estar dada debido a un proceso evolutivo del taxón, ya que se ha realizado un análisis filogenético de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) de los dos quimiotipos reportados y se determinó que habían diferencias en la región ITS de los dos quimiotipos (García-Zebadúa *et al.*, 2014), por lo que es posible que las dos poblaciones colectadas pertenezcan a dos quimiotipos diferentes, sin embargo, no se puede confirmar esto ya que los estudios reportados solo se han basado en la fitoquímica de las hojas, y los estudios realizados en este estudio se centraron en la corteza y las ramas de *C. brasiliense*.

Por otro lado, los perfiles cromatográficos por CCD de las fracciones obtenidas a partir de los extractos crudos de ramas y corteza de *Garcinia intermedia* permitieron observar la distribución de los compuestos en las fracciones hexánicas, de acetato de etilo y butanol.

Teniendo en cuenta que las xantonas son productos polifenólicos, que han sido reportados como compuestos antioxidantes (Fotie y Bohle, 2006), se empleó 2,2 -difencil- 1- picrilhidrazil (DPPH), un revelador que es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes que le ceden un átomo de hidrógeno (Blois, 1958), lo que revela metabolitos antioxidantes. Al emplear DPPH para revelar las CCD de *G. intermedia*, se determinó la presencia de diferentes metabolitos antioxidantes, la mayoría de carácter polar (Fig. 2.5). Además, se compararon las fracciones hexánicas y de acetato de etilo obtenidas a partir de extractos crudos de la corteza de 3 especies de *Clusia* y del fruto de *C. rosea*; los perfiles cromatográficos de estas fracciones mostraron que hay metabolitos en común en todas las

especies, y de acuerdo con el revelador DPPH, contienen metabolitos antioxidantes de carácter polar (Fig. 2.6).

Sistema de solventes empleado: CH₂Cl₂:Hx: MeOH 80:18:2.
Reveladores: A: Ácido fosfomolibdico; B: DPPH

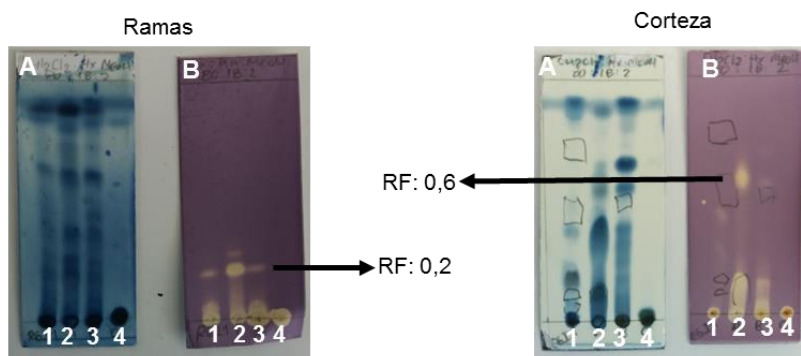


Figura 2.5 Perfiles cromatográficos por CCD de fracciones obtenidas a partir de extracto crudo *G. Intermedia*. 1: Extracto crudo 2: Fracción de hexano 3: F. Acetato de etilo 4: F. de butanol

Sistema de solventes empleado Hx:An 8:2.
Reveladores: A: Ácido fosfomolibdico B: DPPH

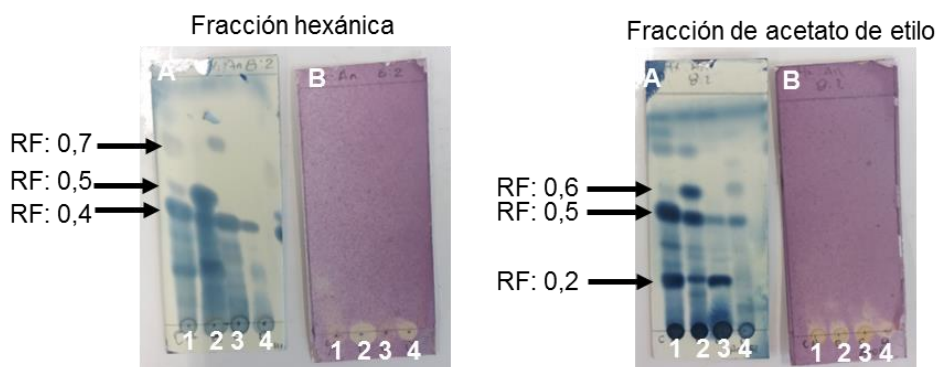


Figura 2.6 Perfiles cromatográficos por CCD de fracciones obtenidas a partir de extractos crudos de especies de *Clusia*. 1: *C. flava* 2: *C. rosea* 3: *C. suborbicularis* 4: Fruto de *C. rosea*

2.3.2 Bioensayo antifúngico de difusión de disco: Prueba de germinación de esporas

La concentración de esporas inoculadas sobre el medio de cultivo fue alrededor de 1×10^6 esporas/mL, por lo que se realizó conteo de esporas con cámara de Neubauer de las soluciones a inocular (Fig.2.7).

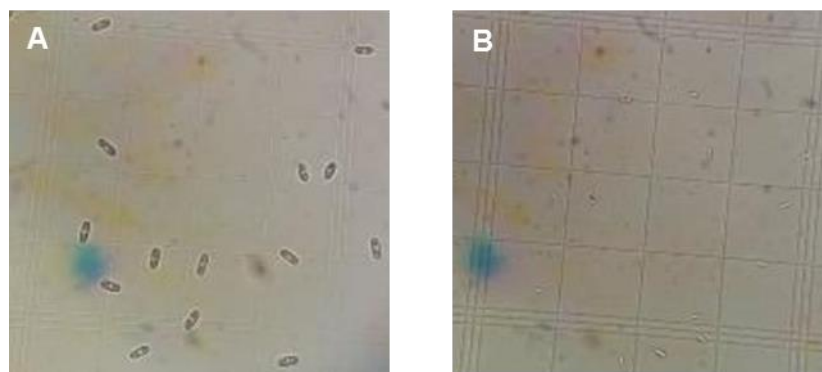


Figura 2.7. Imagen microscópica del recuento de esporas empleando una cámara de Neubauer
A. Esporas de *C. gloeosporioides*. B. Esporas de *F. oxysporum*

Los extractos crudos y fracciones obtenidas a partir de diferentes especies de *Clusia*, y de las ramas y corteza de *G. intermedia* y *C. brasiliense* evaluados no inhibieron la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* ni de *F. oxysporum* (Fig. 2.8), sin embargo, se han realizado estudios a partir de extractos del duramen de *C. brasiliense*, donde se determinó que extractos de esta planta tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Postia placenta*, un hongo fitopatógeno que causa pudrición parda en madera (Reyes-Chilpa *et al*, 1997).

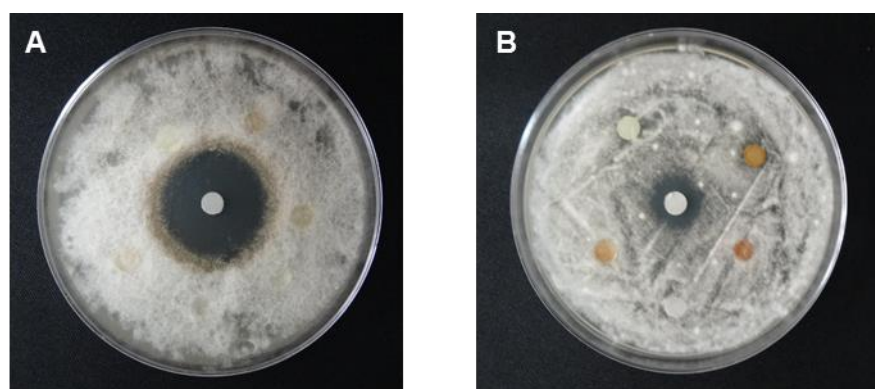


Figura 2.8 Resultado negativo de los ensayos de difusión en disco
A. *C.gloeosporioides*. B. *F.oxysporum*

2.3.3 Purificación de los extractos

Debido a que las especies de *Clusia* no son una fuente rica en xantonas, se decidió purificar las fracciones obtenidas a partir de la corteza de *G. intermedia* y *C. brasiliense*, teniendo en cuenta que a partir de la corteza de otras especies pertenecientes a estos géneros se han identificado xantonas.

- ***Garcinia intermedia***

Partiendo de la fracción hexánica de la corteza de *G. intermedia* se realizó una cromatografía FLASH, a partir de la cual se obtuvo 10 fracciones principales (Fig. 2.9a). De estas, 7 fracciones al ser reveladas con DPPH presentaron metabolitos con capacidad antioxidante (Fig. 2.9b).

Las fracciones que contenían metabolitos antioxidantes fueron evaluadas por CG-EM, a excepción de las fracciones GIC-2A-E y GIC-2A-J, ya que de acuerdo con el perfil cromatográfico por CCD (Fig. 2.9a), los metabolitos presentes en estas fracciones estaban presentes en las demás fracciones.

Sistema de solventes empleado: CH₂Cl₂:Hx:MeOH 70:28:2
Reveladores: a: Ácido fosfomolibdico b: DPPH

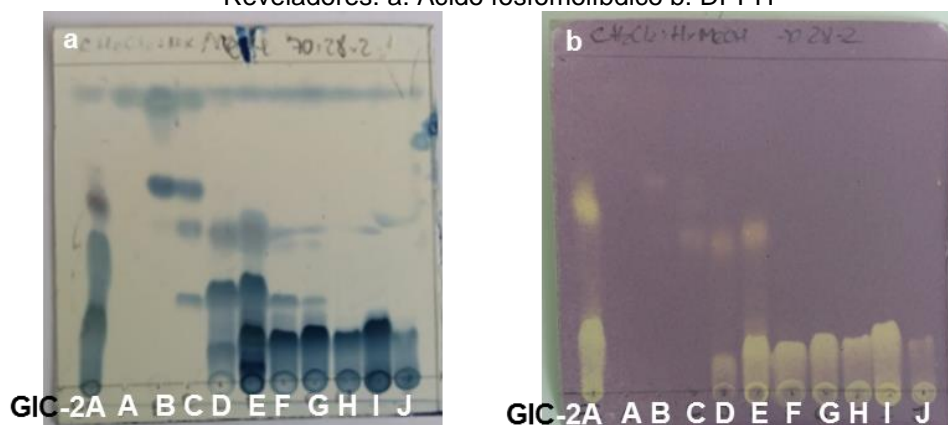


Figura 2.9 Fracciones obtenidas a partir de una cromatografía Flash de la fracción hexánica de la corteza de *G. intermedia* (GIC-2A). Las fracciones están ordenadas de acuerdo con su polaridad en orden creciente.

Los cromatogramas obtenidos por CG mostraron que la mayoría de las fracciones compartían diferentes metabolitos (Fig. 2.10), que de acuerdo con los patrones de fragmentación presuntamente podrían ser terpenos, ácidos orgánicos, entre otros, sin embargo, el porcentaje de probabilidad o la similitud de estos patrones con los encontrados en la base de datos no es muy alta, por lo que no se puede garantizar que específicamente estos metabolitos sean los que están presentes en estas fracciones.

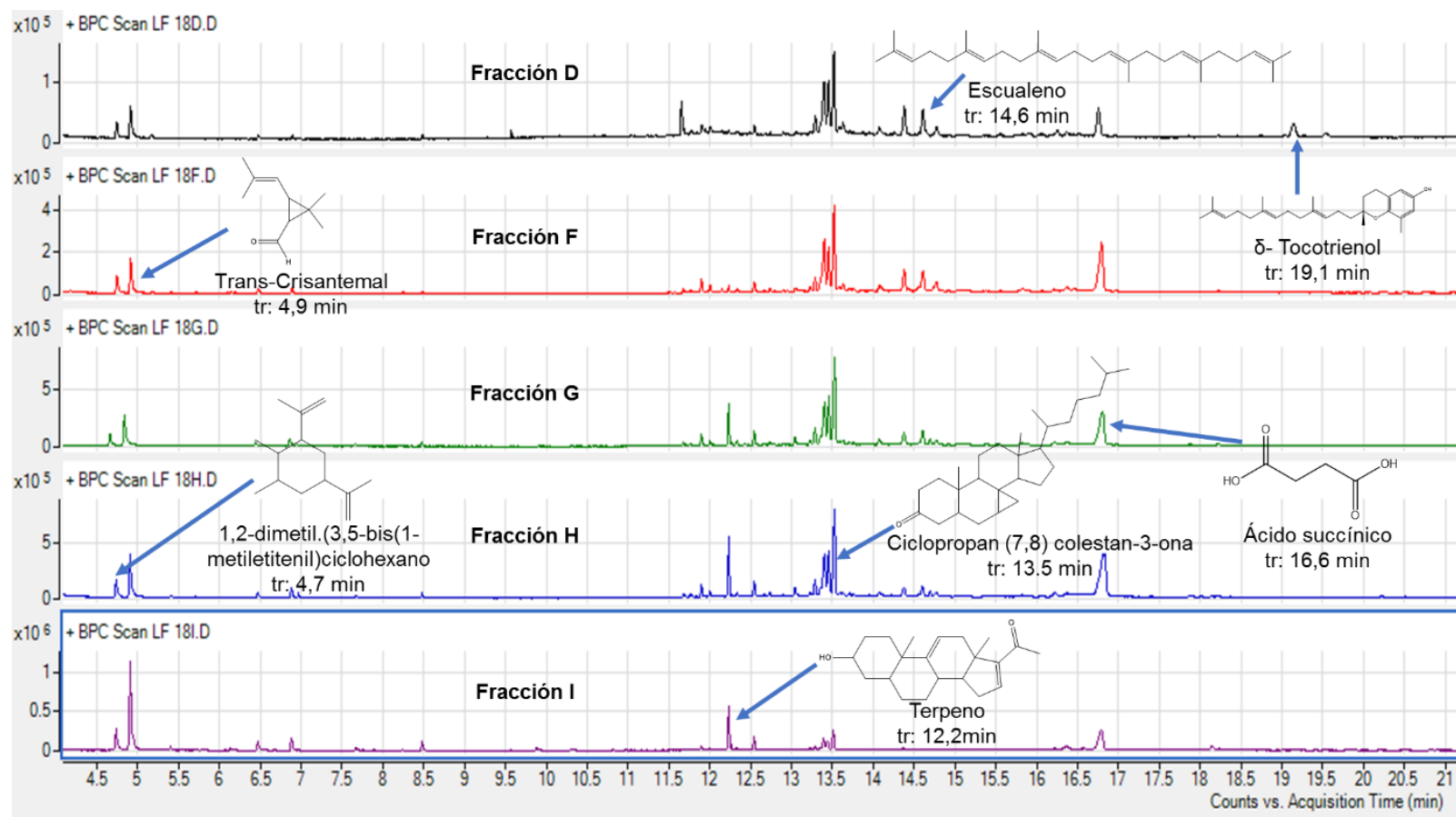


Figura 2.10 Perfiles cromatográficos obtenidos por CG-EM de las fracciones D, F, G, H e I, obtenidas a partir de cromatografía FLASH de la fracción hexánica de la corteza de *G.intermedia* (GIC-2A).

Por el contrario, la fracción de polaridad media fue procesada a través de una cromatografía líquida al vacío (VLC), la cual dio como resultado 11 fracciones principales (Fig. 2.11a); de estas fracciones seis contenían metabolitos antioxidantes polares, ya que la actividad antioxidante solo se observó cerca y en el punto de aplicación, además, tres fracciones contenían metabolitos antioxidantes con una media y baja polaridad teniendo en cuenta su desplazamiento a través de la CDD (Fig. 2.11b).

Se analizaron por CG-EM las fracciones que contenían metabolitos antioxidantes, a excepción de GIC-2B-B y GIC-2B-K ya que los metabolitos presentes en estas fracciones ya están presentes en las demás fracciones analizadas (Fig. 2.11).

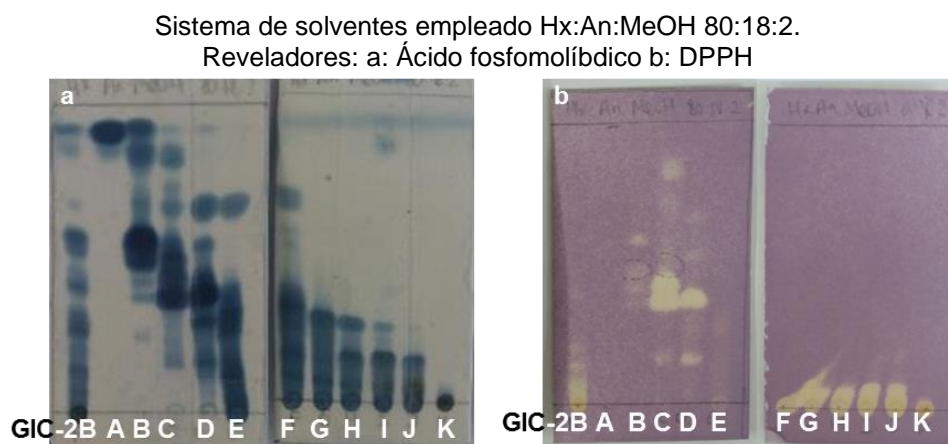


Figura 2.11 Fracciones obtenidas a partir de una VLC de la fracción de acetato de etilo de la corteza de *G.intermedia* (GIC-2B). Las fracciones están ordenadas de acuerdo con su polaridad en orden creciente.

Al igual que las fracciones obtenidas de la fracción de baja polaridad, de acuerdo con la comparación de patrones de fragmentación de la base de datos, las fracciones obtenidas a partir de la fracción de acetato de etilo contienen en su mayoría terpenos y además de componentes de la Vitamina E, como δ -tocoferol y δ y γ -tocotrienol (Fig. 2.12-13). Sin embargo, la presencia de xantonas en las fracciones de la corteza de *G. intermedia* no fue sugerida. En otras especies de *Garcinia* han sido descritos algunos de los compuestos sugeridos por la comparación de los patrones de fragmentación con la base de datos como ácidos orgánicos (Parthasarathy *et al.*, 2012), tocotrienoles (Ekene y Erhirhie, 2014) y tocoferoles (Wallert *et al.*, 2019), así como β -sitosterol y stigmasterol (Ritthiwigrom *et al.*, 2013).

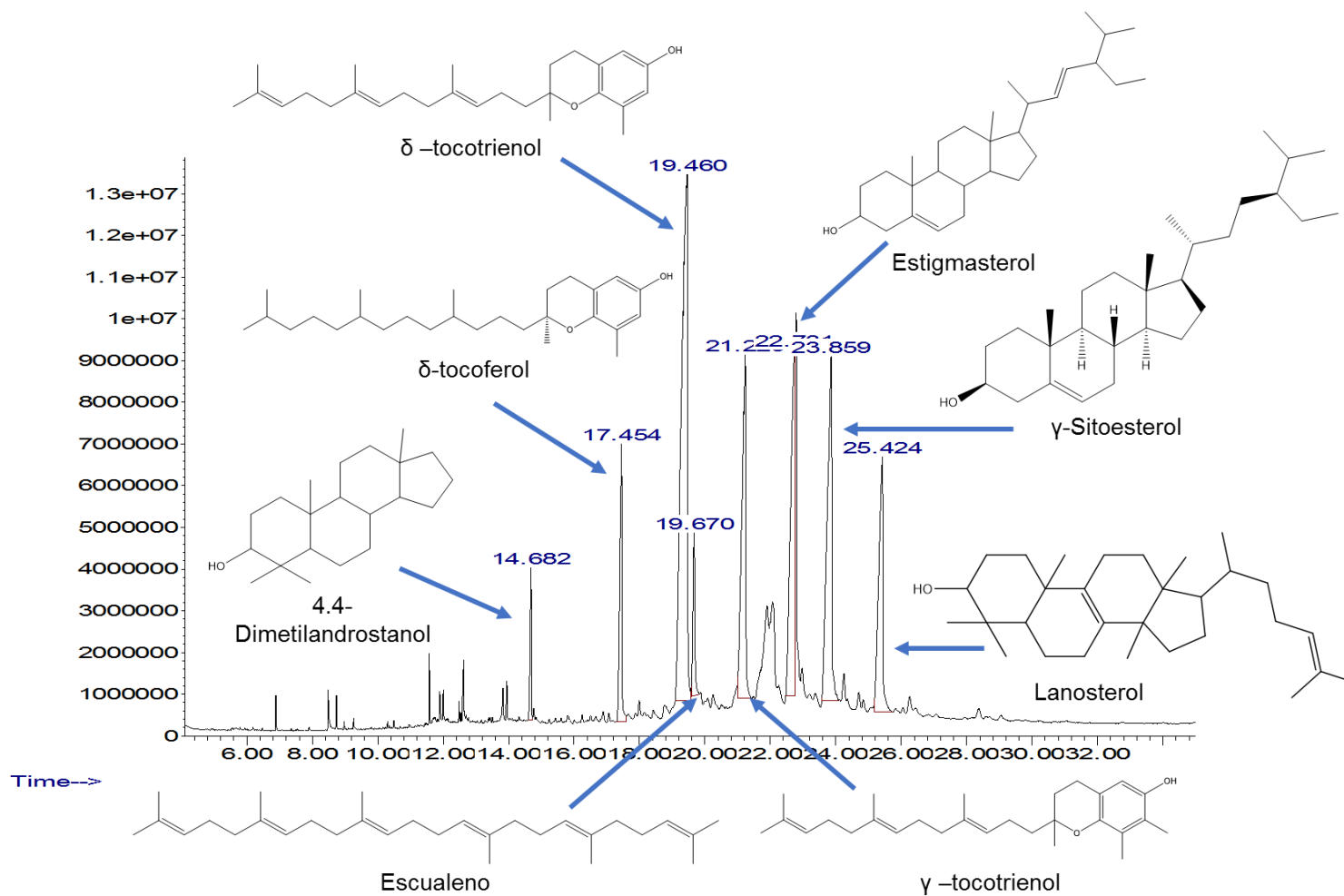


Figura 2.12 Perfil cromatográfico obtenido por CG-MS de la fracción C obtenida a partir de una VLC de la fracción de acetato de etilo de la corteza de *G. intermedia* (GIC-2B).

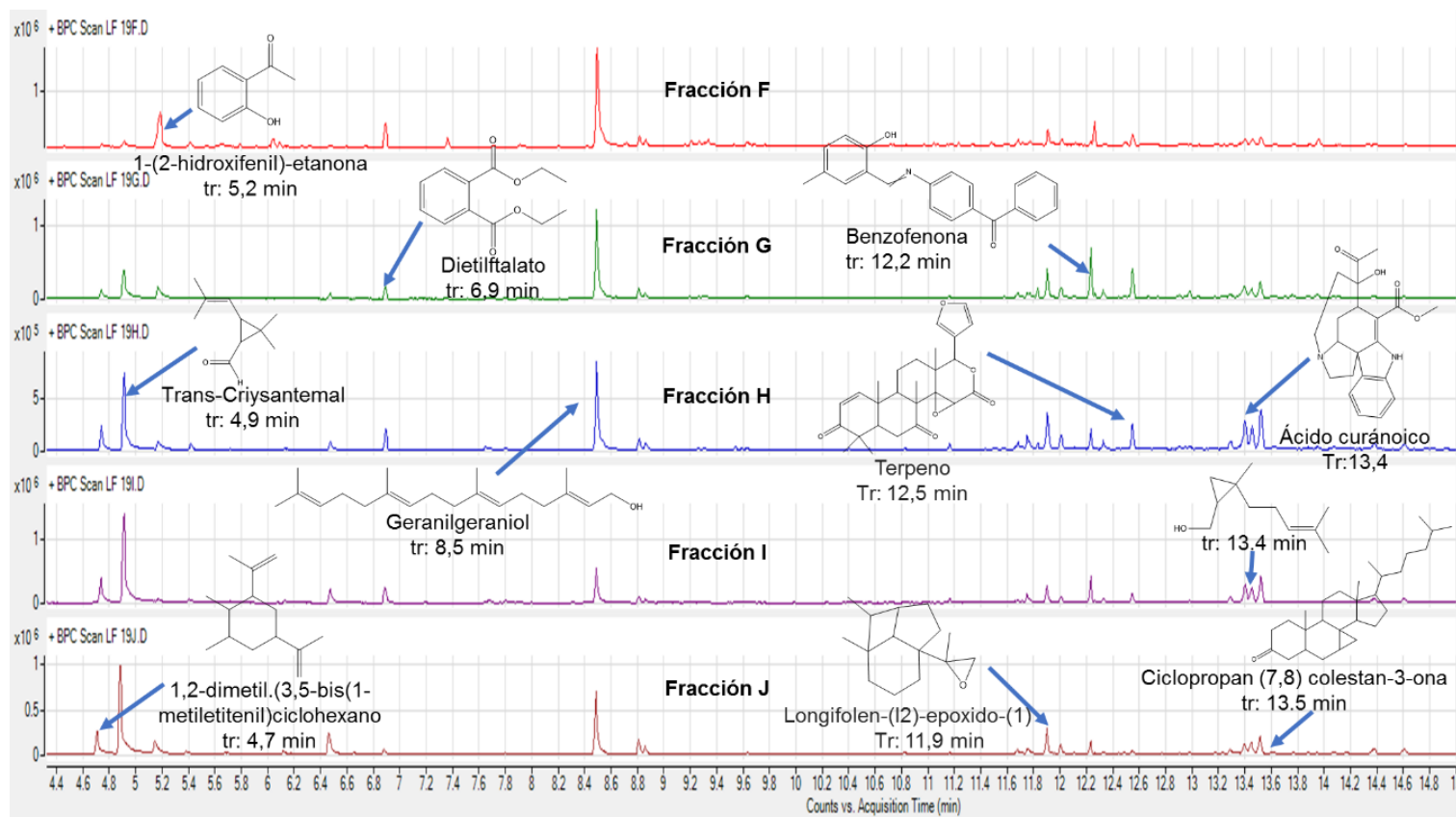


Figura 2.13 Perfiles cromatográficos obtenidos por CG-MS de las fracciones F, G, H, I y J, obtenidas a partir de la VLC realizada a la fracción de acetato de etilo de la corteza *G. intermedia* (GIC-2B).

Al hacer una búsqueda bibliográfica, solo tres estudios fitoquímicos de *G. intermedia* han sido publicados; en uno de ellos se analizó el fruto de esta planta y se reportó la presencia de diferentes benzofenonas y biflavonoides (Muñoz Acuña *et al.*, 2012), este tipo de compuestos también son reportados en hojas de *G. intermedia*, además de la presencia de una xantona denominada 8-desoxigatanina (Fig. 2.14) (Abe *et al.*, 2004). Adicionalmente en un estudio realizado con semillas y cáscaras de *Rheedia edulis*, un basónimo de *G. intermedia*, se describe igualmente la presencia de metabolitos de tipo benzofenonas y biflavonoides (Acuña *et al.*, 2010); sin embargo, la presencia de xantonas, los metabolitos de interés, ha sido reportada en ramas y corteza de otras especies del género *Garcinia* (Mahabusarakam *et al.*, 2016; Mariano *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2014; Hemshekhar *et al.*, 2011), por lo que se esperaba encontrar este tipo de metabolitos en las fracciones obtenidas de corteza de *G. intermedia*.

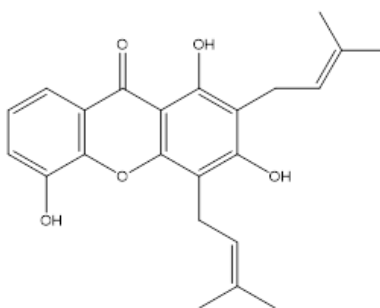


Figura 2.14 8-desoxigatanina, xantona presente en las hojas de *G. intermedia*

- ***Calophyllum brasiliense***

Teniendo en cuenta que en la literatura se reportan xantonas aisladas a partir de la corteza de *C. brasiliense* (García-Zebadúa *et al.*, 2014), se decidió trabajar con las fracciones semipurificadas obtenidas a partir del extracto crudo obtenido a partir de la corteza de los dos individuos colectados de *C. brasiliense*.

Considerando que los perfiles cromatográficos de los dos individuos colectados tenían metabolitos en común (Fig. 2.4), se purificó mediante VLC las fracciones hexánicas y de acetato de etilo de los dos individuos bajo las mismas condiciones y empleando el mismo sistema de eluyentes.

Los perfiles cromatográficos de los dos individuos de *C. brasiliense* al revelarlos empleando ácido fosfomolibdico contenían compuestos similares (Fig. 2.15a-b; Fig. 2.16a-b), sin

embargo al revelarlos con DPPH, solo se observaron metabolitos antioxidantes en el individuo colectado en Mérida, tanto en las fracciones provenientes de la fracción hexánica (Fig. 2.15d) como las provenientes de la fracción de acetato de etilo (Fig.2.16d); teniendo en cuenta que las xantonas, metabolitos de interés para esta investigación, han sido reportados como antioxidantes, hay una mayor probabilidad de encontrar este tipo de compuestos en las fracciones obtenidas a partir del individuo colectado en Mérida. Además, las diferencias fitoquímicas entre las dos poblaciones, como se mencionó anteriormente, pueden deberse a la influencia del ambiente en el que se encontraban (Ramakrishna y Ravishankar, 2011) ó a que las poblaciones pertenecen a quimiotipos diferentes (García-Zebadúa *et al.*, 2014), sin embargo para determinarlo, se requieren estudios de la fitoquímica de las hojas, ó análisis filogenéticos mediante marcadores de ITS de las poblaciones colectadas.

Sistema de solventes empleado Hx:An 8:2.
Reveladores: Ácido fosfomolibdico (a-b) DPPH (c-d)

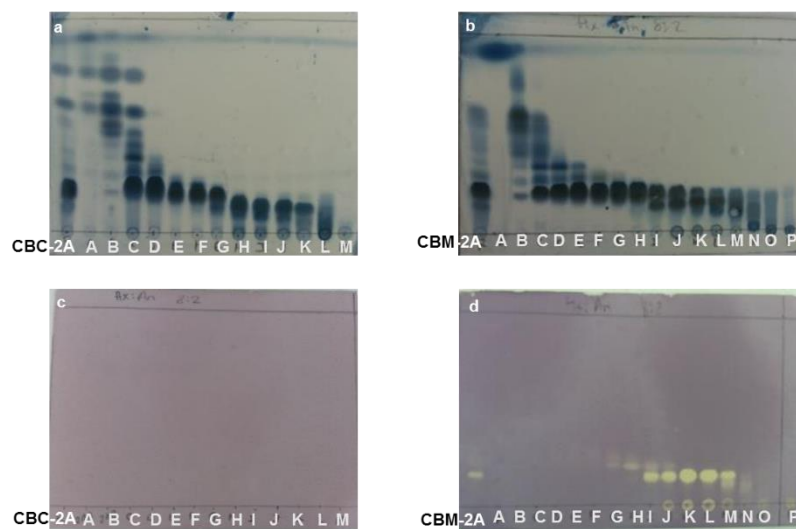


Figura 2.15 Fracciones obtenidas a partir de una VLC de la fracción hexánica de la corteza de *C. brasiliense*. CBC-2A: *C. brasiliense* colectado en Calakmul, CBM-2A: *C. brasiliense* colectado en Mérida.

Sistema de solventes empleado Hx:An 8:2.
Reveladores: Ácido fosfomolibdico (a-b) DPPH (c-d)

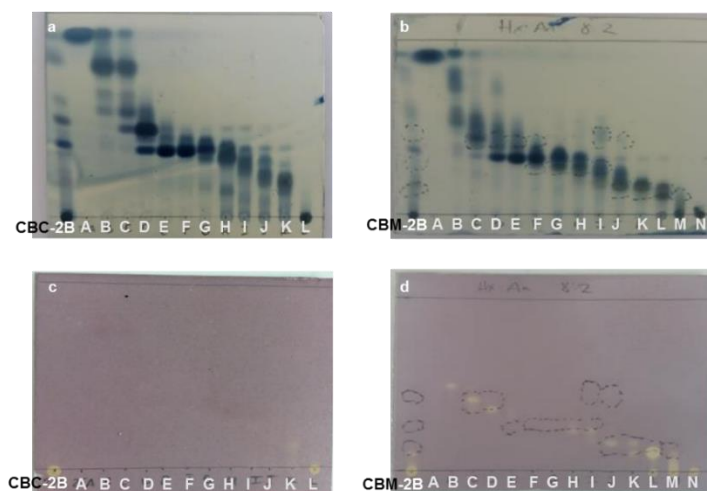


Figura 2.16 Fracciones obtenidas a partir de una VLC de la fracción de acetato de etilo de la corteza de *C. brasiliense*. CBC-2B: *C. brasiliense* colectado en Calakmul, CBM-2B: *C. brasiliense* colectado en Mérida

2.4 CONCLUSIONES

- Aun cuando los extractos crudos y fracciones obtenidas a partir de la corteza y las ramas de *C. brasiliense* y *G. intermedia*, y la corteza de *Clusia flava*, *C. subrobicularis* y *C. rosea* no inhibieron la esporulación de *F. oxysporum* y *C. gloesporoides*, no se descarta la posibilidad de que en estos extractos o fracciones se encuentren metabolitos con actividad antifúngica que puedan ser detectados utilizando otros modelos de ensayo u otros hongos fitopatógenos. Adicionalmente, y más importante todavía, tampoco se descarta que estos extractos y fracciones contengan metabolitos tipo xantona con actividad inhibitoria de UPR, ya que para la evaluación de esta actividad se utiliza un modelo en el que se induce la activación de esta respuesta y se evalúa la inducción de genes diana de UPR involucrados en esta respuesta.
- Aun cuando los análisis realizados por CG-EM sugieren la presencia de tocoferoles, tocotrienoles y terpenos en las fracciones de *G. intermedia*, es necesario confirmar la presencia de estos metabolitos utilizando muestras de referencia o llevando a cabo su purificación e identificación.

- Los diferentes perfiles fitoquímicos mostrados por los extractos de la corteza de individuos colectados de las dos poblaciones de *C. brasiliense* en Calakmul y Mérida sugiere que estas poblaciones corresponden a quimiotipos diferentes.

CAPÍTULO III

Uso de la desduplicación empleando ^{13}C -NMR como herramienta para la identificación de xantonas presentes en el extracto de corteza de *Calophyllum brasiliense**

3.1 RESUMEN

Introducción: Las xantonas son metabolitos con una variedad de propiedades biológicas. La familia Clusiaceae, que hasta hace poco incluía el género *Calophyllum*, es reconocida por la producción de xantonas mono y polihidroxiladas. Actualmente, *C. brasiliense* es la única especie del género *Calophyllum* presente en la Península de Yucatán. **Objetivo:** Utilizar una combinación de métodos fitoquímicos tradicionales y análisis de desduplicación de ^{13}C -RMN para identificar xantonas en la corteza de *C. brasiliense*. **Materiales y métodos:** El fraccionamiento inicial y purificación del extracto crudo de la corteza de *C. brasiliense* produjo macluraxantona (**1**). Se identificaron xantonas adicionales, junto con cromanonas y terpenoides, mediante análisis de desduplicación de ^{13}C -RMN en diferentes fracciones semipurificadas obtenidas de las fracciones de baja y mediana polaridad del extracto de corteza de *C. brasiliense*. **Resultados:** La identificación inicial de macluraxantona (**1**) fue confirmada por análisis de desduplicación de ^{13}C -RMN, además los análisis permitieron la identificación de varias xantonas mono y polihidroxiladas, junto con cromanonas y terpenoides. **Conclusión:** Este estudio confirma a *C. brasiliense* como una fuente rica en xantonas y a el análisis de desduplicación de ^{13}C -RMN como un método adecuado para identificar rápidamente la presencia de diferentes familias de metabolitos secundarios en fracciones semipurificadas.

*Los resultados descritos en este capítulo forman parte del Manuscrito "Using ^{13}C -NMR dereplication to aid in the identification of xanthonenes present in the stem bark extract of *Calophyllum brasiliense*" sometido a la revista Phytochemical Analysis.

3.2 USING ^{13}C -NMR DEREPLICATION TO AID IN THE IDENTIFICATION OF XANTHONES PRESENT IN THE STEM BARK EXTRACT OF *Calophyllum brasiliense*

Lina Fernanda Silva-Castro,¹ Séverine Derbré,² Anne Marie Le Ray,² Pascal Richomme,²
Karlina García-Sosa,¹ Luis Manuel Peña-Rodríguez^{1*}

¹Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo. Mérida, Yucatán, México CP 97205

² Univ Angers, Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux, SFR 4207 QUASAV, Campus du Végétal, St. 42 rue Georges Morel; P.C. 49070. Angers, France

3.2.1 Abstract

Introduction: Xanthonés are metabolites with a variety of biological properties. The Clusiaceae family, which until recently included the genus *Calophyllum*, is recognized for its production of mono and polyhydroxylated xanthonés. Presently, *C. brasiliense* is the only *Calophyllum* spp. known to occur in the Yucatan peninsula. **Objective:** To use a combination of traditional phytochemical methods and ^{13}C -NMR dereplication analysis to identify xanthonés in the stem bark of *C. brasiliense*. **Material and methods:** Initial fractionation and purification of the stem bark extract of *C. brasiliense* produced macluraxanthone (**1**). Additional xanthonés, together with chromanones and terpenoids, were identified using ^{13}C -NMR dereplication analyses in different semipurified fractions obtained from the low and medium polarity fractions of the stem bark extract of *C. brasiliense*. **Results:** Initial identification of macluraxanthone (**1**) was confirmed by ^{13}C -NMR dereplication analysis; additionally, ^{13}C -NMR dereplication analyses allowed the identification of a number of mono and polyhydroxylated xanthonés, together with chromanones and terpenoids. **Conclusion:** This study confirms *C. brasiliense* as a rich source of xanthonés and the ^{13}C -NMR dereplication analysis as a suitable method to quickly identify the presence of different families of secondary metabolites in semipurified fractions

Keywords: Dereplication; Calophyllaceae; xanthonés; chromanones; macluraxanthone.

3.2.2 Introduction

Xanthones are secondary metabolites of great importance in the cosmetic, pharmaceutical, and nutraceutical industries (Peres *et al.*, 2000) because of their different biological activities which include antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant, among others (Fotie y Bohle, 2006). Recently, it has been reported that some xanthones can inhibit the unfolded protein response (UPR) (Bruguère *et al.*, 2016), an important mechanism in plant pathogenic fungi to infect plants (Guillemette *et al.*, 2014). Xanthones are present in only a few families of higher plants, lichens, and fungi (Negi *et al.*, 2013); in plants these metabolites are found mainly in the Clusiaceae (55 species, 12 genera) and Gentianaceae (28 species, 8 genera) families (Crockett y Robson, 2011; Vieira y Kijjoa, 2005).

In the Clusiaceae family, it is common to find mono and polyhydroxylated xanthones, as well as prenylated xanthones or xanthones that can be associated with a particular genus, as is the case of the caged prenylated xanthones generally present in the genus *Garcinia* (Vieira y Kijjoa, 2005; Bennett y Lee, 1989). The *Calophyllum* genus, which has been recently reclassified from the Clusiaceae to the Calophyllaceae family (The angiosperm phylogeny group, 2009), is also recognized for its production of xanthones (Gupta y Gupta, 2020; Filho *et al.*, 2009); to date, more than 70 mono and polyhydroxylated xanthones having 1,5, 1,7, and 1,5,6 oxygenation patterns, together with mono and dioxygenated-prenylated xanthones, have been described from different species belonging to this genus (Su *et al.*, 2008; Vieira y Kijjoa, 2005; Bennett y Lee, 1989). Presently, there exist 190 species belonging to the *Calophyllum* genus; of these, only 14 are known to occur in the American continent (Díaz, 2013; "Plants of the World Online | Kew Science," n.d.), and only one of them, *C. brasiliense* Cambess, a tree that can grow 20 to 30 m high, and whose native range spans from Mexico to tropical South America (Stevens, 2007; Pennington y Sarukhán, 2005), is found in the Yucatan peninsula, where its wood is used mainly for construction (Kearns *et al.*, 1995). However, some ethnic groups in Mexico use the oil from the seeds of *C. brasiliense* to treat cutaneous infections, others use the bark to prepare a tea which is administered to pregnant women to clean the womb, or the latex to treat toothache or to prevent infections (García-Zebadúa *et al.*, 2014). To date, the phytochemical knowledge of *C. brasiliense* includes terpenes and polyphenolic metabolites such as xanthones and

chromanones having a wide variety of biological activities including antiviral, antiprotozoal, antimicrobial, and cytotoxic (García-Zebadúa *et al.*, 2014).

Currently, new tools and methodologies are constantly being developed and established to allow for a rapid and more efficient identification of bioactive secondary metabolites in complex samples (Hubert *et al.*, 2017). One of these tools is the dereplication analysis using ^{13}C -NMR; in this case, the spectroscopic data obtained from the ^{13}C -NMR analysis of a crude extract or semipurified fraction is compared with predicted/theoretical or experimental data contained in one or more databases, which then allows to propose a theoretical composition of the analyzed sample. Dereplication analyses using ^{13}C -NMR represent an excellent alternative to detect and identify major secondary metabolites in crude extracts or semipurified fractions, since the analyses can be carried out using a small amount of sample that does not usually require any preparation, other than solubilization in a deuterated solvent (Bruguière *et al.*, 2020, 2018). This tool has been used for the identification of alkaloids and monoterpenes in the leaf extract of *Peumus boldus* (Bakiri *et al.*, 2017), of terpenes and polyphenolic metabolites in semipurified fractions from the stem bark of *Anogeissus leiocarpus* (Hubert *et al.*, 2014), and of polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols (PPAPs) in extracts of *Garcinia bancana* (Bruguière *et al.*, 2018). As part of our interest to search for natural UPR inhibitors in species of the Clusiaceae family, we wish to describe here the initial isolation and identification of macluraxanthone (**1**) as the major xanthone in the bark extract of *C. brasiliense*, and the use of ^{13}C -NMR dereplication analysis to rapidly confirm the presence of **1**, together with additional xanthenes, chromanones and terpenoids, in the low and medium polarity fractions of the same extract.

3.2.3 Methodology

3.2.3.1 General experimental procedures.

Solvent evaporation was carried out under reduced pressure using a Büchi Rotary Evaporator RE111 with a water bath at 35 °C. Thin layer chromatography (TLC) analyses were carried out using aluminum-backed silica gel plates (60 F₂₅₄) (E.M. Merck, 0.2mm thickness); chromatograms were visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and cerium (IV) sulfate (2.5 g) in sulfuric acid (500 ml, 5%), followed by drying and gentle heating. Flash column chromatography was performed using

high purity silica gel (Sigma-Aldrich; 200-400 mesh), while Vacuum liquid chromatography (VLC) purifications were carried out using TLC grade 60 GF₂₅₄ silica gel (EM Merck). GC-MS analyses were performed using an Agilent Technologies Gas chromatograph, Model 7890B, coupled to a 5977A Selective Mass Detector (GC conditions: Agilent 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m column), flow rate (Nitrogen) 1 mL/min; the program used consisted of an initial temperature of 110 °C (2 min), followed by a temperature increase during 15 min to reach 260 °C, maintaining the temperature for 3 min, followed by a temperature ramp of 2 minutes to reach a temperature of 280 °C, which was then maintained for 10 min. Components detected through GC-MS analyses were identified by comparing their fragmentation patterns with those contained in the NIST/NIH/EPA mass spectral library. HPLC analyses were carried out using an HPLC chromatograph (Prominence-I LC-2030C, Shimadzu, Noisiel, France) coupled with ELSD (SEDEX 90 LT-ELSD, SEDERE), using a Luna C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μ m, 100 Å, Phenomenex) with a mobile phase of water and 0.1% formic acid (A) and methanol (B), a flow rate of 1 mL/min, and a gradient program as follows: t = 0 min, 50% A and 50% B; t = 5 min, 40 min gradient of solvent B to reach 100%. Component detection was carried out using a PDA (UV detector; 251 nm, 253 nm, and 280 nm) and an ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) detectors. Samples were prepared by dissolving 5 mg of material in 1 mL of HPLC-grade methanol. The solutions were filtered using a nylon filter (0.450 μ m) prior to analysis. NMR spectra (¹H and ¹³C) and two-dimensional experiments (COSY, HSQC and HMBC) were acquired on a Bruker spectrometer (400 and 100 MHz, respectively); all samples were dissolved in deuterated chloroform.

3.2.3.2 Plant material.

The stem bark of *C. brasiliense*, identified by field taxonomist Gabriel Dzib, was collected in Mérida, Yucatán, México. A voucher specimen (72345) has been deposited at the herbarium of the Natural Resources Unit of “Centro de Investigación Científica de Yucatán”.

3.2.3.3 Extraction and fractionation of plant material.

The dried and powdered stem bark of *C. brasiliense* (0,4 kg) was extracted three times with ethanol for 48 h at room temperature. After filtering, the extracts were combined and the solvent evaporated to obtain 60.2 g (15.1 %) of organic crude extract. A portion (54.1 g) of the crude extract was suspended in a 3:2 water/methanol mixture and the resulting aqueous

suspension was successively partitioned with hexane (3x, 2:1 v:v, solvent:aqueous suspension) and ethyl acetate (3x, 2:1) to obtain the low and medium polarity fractions, respectively. A VLC purification (5 x 5 cm column) of the low polarity fraction (18.2 g), eluting with mixtures of hexane:acetone of increasing polarity (100:0 to 70:30), yielded 16 semipurified fractions (**1A** to **1P**, Figure S3.1). Three of these fractions (**1I**, **1J** and **1K**) presented a precipitate which was collected separately by filtration. The precipitate (5 mg) from fraction **1K** was identified as macluraxanthone (**1**) by comparing its spectroscopic data with those reported in the literature (Shen *et al.*, 2005; Goh *et al.*, 1992). A similar VLC purification (5 x 5 cm column) of the medium polarity fraction (9.1 g), eluting with mixtures of hexane:acetone of increasing polarity (100:0 to 88:12), yielded 14 semipurified fractions (**2A** to **2N**, Figure S3.2). Four of these fractions (**2I** to **2L**) presented a precipitate which was collected separately by filtration. Semipurified fractions **1D**, **1G**, **1J**, **1K**, **2B**, **2F**, **2G**, **2J**, and **2K**, together with precipitate from fraction **2J**, were selected for ^{13}C NMR dereplication analysis.

3.2.3.4 ^{13}C NMR dereplication analyses.

Selected fractions (15-30 mg) were dissolved in 600 μL of the chosen deuterated solvent. NMR analyses were performed at 298 K on a JEOL 400 MHz ECZ spectrometer (JEOL Europe, Croissy-sur-Seine, France) equipped with a 5 mm inverse probe (ROYAL ROS). ^{13}C NMR spectra were acquired at 100 MHz and a standard ^{13}C -NMR decoupled ^1H sequence was used with an acquisition time of 1.304 s and a relaxation time of 2 sec. 10.000 scans were collected to obtain a satisfactory S/N ratio. The spectral width was 250 ppm. A 1 Hz line broadening filter was applied to each FID prior to Fourier transformation. Spectra were manually phased and baseline corrected using the MestReNova software (Mestrelab Research) and calibrated on the central resonance of the deuterated solvent. For DEPT experiments, 5000 scans were required and alignment on the ^{13}C spectrum was made using a selected δ_{C} . An automated peak picking was done. The peak list and intensity data obtained from each spectrum were exported as a .csv file using Excel software and used as an input file in MixONat software. When the fractions did not show a satisfactory S/N ratio, a larger number of scans was performed in both ^{13}C and DEPT experiments.

3.2.3.5 Databases

The Calophyllum database (DB), which includes 364 NPs, was created in 2019 by searching SciFinder for the structure of secondary metabolites described in the *Calophyllum* genus; the use of the ACD/Lab package, an NMR prediction software, allowed to obtain the ^{13}C -predicted chemical shift (δ). Then a suitable DB was created using the C-typeGen program included in MixONat software by sorting each chemical shift by carbon type, *i.e.* methyl, methylene, methine or quaternary carbons.

Similarly, the xanthenes DB, which contains 1694 natural xanthenes, was created in 2020 by collecting data on the structures of xanthenes described in the Universal Natural Products Database (UNPD) (Gu *et al.*, 2013). Again, the use of the ACD/Lab package and C-typeGen program allowed obtaining of the ^{13}C -predicted chemical shifts.

3.2.3.6 MixONat Software.

The MixONat software was used for the dereplication analysis of the different fractions. This freely distributed software can be found at <http://sourceforge.net/projects/mixonat>.

3.2.4 Results and discussion.

Initial fractionation of the bark crude extract of *C. brasiliense* using a liquid-liquid partition procedure produced a low (hexane) and a medium (ethyl acetate) polarity fractions, which were then purified using VLC. Three of the semipurified fractions (**1I**, **1J**, **1K**) obtained from the low polarity fraction, presented each a precipitate which was separately collected and analyzed by TLC to show the same major component in the three precipitates (Figure S3.3). However, when analyzed by GC-MS, the chromatographic profile of the precipitate from fraction **1K** showed the presence of four main components (Figure S3.4), which were tentatively identified as 4-hydroxyxanthone (t_{R} 10.5 min), 3-hydroxyxanthone (t_{R} 11.4 min), 1,3,6-trihydroxy-8-methylxanthone (t_{R} 14.0 min), and a benzopyranone derivative (t_{R} 23.4 min) by comparing their fragmentation pattern with those contained in the database. However, and even though the fragmentation pattern of the major component (t_{R} 11.4 min), suggested as 3-hydroxyxanthone in the precipitate from fraction **1K** showed the corresponding molecular ion peak at m/z 212 ($\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_3$), together with fragments at m/z 184 and 155 characteristic for monohydroxyxanthenes (Arends *et al.*, 1973), the number of

protons and carbons observed in the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the precipitate (Figure S3.5 and S3.6, respectively) did not correspond with those expected for the structure of a monohydroxyxanthone. While the ^1H NMR spectrum showed two aromatic protons, and a number of signals corresponding to a hydrogen-bonded hydroxyl group, a monosubstituted double bond, a *Z* double bond, and four methyl groups, the ^{13}C NMR spectrum showed 16 sp^2 -carbon signals, four of them bound to oxygen and one corresponding to a carbonyl group; this data suggested that the main component in the precipitate **1K** had a prenylated xanthone structure.

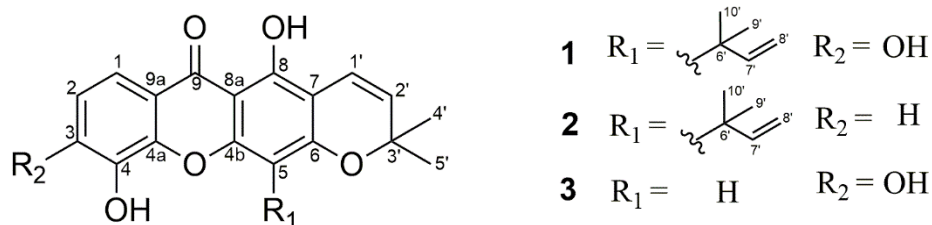
A detailed analysis of all spectroscopic data (COSY, HMBC and HSQC experiments) allowed the identification of the major component in the precipitate from fraction **1K** as macluraxanthone (syn. 3-hydroxyblancoxanthone, **1**), a prenylated pyranoxanthone described for the first time from the root extract of *Maclura pomifera* (Moraceae) (Wolfson *et al.*, 1964), and also isolated from *Cudrania cochinchinensis* (Moraceae) (Hou *et al.*, 2001). Macluraxanthone (**1**) has also been isolated from different species of the Clusiaceae, e.g. *Garcinia opaca* (Goh *et al.*, 1992), *G. ovalifolia* (Waterman y Crichton, 1980), *G. speciose* (Sangsuwon y Jiratchariyakul, 2015), *G. bracteate* (Xiang *et al.*, 2020) and *Rheedia gardneriana* (Monache *et al.*, 1983), and Calophyllaceae, e.g. *Calophyllum soulattri* (Mah *et al.*, 2011), *C. inophyllum* (Yimdjoo *et al.*, 2004; linuma *et al.*, 1994), *C. caledonicum*, (Hay *et al.*, 2004), *C. blancoi* (Shen *et al.*, 2005) and *Mesua ferrea* (The *et al.*, 2013), and has been reported as having antioxidant, antimalarial, cytotoxic, and anti-ischemic activities (Ng *et al.*, 2020; Xiang *et al.*, 2020; Sangsuwon y Jiratchariyakul, 2015; Teh *et al.*, 2013; Loisel *et al.*, 2010; Laphookhieo *et al.*, 2009; Mahabusarakam *et al.*, 2005). It is important to mention that, even though most of the experimental chemical shifts values for the various protons and carbons of **1** coincided with those reported for macluroxanthone (**1**) (Table 3.1) (Shen *et al.*, 2005; Goh *et al.*, 1992), the HMBC experiment allowed the correct assignment of the C-8a and C-9a carbon signals, on the basis of the observed correlations between the proton of the hydroxyl group at C8 and the C-8a carbon, and between the H-2 proton and the C-9a carbon (Figure S3.7, Table S3.1).

Table 3. 1 Experimental and reported spectroscopic data for macluraxanthone (1).

C	Experimental data		(Shen <i>et al.</i> , 2005)		(Goh <i>et al.</i> , 1992)
	δ_{1H} (H, mult., J_{Hz})	δ_{13C}	δ_{1H} (H, mult. J_{Hz})	δ_{13C}	δ_{13C}
1	7,66 (1H, d, 8.8)	117.8	7.59 (d, 8.7)	116.2	117.7
2	6.92 (1H,d,8.8)	113.0	7.00 (d, 8.7)	112.8	113.0
3		149.2		151.0	149.3
4		131.2		132.8	131.3
4a		144.7		146.0	44.8
4b		154.3		156.5	154.3
5		113.3		113.6	113.3
6		159.1		158.8	159,1
7		105.8		104.9	105.8
8		156.9		155.2	157.0
8a		103.2		113.4	105.8
9a		113.9		102.9	113.9
9		181.0		181.0	181.0
1'	6.75 (1H, d, 10.0)	116.3	6.69 (d, 9.9)	115.5	116.3
2'	5.59 (1H, d, 10.0)	127.4	5.70 (d, 9.9)	127.2	127.4
3'		78.5		78.2	78.5
4'	1.49 (6H, s)	28.1	1.49 (s)	27.2	28.2
5'		28.1		27.2	28.2
6'		41.6		41.0	41.7
7'	6.71(1H, dd, 10.6, 17.7)	157.1	6.50 (dd)	152.0	157.0
8'	5.02 (1H, dd,10.6, 1.4) 5.20 (1H,dd,17.7, 1.4)	103.5	4.87 (d, 11.4) 5.04 (d, 17.5)	106.5	103.6
9'	1,62 (6H, s)	28.4	1.74 (s)	29.1	28.4
10'		28.4	1.74 (s)	29.1	28.4
3-OH					
4-OH	6.24 (1H,s)				
8-OH	13.51 (1H,s)		13.91 (s)		

Because of the complex composition of many of the semipurified fractions obtained from the purifications of both the low (Figure S3.1) and medium (Figure S3.2) polarity fractions, it was decided to explore the potential of ^{13}C -NMR dereplication analysis using the MixONat software to identify the various major components in the different fractions. The MixONat software has been used to identify alkaloids in poppy (*Papaver somniferum*) extracts, rosmarinic acid, diterpenes and triterpenes in leaves of *Rosmarinus officinalis*, and xanthenes in the peel of the *Garcinia mangostana* fruit (Bruguière *et al.*, 2020,2019). The software analyzes ^{13}C -NMR data and organizes chemical shift values according to carbon type, using information provided by DEPT 135 and DEPT 90 experiments. Subsequently, it compares this information with predicted chemical shifts of metabolites contained in a database (DB, e.g. 364 metabolites in Calophyllum DB and 1694 xanthenes in Xanthenes DB), which results in a list of possible metabolites, ranked according to a score calculated on the basis of the number of matching carbon chemical shifts (maximum score being 1.0, when all the signals coincide having a difference of 1.3 ppm or lower). To confirm that the metabolites proposed by the software correspond to the metabolites that are present in the analyzed sample, the experimental chemical shifts must be compared with spectroscopic data reported in the literature (in the same solvent) for the proposed metabolite, a difference no greater than 0.4 ppm between the experimental and reported data will confirm the identification (Bruguière *et al.*, 2020).

The ^{13}C -NMR dereplication analysis of the macluraxanthone (**1**) rich fraction **1K** predicted the presence of pyranoxanthenes, ranking blancoxanthone (**2**) [score: 0.74 (17/23C)] and jacareubin (**3**) [score: 0.72 (13/18C)] in the first and second positions, with macluraxanthone (**1**) [score: 0.65 (15 / 23C)] appearing in the third position when using a *Calophyllum* DB (Figure S3.8), and in the sixth position when using Xanthenes DB (Figure S3.9). These results can be expected when taking into account the similarities in the chemical structures of the xanthenes **1**, **2**, and **3**; however, comparing the experimental chemical shifts with those reported for **1** (Shen *et al.*, 2005; Goh *et al.*, 1992), **2** (Shen *et al.*, 2005), and **3** (Westerman *et al.*, 1977) in the literature (Table S3.2) confirmed the identification of macluraxanthone (**1**) as the major component in fraction **1K** (Figure S3.10). These findings demonstrated the importance of ^{13}C -NMR dereplication analyses to aid in the rapid identification of xanthenes present in semi-purified fractions.



A similar dereplication analyses of fraction **1J** (Figure 3.11 and Figure S3.12) in acetone- d_6 also showed the presence of macluraxanthone (**1**) [Rank 1, *Calophyllum* DB; Rank 3, xanthenes DB; score: 0.96 (22/23C)], together with chromanones and the monohydroxylated xanthenes 2- and 4-hydroxyxanthone (**4** and **5**) [Rank 5 and 4, respectively, *Calophyllum* DB, score: 0.92 (12/13C); Rank 1 and 7, xanthenes DB, score: 1.0 (13/13C) and 0.92 (12/13C), respectively] (Figure S3.13 and Figure S3.14). While the experimental chemical shifts reported for **1** and **4** in acetone- d_6 have a maximum difference of 0.2 ppm with the reported data (Table S3.3) (Linuma *et al.*, 1996; Linuma *et al.*, 1994), it was not possible to compare the experimental data for 4-hydroxyxanthone (**5**) in acetone- d_6 , since there is no spectroscopic data reported for this xanthone in this solvent. It is important to point out that these findings, *i.e.* the presence of the monohydroxylated xanthenes in fraction **1J**, coincide with those observed during the GC-MS analyses of fractions **1J** and **1K** (data not shown) and their corresponding precipitates (Figure S3.4).

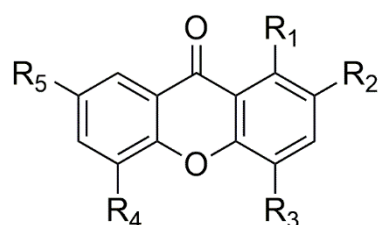
Alternatively, the dereplication analysis of fraction **1D** predicted the presence of chromanones such as pinetic acid II (**6**), calofolic acid E [syn. Isoapetalic acid (**7**)] and apetalic acid (**8**) [Rank 1-3 respectively, score (**6**): 0.74 (17/22C), score (**7-8**): 0.73 (16/22C), *Calophyllum* DB] (Figure S3.15 and Figure S3.16) as possible main components. However, after comparing the experimental data with those reported in the literature (Table S3.4) (Nugroho *et al.*, 2017; Bello *et al.*, 2008; Ampofo y Waterman, 1986), the major component in fraction **1D** was identified as calofolic acid E (**7**) (Figure S3.17). A similar dereplication analysis of fraction **1G** predicted the presence of **7**, together with calofolic acid D (**9**) and calanolide E (**10**); the presence of these three chromanones in fraction **1G** (Figure S3.18 and Figure S3.19) was confirmed by comparing the experimental data with those reported in the literature (Table S3.5) (Nugroho *et al.*, 2017; McKee *et al.*, 1996).

Dereplication analyses of a number of semipurified fractions obtained from the VLC purification of the medium polarity fraction (Figure S3.2) allowed the detection of different

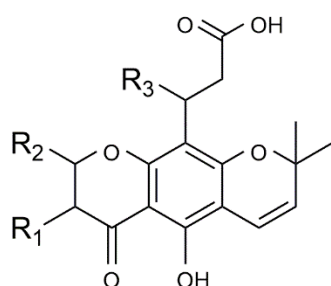
xanthenes, e.g. MixOnat predicted the presence of 1,2-dimethoxyxanthone (**11**) [Rank 1; score: 1.0 using both *Calophyllum* and Xanthenes DB], and terpenes as stigmasterol (**12**) and β -sitosterol (**13**) [Rank 2 and 3 respectively, score: 0.93 (27/29C), *Calophyllum* DB] in fraction **2G** (Figure S3.20 to Figure S3.22). The identification of **11-13** were confirmed by comparing the experimental chemical shift values with those described in the literature (Table S3.6) (Terra *et al.*, 2013; Morel *et al.*, 2000). Similarly, and even though the dereplication analysis of fraction **2J** (Figure S3.23) suggested the presence of numerous xanthenes (Figures S3.24 and S3.25), only the presence of 2-hydroxyxanthone (**4**) [Rank 7, score: 0.92 (12/13C), *Calophyllum* DB; Rank 4, score: 1.0 (13/13C), xanthenes DB] and 1,7-dihydroxyxanthone (**14**) [Rank 1, score: 1.0 (13/13C), *Calophyllum* and xanthenes DB] could be confirmed because spectroscopic data in acetone- d_6 for other xanthenes could not be found in the literature (Table S3.7) (Iinuma *et al.*, 1996). Additional dereplication analysis in dimethylsulfoxide- d_6 of a precipitate obtained from fraction **2J** (Figures S3.26 and S3.27) indicated the presence of 4-hydroxyxanthone (**5**) [Rank 3, score: 0.92 (12/13C), *Calophyllum* DB; Rank 4, xanthenes DB], 1,7-dihydroxyxanthone (**14**) [Rank 6, score: 0.77 (10/13C), *Calophyllum* DB; Rank 29, score: 0.77 (10/13C), xanthenes DB], and 1,5-dihydroxyxanthone (**15**) [Rank 1, score: 1.0 (13/13C) *Calophyllum* and xanthenes DB] (Figures S3.28 and S3.29). The identification of these xanthenes was confirmed when their experimental chemical shift values differ, for the most part, by 0.1 ppm when compared to those reported in the literature (Table S3.8) (Fernandes *et al.*, 1998; Westerman *et al.*, 1977). Similarly, the monohydroxylated xanthone **4** could be detected in fraction **2K** (Figures S3.30 and S3.31, Table S3.9) (Iinuma *et al.*, 1996). Finally, dereplication analyses of fractions **2B** and **2F** allowed the identification of additional chromanones such as recedensolide (**16**) [Rank 1, score: 1.0 (22/22C), *Calophyllum* DB], and terpenoids like friedelin (**17**) [Rank 6, score: 0.9 (27/30C), *Calophyllum* DB], in fraction **2B** (Figures S3.32 to S3.34), and of 1,2-dimethoxyxanthone (**11**), stigmasterol (**12**), β -sitosterol (**13**) and in fraction **2F** (Figures S3.35 and S3.36). The experimental chemical shifts of the identified metabolites present in these fractions showed differences lower than 0.2 ppm when compared with those reported in the literature (Tables S3.10 and Table S3.11) (Terra *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2000; Klass *et al.*, 1992).

Of all the identified xanthenes in this investigation, only 4-hydroxyxanthone (**5**) and 1,2-dimethoxyxanthone (**11**) have been previously reported from the stem bark of *C. brasiliense*

(Ito *et al.*, 2002), while the 1,5-dihydroxyxanthone (**15**) has previously been reported from its root extract (B Isaias *et al.*, 2004). However, and as it is the case for macluroxanthone (**1**), several of the detected xanthenes which have not been reported previously from *C. brasiliense*, have been reported from other species belonging to the *Calophyllum* genus, e.g. 2-hydroxyxanthone (**4**) has been reported from *C. inophyllum* (Xiao *et al.*, 2008), *C. tomentosum* (Banerji *et al.*, 1994), and *C. austroindicum* (Linuma *et al.*, 1996), and 1,7-dihydroxyxanthone (**14**) from *C. teysmannii* (Kijjoa *et al.*, 2000), *C. elatum* (Ito *et al.*, 2018), *C. inophyllum* (Sichaem *et al.*, 2018) and *C. zeylanicum* (Gunasekera *et al.*, 1981).

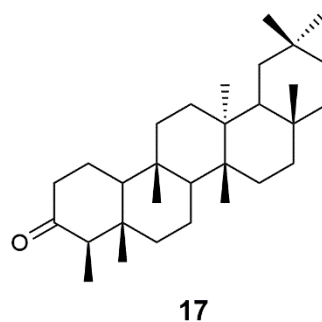
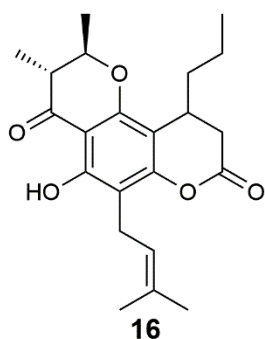
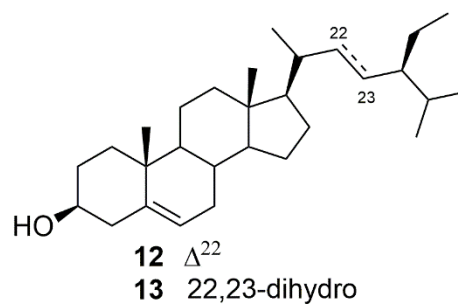
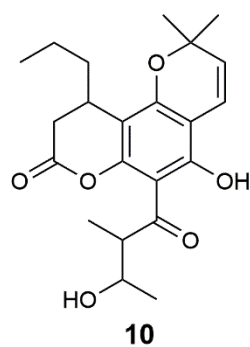


- 4** R₁ = R₃ = R₄ = R₅ = H R₂ = OH
5 R₁ = R₂ = R₄ = R₅ = H R₃ = OH
11 R₁ = R₂ = OMe R₃ = R₄ = R₅ = H
14 R₁ = R₅ = OH R₂ = R₃ = R₄ = H
15 R₁ = R₄ = OH R₂ = R₃ = R₅ = H



- | | R ₁ | | R ₂ | | R ₃ |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|
| | α | β | α | β | |
| 6 | CH ₃ | H | H | CH ₃ | CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 7 | H | CH ₃ | CH ₃ | H | CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 8 | H | CH ₃ | H | CH ₃ | CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 9 | CH ₃ | H | CH ₃ | H | CH ₂ CH ₂ CH ₃ |

The results obtained in this investigation show that ¹³C-NMR dereplication analysis represents a fast and simple method that can predict the composition of extracts and semipurified fractions, facilitating and reducing the amount of work and time required to detect and identify metabolites of interest present in complex samples; in this case the combination of experimental, predicted, and reported spectroscopic data allowed the identification of different xanthenes present in *C. brasiliense*. Finally, the presence of macluraxanthone (**1**) in *C. brasiliense* confirms the close chemotaxonomic relationship between the Calophyllaceae and Clusiaceae families.



3.2.5 Acknowledgements

The authors wish to thank Gabriel Dzib (CICY) for identification of plant material and preparation of herbarium samples. L.F. Silva-Castro wishes to thank CONACYT for scholarship No. 730204 and CICY (Postgraduate Studies Office) for partial financial support to carry out a research stay at UAngers; financial support from SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS-NORD (Mexico-France) collaborative Project No. 276520 is also gratefully acknowledged. This article is part of the M.Sc. thesis of LFSC.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

- Aunque la familia Clusiaceae tiene una amplia distribución global, muy pocas de las especies que hacen parte de esta familia se encuentran en la Península de Yucatán.
- *C. brasiliense* es una fuente importante de xantonas, lo que pudo ser evidenciado mediante los estudios de desduplicación utilizando ^{13}C -RMN, que permitieron identificar la presencia de hidroxixantonas, metoxixantonas y piranoxantonas.
- Los análisis de desduplicación mediante ^{13}C -RMN son una excelente alternativa para determinar la composición de muestras complejas, ya que mediante estos análisis se evidenció la presencia de diferentes compuestos como xantonas, cromanonas y terpenos, en las fracciones analizadas.
- Macluraxantona, xantona aislada a partir de *C. brasiliense* ha sido reportada previamente como inhibidora de UPR, por lo que es posible que las demás xantonas identificadas tengan la capacidad de afectar esta respuesta en hongos que afecten cultivos de importancia económica.

4.2 PERSPECTIVAS

Las xantonas son metabolitos que cuentan con una amplia gama de aplicaciones en diferentes industrias debido a sus propiedades biológicas. Recientemente se ha reportado que este tipo de metabolitos cuenta con la capacidad de inhibir el UPR, respuesta importante en los procesos de infección de hongos patógenos, sin embargo, aún no hay antifúngicos cuyo sitio de acción sea la UPR.

Las xantonas son metabolitos presentes en pocas familias y pocos géneros de plantas, entre los que se encuentra el género *Garcinia*, es por esto por lo que se sugiere continuar con la búsqueda de xantonas en los extractos de *Garcinia intermedia*, particularmente xantonas preniladas, que se encuentra con frecuencia en este género, las cuales podrían ser posibles agentes inhibidores de UPR, teniendo en cuenta que las xantonas activas ya reportadas cuentan con grupos prenilos.

Adicionalmente, Macluraxantona, identificada por primera vez en extractos de *C. brasiliense*, ha sido reportada previamente como un potente inhibidor del UPR, lo que sugiere la búsqueda y el estudio de otras xantonas aisladas a partir de *C. brasiliense* con el fin de determinar su potencial actividad inhibitoria de UPR, empleando técnicas de docking molecular o empleando qPCR para evaluar la inhibición de la activación de genes involucrados en la UPR.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F., Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Estrada Muñiz, E., Huerta Reyes, M., y Reyes Chilpa, R. (2004). Trypanocidal Constituents in Plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(1), 141–143.
- Acuña, U. M., Figueroa, M., Kavalier, A., Jancovski, N., Basile, M. J., y Kennelly, E. J. (2010). Benzophenones and biflavonoids from *Rheedia edulis*. *Journal of Natural Products*, 73(11), 1775–1779.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press. pp.720
- Agrobiotecnia. (2018). Fungifree® AB - FMC. [Online] Disponible en: <http://www.fmcagroquimica.com.mx/producto/fungifree-ab/> [Acceso 12 junio 2019].
- Ampofo, S. A., & Waterman, P. G. (1986). Xanthonés and neoflavonoids from two asian species of *Calophyllum*. *Phytochemistry*, 25(11), 2617–2620.
- Arends, P., Helboe, P., y Møller, J. (1973). Mass spectrometry of xanthonés-I: The electron-impact-induced fragmentation of xanthone, monohydroxy- and monomethoxyxanthonés. *Organic Mass Spectrometry*, 7(6), 667–681.
- B Isaias, D. E., Niero, R., Noldin, V. F., de Campos-Buzzi, F., Yunes, R. A., Delle-Monache, F., y Cechinel-Filho, V. (2004). Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Pharmazie*, 59(11), 879–881.
- Badger-Emeka, L., Ezzat Khalil, H., y Madu Emeka, P. (2018). Evaluation of different fractions of *Garcinia kola* extracts against multidrug resistant clinical bacterial and fungal isolates. *Pharmacognosy Journal*, 10(5), 1055–1060.

- Bakiri, A., Hubert, J., Reynaud, R., Lanthony, S., Harakat, D., Renault, J. H., & Nuzillard, J. M. (2017). Computer-Aided ¹³C NMR Chemical Profiling of Crude Natural Extracts without Fractionation. *Journal of Natural Products*, 80(5), 1387–1396.
- Banerji, A., Deshpande, A. D., Prabhu, B. R., & Pradhan, P. (1994). Tomentonone, a new xanthonoid from the stem bark of *Calophyllum tomentosum*. *Journal of Natural Products*, 57(3), 396–399.
- Bayer CropScience. (2015). REQUIEM® EC. [Online] Disponible en: https://s3-us-west-1.amazonaws.com/www.agrian.com/pdfs/Requiem_EC_MSDS1s.pdf [Acceso 12 junio 2019].
- Bello Alarcón, A., Cuesta-Rubio, O., Pérez, J. C., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2008). Constituents of the Cuban endemic species *Calophyllum pinetorum*. *Journal of Natural Products*, 71(7), 1283–1286.
- Bennett, G. J., y Lee, H.-H. (1989). Xanthones from guttiferæ. *Phytochemistry*, 28(4), 967–998.
- Bioamin. (2018). *Larrea tridentata*. [Online] Disponible en: <http://www.bioamin.com.mx/> [Acceso 12 junio 2019].
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181, 1199–1200
- Botello, A. V., Rendón von Osten, J., Gold-Bouchot, G., y Argaz-Hernández, C. (2005). Golfo de México : contaminación e impacto ambiental : diagnóstico y tendencias (2a ed.). Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. pp.696
- Bruguière, A, Derbré, S., Dietsch, J., Leguy, J., Rahier, V., Pottier, Q., Richomme, P. (2019). ¹³C-NMR dereplication of medicinal plant extracts using a home-

made software. In 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) in cooperation with the French Society of Pharmacognosy AFERP (Vol. 85, p. P-087). © Georg Thieme Verlag KG

Bruguière, A., Le Ray, A., Bréard, D., Blon, N., Bataillé, N., Guillemette, T., Simoneau P., Richomme, P. (2016). Identifying Natural Products (NPs) as potential UPR inhibitors for crop protection. *Planta Medica*, 81(S 01), S1–S381.

Bruguière, Antoine, Derbré, S., Coste, C., Le Bot, M., Siegler, B., Leong, S. T., Richomme, P. (2018). ^{13}C -NMR dereplication of *Garcinia* extracts: Predicted chemical shifts as reliable databases. *Fitoterapia*, 131, 59–64.

Bruguière, Antoine, Derbré, S., Dietsch, J., Leguy, J., Rahier, V., Pottier, Q., Richomme, P. (2020). MixONat, a software for the dereplication of mixtures based on ^{13}C NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 92 (13); 8793–8801.

Cao, S. S., y Kaufman, R. J. (2012). Unfolded protein response. *Current Biology*, 22(16), R622–R626.

Cechinel Filho, V., Meyre-Silva, C., & Niero, R. (2009). Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, 6(3), 313–327.

Cerqueira Sales, M. D., Barcellos Costa, H., Bueno Fernandes, P. M., Aires Ventura, J., y Dummer Meira, D. (2016). Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 26–31.

Certis USA. (2015). Trilogy®. [Online] Disponible en: Recuperado de <http://www.certisusa.com> [Acceso 12 junio 2019].

- Chellappandian, M., Saravanan, M., Pandikumar, P., Harikrishnan, P., Thirugnanasambantham, K., Subramanian, S., Hairul-Islam, V.i. e Ignacimuthu, S. (2018). Traditionally practiced medicinal plant extracts inhibit the ergosterol biosynthesis of clinically isolated dermatophytic pathogens. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(1), 143–149.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology reviews*, 12(4), 564–582.
- Crockett, S. L., & Robson, N. K. B. (2011). Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5(Special Issue 1), 1–13.
- Damián-Badillo, L. M., Salgado-Garciglia, R., Elisa Martínez-Muñoz, R., y Manuel Martínez-Pacheco, M. (2008). Antifungal properties of some mexican medicinal plants. *The Open Natural Products Journal*, 1, 27-33.
- Deck, K., Abad, J. G., y Askew, D. (2020). Testing Inhibitory Drugs of the Human UPR Sensor IRE1 on *Aspergillus fumigatus*. *The FASEB Journal*, 34 (S1).
- Dharmaratne, H. R. W., Napagoda, M. T., y Tennakoon, S. B. (2009). Xanthones from roots of *Calophyllum thwaitesii* and their bioactivity. *Natural Product Research*, 23(6), 539–545.
- Díaz, D. M. V. (2013). Multivariate analysis of morphological and anatomical characters of *Calophyllum* (Calophyllaceae) in South America. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(3), 587–626.
- Djoufack, G. L. N., Valant-Vetschera, K. M., Schinnerl, J., Brecker, L., Lorbeer, E., y Robien, W. (2010). Xanthones, biflavanones and triterpenes from *Pentadesma grandifolia* (Clusiaceae): structural determination and bioactivity. *Natural product communications*, 5(7), 1055–1060.

- Ekene, E. N., & Erhirhie, E. O. (2014). *Garcinia kola*: A review of its ethnomedicinal, chemical and pharmacological properties. *International Journal of Current Research and Review*, 06(11), 1–7.
- Feng, C., Huang, S.-X., Gao, X.-M., Xu, H.-X., y Luo, K. Q. (2014). Characterization of Proapoptotic Compounds from the Bark of *Garcinia oblongifolia*. *Journal of Natural Products*, 77(5), 1111–1116.
- Fernandes, E. G. R., Silva, A. M. S., Cavaleiro, J. A. S., Silva, F. M., Fernanda, M., Borges, M., & Pinto, M. M. M. (1998). ¹H and ¹³C NMR Spectroscopy of mono-, di-, tri- and tetrasubstituted xanthenes. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 36(4), 305–309.
- Fotie, J., y Bohle, D. (2006). Pharmacological and Biological Activities of Xanthenes. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 5(1), 15–31.
- Gamboa-Angulo, M. M., Cristóbal-Alejo, J., Medina-Baizabal, I. L., Chí-Romero, F., Méndez-González, R., Simá-Polanco, P., y May-Pat, F. (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1955–1959.
- García, V. (2014). *Introducción a la microbiología*. (2a ed.). Editorial Universidad estatal a distancia. San José, Costa Rica. pp.256
- García-Zebadúa, J. C., Reyes-Chilpa, R., Huerta-Reyes, M., Castillo-Arellano, J. I., Santillán-Hernández, S., Vázquez-Astudillo, B., y Mendoza-Espinoza, J. A. (2014). El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: Una revisión botánica, química y farmacológica. *Vitae*, 21(2), 126–145.
- Goh, S. H., Jantan, I., Gray, A. I., & Waterman, P. G. (1992). Prenylated xanthenes from *Garcinia opaca*. *Phytochemistry*, 31(4), 1383–1386.

- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., y Miranda, I. (2011). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), 23–29.
- Gu, J., Gui, Y., Chen, L., Yuan, G., Lu, H.-Z., & Xu, X. (2013). Use of Natural Products as Chemical Library for Drug Discovery and Network Pharmacology. *PLoS ONE*, 8(4), e62839.
- Guillemette, T., Calmes, B., y Simoneau, P. (2014). Impact of the UPR on the virulence of the plant fungal pathogen *A. brassicicola*. *Virulence*, 5(2), 357-364.
- Gunasekera, S. P., Sotheeswaran, S., & Sultanbawa, M. U. S. (1981). Two new xanthenes, calozeyloxanthone and zeyloxanthone, from *Calophyllum zeylanicum* (Guttiferae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (0), 1831–1835.
- Gupta, S., & Gupta, P. (2020). The Genus *Calophyllum*: Review of Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacology. In *Bioactive Natural products in Drug Discovery* (pp. 215–242). Springer Singapore.
- Hawes, C., Kriechbaumer, V. (2018). *The Plant Endoplasmic Reticulum*. Human Press, Oxford, UK. pp 265
- Hay, A. E., Hélesbeux, J. J., Duval, O., Labaïed, M., Grellier, P., & Richomme, P. (2004). Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sciences*, 75(25), 3077–3085.
- Hemshekhkar, M., Sunitha, K., Santhosh, M. S., Devaraja, S., Kemparaju, K., Vishwanath, B. S., Niranjana, S.R., y Girish, K. S. (2011). An overview on genus *Garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 325–351.

-
- Hou, A. J., Fukai, T., Shimazaki, M., Sakagami, H., Sun, H. D., & Nomura, T. (2001). Benzophenones and xanthenes with isoprenoid groups from *Cudrania cochinchinensis*. *Journal of Natural Products*, 64(1), 65–70.
- Hubert, J., Nuzillard, J. M., Purson, S., Hamzaoui, M., Borie, N., Reynaud, R., & Renault, J. H. (2014). Identification of natural metabolites in mixture: A pattern recognition strategy based on ¹³C NMR. *Analytical Chemistry*, 86(6), 2955–2962.
- Hubert, J., Nuzillard, J. M., & Renault, J. H. (2017). Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochemistry Reviews*, 16(1), 55–95.
- linuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., & Riswan, S. (1996). Two furanoxanthenes from *Mammea acuminata*. *Phytochemistry*, 42(1), 245–247.
- linuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., & Yonemori, S. (1994). Two xanthenes from root bark of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*, 35(2), 527–532.
- linuma, M., Tosa, H., Toriyama, N., Tanaka, T., Ito, T., & Chelladurai, V. (1996). Six xanthenes from *Calophyllum austroindicum*. *Phytochemistry*, 43(3), 681–685.
- Ito, C., Itoigawa, M., Mishina, Y., Cechinel Filho, V., Mukainaka, T., Tokuda, H., Furukawa, H. (2002). Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: Structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. *Journal of Natural Products*, 65(3), 267–272.
- Ito, C., Matsui, T., Kobayashi, T., Tokuda, H., Shanmugam, S., & Itoigawa, M. (2018). Cancer chemopreventive activity of xanthenes from *Calophyllum elatum*. *Natural Product Communications*, 13(4), 447–449.

- Jiang, D., Niwa, M., y Koong, A. C. (2015). Targeting the IRE1 α –XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. *Seminars in Cancer Biology*, 33, 48–56.
- Joubert, A., Simoneau, P., Champion, C., Bataillé-Simoneau, N., Iacomi-Vasilescu, B., Poupard, P., François, J.M., Georgeault, S., Sellier, E., y Guillemette, T. (2011). Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Microbiology*, 79(5), 1305–1324.
- Karunakaran, T., Ee, G. C. L., Teh, S. S., Daud, S., Mah, S. H., Lim, C. K., Mian Jong, V.Y. y Awang, K. (2016). A new coumarin from stem bark of *Mesua hexapetala*. *Natural Product Research*, 30(14), 1591–1597.
- Kearns, D. M., Berry, P. E., Stevens, P. F., Cuello, N. L., Pipoly III, J. J., Robson, N. K., Weitzman, A. L. (1995). Clusiaceae. In J. A. Steyermark, P. E. Berry, K. Yatskievych, & B. K. Holst (Eds.), *Flora of the Venezuelan Guayana* (Vol. 4). Missouri Botanical Garden & Timber Press.
- Kijjoa, A., Gonzalez, M. J., Afonso, C. M., Pinto, M. M. M., Anantachoke, C., & Herz, W. (2000). Xanthones from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. *Phytochemistry*, 53(8), 1021–1024.
- Klass, J., Tinto, W. F., Mclean, S., & Reynolds, W. F. (1992). Friedelane triterpenoids from peritassa compta: Complete 1H and 13C assignments by 2D nmr spectroscopy. *Journal of Natural Products*, 55(11), 1626–1630.
- Krishnan, K., y Askew, D. S. (2014). The fungal UPR. A regulatory hub for virulence traits in the mold pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*, 5(2), 334–340.
- Laphookhieo, S., Maneerat, W., & Koysomboon, S. (2009). Antimalarial and Cytotoxic Phenolic Compounds from *Cratoxylum maingayi* and *Cratoxylum cochinchinense*. *Molecules*, 14(4), 1389–1395.

- Leyva, S. G., Velázquez-Martínez, G. C., Tlapal-Bolaños, B., Tovar-Pedraza, J. M., Rosas-Saito, G. H., y Alvarado-Gómez, O. G. (2015). Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 143–147.
- Lo Presti, L., López Díaz, C., Turrà, D., Di Pietro, A., Hampel, M., Heimel, K., y Kahmann, R. (2016). A conserved co-chaperone is required for virulence in fungal plant pathogens. *New Phytologist*, 209(3), 1135–1148.
- Loisel, S., Le Ster, K., Meyer, M., Berthou, C., Youinou, P., Kolb, J. P., & Billard, C. (2010). Therapeutic activity of two xanthenes in a xenograft murine model of human chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*, 3(1), 49.
- Lokvam, J., Braddock, J. F., Reichardt, P. B., y Clausen, T. P. (2000). Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Phytochemistry*, 55(1), 29–34.
- Ma, Z., y Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24(10), 853–863.
- Mah, S. H., Ee, G. C. L., Rahmani, M., Taufiq-Yap, Y. H., Sukari, M. A., & Teh, S. S. (2011). A New Pyranoxanthone from *Calophyllum soulattri*. *Molecules*, 16(5), 3999–4004.
- Mahabusarakam, W., Mecawun, P., y Phongpaichit, S. (2016). Xanthenes from the green branch of *Garcinia dulcis*. *Natural Product Research*, 30(20), 2323–2328.
- Mahabusarakam, W., Nuangnaowarat, W., & Taylor, W. C. (2005). Xanthone derivatives from *Cratoxylum cochinchinense* roots. *Phytochemistry*, 67(5),

470–474.

- Mariano, L. N. B., Vendramini-Costa, D. B., Ruiz, A. L. T. G., de Carvalho, J. E., Corrêa, R., Cechinel Filho, V., Delle Monache, F., y Niero, R. (2016). *In vitro* antiproliferative activity of uncommon xanthenes from branches of *Garcinia achachairu*. *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1697–1704.
- Mazimba, O., Nana, F., Kuete, V., y Singh, G. S. (2013). Xanthenes and Anthranoids from the Medicinal Plants of Africa. En *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry* (pp. 393–434). Elsevier Inc.
- McKee, T. C., Fuller, R. W., Covington, C. D., Cardellina, J. H., Gulakowski, R. J., Krepps, B. L., Boyd, M. R. (1996). New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. *Journal of Natural Products*, 59(8), 754–758.
- Monache, G. D., Monache, F. D., Bettolo, G. B. M., & de Lima, R. A. (1983). Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. *Journal of Natural Products*, 46(5), 655–659.
- Morel, C., Séraphin, D., Oger, J.-M., Litaudon, M., Sévenet, T., Richomme, P., & Bruneton, J. (2000). New Xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Journal of Natural Products*, 63(11), 1471–1474.
- Muñiz, H. M. (2014). Control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola utilizando como agente a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, facultad de ciencias biológicas. México. pp 59
- Muñoz, F. (2000). Estudio del papel protector de DNJ-27/ERdj5 en modelos de enfermedades neurodegenerativas en *Caenorhabditis elegans*. Tesis de doctorado. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla. pp 170.

- Muñoz Acuña, U., Dastmalchi, K., Basile, M. J., y Kennelly, E. J. (2012). Quantitative high-performance liquid chromatography photo-diode array (HPLC-PDA) analysis of benzophenones and biflavonoids in eight *Garcinia* species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 215–220.
- Negi, J. S., Bisht, V. K., Singh, P., Rawat, M. S. M., y Joshi, G. P. (2013). Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. *Journal of Applied Chemistry*, 2013, 1-9.
- Ng, I. M. J., Mah, S. H., & Chua, C. L. L. (2020). Immuno-modulatory effects of macluraxanthone on macrophage phenotype and function. *Natural Product Research*, 1–6.
- Noldin, V. F., Isaias, D. B., y Cechinel Filho, V. (2006). Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. *Química Nova*, 29(3), 549–554.
- Nugroho, A. E., Sasaki, T., Kaneda, T., Hadi, A. H. A., & Morita, H. (2017). Calofolic acids A–F, chromanones from the bark of *Calophyllum scriblitifolium* with vasorelaxation activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(10), 2124–2128.
- Obolskiy, D., Pischel, I., Siriwatanametanon, N., y Heinrich, M. (2009). *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy Research*, 23(8), 1047–1065.
- Oger, J.-M., Morel, Cé., Helesbeux, J.-J., Litaudon, M., Séraphin, D., Dartiguelongue, C., Larcher, G., Richomme, P., y Duval, O. (2003). First 2-Hydroxy-3-Methylbut-3-Enyl substituted xanthenes isolated from plants: Structure elucidation, synthesis and antifungal activity. *Natural Product Research*, 17(3), 195–199.
- Papandreou, I., Denko, N. C., Olson, M., Van Melckebeke, H., Lust, S., Tam, A., Solow-Cordero, D.E., Bouley, D.M., Offner, F., Niwa, M., y Koong, A. C.

- (2011). Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*, 117(4), 1311–1314.
- Parthasarathy, U., Nandakishore, O. P., Senthil Kumar, R., Nirmal Babu, K., Zachariah, T. J., y Parthasarathy, V. A. (2012). Chromatographic fingerprinting and estimation of organic acids in selected *Garcinia* species. *International Journal of innovative horticulture*, 1(1), 68–73.
- Pennington, T., & Sarukhán, J. (2005). *Arboles tropicales de México: manual para la identificación de las de las principales especies* (3a ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Peres, V., Nagem, T. J., y De Oliveira, F. F. (2000). Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry*, 55(7), 683–710.
- Plants of the World Online | Kew Science. (2020). [Online] Disponible en: <http://www.plantsoftheworldonline.org/> [Acceso 8 junio 2020].
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C., y Mongkolsuk, S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International journal of biological sciences*, 4(5), 330–337.
- Qu, Y., Wang, J., Zhu, X., Dong, B., Liu, X., Lu, J., y Lin, F. (2020). The P5-type ATPase Spf1 is required for development and virulence of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *Current Genetics*, 66(2), 385–395.
- Ramakrishna, A., y Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 6:11, 1720-1731.

- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., y Molina-Torres, J. (2000). Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*, 34, 207–215.
- Ramirez, M. V., y Hernandez, B. (2015). Plant-Derived Natural Products From the American Continent for the Control of Phytopathogenic Fungi: a Review. *Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences*, 3(4), 96–118.
- Reyes-Chilpa, R., Jimenez-Estrada, M., y Estrada-Muñiz, E. (1997). Antifungal Xanthones from *Calophyllum brasiliensis* Heartwood. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7), 1901–1911.
- Richie, D. L., Hartl, L., Aimanianda, V., Winters, M. S., Fuller, K. K., Miley, M. D., White, S., McCarthy, J.W., Latgé, J.P., Feldmesser, M., Rhodes, J.C., y Askew, D. S. (2009). A Role for the Unfolded Protein Response (UPR) in Virulence and Antifungal Susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 5(1), e1000258.
- Richomme, P. (2018). *Comunicación personal*. Identifying Natural Products as potential inhibitors for crop protection. Laboratorio SONAs, Angers, Francia
- Ritthiwigrom, T., Laphookhieo, S., & Pyne, S. (2013). Chemical constituents and biological activities of *Garcinia cowa* Roxb. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 7, 212–231.
- Rodriguez-Guadarrama, A., Guevara-Gonzalez, R. G., Romero-Gomez, S. de J., y Feregrino-Perez, A. (2018). Antifungal activity of Mexican endemic plants on agricultural phytopathogens: a review. En 2018 XIV International Engineering Congress (CONIIN) (pp. 1–11). IEEE.

- Ruan, J., Zheng, C., Liu, Y., Qu, L., Yu, H., Han, L., Zhang, Y., y Wang, T. (2017). Chemical and Biological Research on Herbal Medicines Rich in Xanthones. *Molecules*, 22(10), 1698.
- Saborío, D., Sáenz, V., Arauz, L. F., Bertsch, F., y Felipe, L. (2000). Efecto del calcio en aplicaciones pre cosecha y pos cosecha sobre la severidad de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y la calidad de frutos de papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Costarricense*, 24(2), 77–88.
- Salih Aljabry, A., Hussein, N. M., Ali, M. S., Mohamed, L. A., Saleh, M. M., y Alrashied, A. A. (2017). Antimicrobial and antifungal properties of *Garcinia kola* on some standard laboratory pathogens. *International Journal of Medical and Health Sciences Journal Home*, 6(4), 201-205.
- Sangsuwon, C., & Jiratchariyakul, W. (2015). Antiproliferative Effect of Lung Cancer Cell Lines and Antioxidant of Macluraxanthone from *Garcinia Speciosa* Wall. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 197, 5–07.
- Schmitz, L., Schwier, M. A., y Heimel, K. (2019). The unfolded protein response regulates pathogenic development of *Ustilago maydis* by rok1-dependent inhibition of mating-type signaling. *mBio*, 10(6). e02756-19.
- Shen, Y.-C., Wang, L.-T., Khalil, A. T., Chiang, L. C., & Cheng, P.-W. (2005). Bioactive Pyranoxanthones from the Roots of *Calophyllum blancoi*. *Notes Chem. Pharm. Bull*, 53(2), 244–247.
- Shen, Y.-C., Wang, L.-T., Khalil, A. T., & Kuo, Y.-H. (2004). Chromanones and Dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52, 402–405.
- Sichaem, J., Tip-Pyang, S., & Siripong, P. (2018). Chemical constituents from the root bark of *Calophyllum inophyllum*. *Natural Product Communications*, 13(6), 727–729.

- Stevens, P. F. (2007). Clusiaceae-Guttiferae. En *The Families and Genera of Vascular Plants* (pp. 48–66). Springer. Berlin, Heidelberg.
- Su, X.-H., Zhang, M.-L., Li, L.-G., Huo, C.-H., Gu, Y.-C., & Shi, Q.-W. (2008). Chemical Constituents of the Plants of the Genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, 5(12), 2579–2608.
- Teh, S., Cheng, G., Mah, S. H., Lim, Y. M., & Ahmad, Z. (2013). Cytotoxicity and Structure-Activity Relationships of Xanthone Derivatives from *Mesua beccariana*, *Mesua ferrea* and *Mesua congestiflora* towards Nine Human Cancer Cell Lines. *Molecules*, 18(2):1985-94.
- Terra, W., Vieira, I., Braz-Filho, R., Freitas, W., Kanashiro, M., & Torres, M. (2013). Lepidotrichilins A and B, New Protolimonoids with Cytotoxic Activity from *Trichilia Lepidota* (Meliaceae). *Molecules*, 18(10), 12180–12191.
- The angiosperm phylogeny group. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121.
- Treo-Torres, J. C., y Rodríguez, J. (2014). Listas para Usarse: Lista de árboles del Mayab (Campeche, Quintana Roo y Yucatán). En: www.PlantasDelMayab.com. The Institute for Regional Conservation – Programa para la Península de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Vargas-Arispuro, I., Contreras-Valenzuela, A., y Martínez-Téllez, M. Á. (2009). Lignans from *Larrea tridentate* (creosote bush) as fungal β -1,3-glucanase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94(2–3), 60–63.
- Vargas-Arispuro, I., Fraijo-Martínez, M., Vallejo-Cohen, S., Corrales-Maldo-Nado, C., y Ángel Martínez-Téllez, M. (2017). Buscando agentes antifúngicos naturales: Ensayo sensible para detectar inhibidores de endo-1,3- β -

- glucanasa en extractos crudos de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 130–138.
- Vieira, L., y Kijjoa, A. (2005). Naturally-Occurring Xanthones: Recent Developments. *Current Medicinal Chemistry*, 12(21), 2413–2446.
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559–902.
- Wallert, M., Bauer, J., Kluge, S., Schmölz, L., Chen, Y. C., Ziegler, M., Searle, A.K., Maxones, A., Schubert, M., Thürmer, M., Pein, H., Koeberle, A., Werz, O., Birringer, M., Peter K., y Lorkowski, S. (2019). The vitamin E derivative garcinoic acid from *Garcinia kola* nut seeds attenuates the inflammatory response. *Biology Redox*, 24. 101166.
- Walter, P., y Ron, D. (2012). The Unfolded Protein Response : *Science*, 334(2011), 1081–1086.
- Waterman, P. G., & Crichton, E. G. (1980). Xanthones, benzophenones and triterpenes from the stem bark of *Garcinia ovalifolia*. *Planta Medica*, 40(4), 351–355.
- Westerman, P. W., Gunasekera, S. P., Uvais, M., Sultanbawa, S., & Kazlauskas, R. (1977). Carbon-13 n.m.r. study of naturally occurring xanthones. *Organic Magnetic Resonance*, 9(11), 631–636.
- Wiseman, R. L., Haynes, C. M., y Casadevall, A. (2018). Coordinating Organismal Physiology Through the Unfolded Protein Response. Springer, Cham pp.218.
- Wolfrom, M. L., Dickey, E. E., McWain, P. M., Thompson, A., Looker, J. H., Windrath, O. M., & Komitsky, F. (1964). Osage Orange Pigments. XIII. Isolation of Three New Pigments from the Root Bark. *Journal of Organic Chemistry*,

29(3), 689–691.

- Xiang, Q., Wu, M., Zhang, L., Fu, W., Yang, J., Zhang, B., Xu, H. (2020). Gerontoxanthone I and Macluraxanthone Induce Mitophagy and Attenuate Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in Pharmacology*, 11:452.
- Xiao, Q., Zeng, Y. B., Mei, W. L., Zhao, Y. X., Deng, Y. Y., & Dai, H. F. (2008). Cytotoxic prenylated xanthenes from *Calophyllum inophyllum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(10), 993–997.
- Yimdjo, M. C., Azebaze, A. G., Nkengfack, A. E., Meyer, A. M., Bodo, B., & Fomum, Z. T. (2004). Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*, 65(20), 2789–2795.
- Zhang, H., Li, Y., Dickman, M. B., y Wang, Z. (2019). Cytoprotective co-chaperone bcbag1 is a component for fungal development, virulence, and Unfolded Protein Response (UPR) of *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 685.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S3. 1 ^1H NMR (400 Hz) and ^{13}C -NMR (100 Hz) spectral data (CDCl_3) of the precipitate from fraction **1K**.

Position	δ_c	δ_H (H, mult. J _{Hz})	HMBC H--→C
1	117.8	7.66 (1H, d, 8.8)	C-3, C-4a, C-9
2	113.0	6.92 (1H,d,8.8)	C-3, C-4, C-9a
3	149.2		
4	131.2		
4a	144.7		
4b	154.3		
5	113.3		
6	159.1		
7	105.8		
8	156.9		
8a	103.2		
9a	113.9		
9	181.0		
1'	116.3	6.75 (1H, d, 10.0)	C-6, C-7, C-8, C-3'
2'	127.4	5.59 (1H, d, 10.0)	C-7, C-3', C-4'-5'
3'	78.5		
4'	28.1	1.49 (6H, s)	C-3', C-2'
5'	28.1		
6'	41.6		
7'	157.1	6.7 (1H, dd, 10.6, 17.7)	C-5, C-6', C-9', C-10'
8'	103.5	5.02 (1H, dd,10.6, 1.4) 5.20 (1H,dd,17.7, 1.4)	C-6' C-6', C-7'
9'	28.4	1,62 (6H, s)	C-5, C-6', C-7'
10'	28.4		
3-OH			
4-OH		6.24 (1H,s)	C-3, C-4, C-4a
8-OH		13.51 (1H,s)	C-7, C-8a, C-8

Table S3. 2 Experimental and reported spectroscopic data in CDCl₃ for **1-3** predicted in fraction **1K**

N° C	1 ^{exp}	1 ²⁴	2 ²⁵	3 ⁴⁴
C-1	117.7	117.7	116.0	116.0
C-2	113.0	113.0	124.2	113.2
C-3	149.2	149.3	119.6	152.1
C-4	131.3	131.3	154.0	132.6
C-4a	144.7	44.8*	145.3	146.1
C-4b	154.3	154.3	156.7	156.5
C-5	113.3	113.3	113.2	94.7
C-6	159.1	159.1	159.4	156.7
C-7	105.7	105.8	104.1	103.8
C-8	156.9	157.0	156.7	159.6
C-8a	103.2	105.8	116.8	102.3
C-9a	113.9	113.9	103.6	113.0
C-9	181.0	181.0	181.3	180.0
C-1'	116.3	116.3	116.1	114.5
C-2'	127.4	127.4	127.3	128.2
C-3'	78.4	78.5	78.4	78.4
C-4'	28.1	28.2	28.0	27.9
C-5'	28.1	28.2	28.0	27.9
C-6'	41.6	41.7	41.3	
C-7'	157.0	157.0	155.8	
C-8'	103.5	103.6	104.1	
C-9'	28.4	28.4	28.3	
C-10'	28.4	28.4	28.3	

* This value should be 144.8 ppm.

Table S3. 3 Experimental and reported spectroscopic data for **1** and **4** predicted in fraction **1J** (acetone-d₆)

N° C	1^{exp}	1³⁶	4^{exp}	4⁴⁵
C-1	117.2	117.2	110.0	110.2
C-2	113.8	113.7	154.8	154.9
C-3	151.8	151.6	125.1	125.1
C-4	133.7	133.6	120.4	120.3
C-4a	146.9	146.7	151.0	151.1
C-4b	156.1	155.9	157.1	157.2
C-5	114.3	114.2	119.0	119.0
C-6	159.7	159.6	135.8	135.7
C-7	105.8	105.7	124.7	124.7
C-8	157.4	157.3	127.1	127.1
C-8a	103.7	103.6	122.0	122.1
C-9a	114.5	114.4	123.6	123.4
C-9	181.9	181.8	176.9	176.9
C-1'	116.4	116.4		
C-2'	128.4	128.2		
C-3'	79.0	79.0		
C-4'	28.1	28.0		
C-5'	28.1	28.0		
C-6'	41.9	41.8		
C-7'	152.9	152.9		
C-8'	107.4	107.2		
C-9'	30.0	29.9		
C-10'	30.0	29.9		

Table S3. 4 Experimental and reported spectroscopic data for **6-8** predicted in fraction **1D** (CDCl₃)

N° C	7^{exp}	7⁴⁷	6⁴⁶	8⁴⁸
C-2	79.1	78.8	78.8	76.0
C-3	45.7	45.7	45.7	44.4
C-4	199.6	199.3	199.3	200.6
C-5	157.2	157.0	159.9	154.0
C-6	115.9	115.7	116.7	125.6
C-7	125.8	125.7	125.6	115.8
C-8	78.4	78.1	78.1	78.7
C-10	109.2	109.2	109.9	100.9
C-11	160.1	159.9	158.2	159.9
C-12	102.0	101.9	101.9	100.8
C-13	102.8	102.6	102.2	110.0
C-14	160.1	159.9	157.0	162.3
C-15	19.7	19.5	19.5	16.4
C-16	10.6	10.5	10.4	9.4
C-17	28.2	28.0	28.3	28.4
C-18	28.3	28.4	28.4	28.4
C-19	30.5	30.5	30.6	30.2
C-20	38.9	39.0	38.5	38.1
C-21	179.5	179.4	178.2	178.7
C-22	35.6	35.5	32.9	35.2
C-23	20.9	20.8	29.7	20.8
C-24	14.2	14.0	22.5	13.9
C-25			14.0	

Table S3. 5 Experimental and reported spectroscopic data for **7**, **9** and **10** predicted in fraction **1G** (CDCl₃)

N° C	7 ^{exp}	7 ⁴⁷	9 ^{exp}	9 ⁴⁷	10 ^{exp}	10 ⁴⁹
C-2	79.1	78.8	76.3	76.0	178.8	178.7
C-3	45.9	45.7	44.4	44.2	38.7	38.4
C-4	199.6	199.3	201.5	201.1	30.6	30.4
C-5	157.2	157.0	157.2	157.3	109.0	108.8
C-6	115.8	115.7	115.9	115.6	157.2	157.0
C-7	125.8	125.7	125.8	125.6	78.3	78.1
C-8	78.3	78.1	78.4	78.2	125.8	125.7
C-10	109.1	109.2	109.1	108.9	115.8	115.7
C-11	160.1	159.9	160.1	160.0	102.8	102.6
C-12	102.1	101.9	101.4	101.2	160.0	159.9
C-13	102.8	102.6	102.8	102.6	102.1	101.8
C-14	160.1	159.9	160.1	159.8	160.0	159.9
C-15	19.7	19.5	16.5	16.2	199.6	199.3
C-16	10.7	10.5	9.5	9.2	45.9	45.7
C-17	28.2	28.0	28.2	28.1	79.0	78.8
C-18	28.4	28.4	28.5	28.5	19.7	19.5
C-19	30.6	30.5	30.6	30.5	35.7	35.5
C-20	38.7	39.0	38.7	38.6	21.0	20.7
C-21	178.9	179.4	178.8	179.4	14.2	14.0
C-22	35.7	35.5	35.7	35.5	28.2	28.0
C-23	21.0	20.8	21.0	20.7	28.4	28.4
C-24	14.3	14.0	14.2	13.9	10.7	10.5

Table S3. 6 Experimental and reported spectroscopic data for **11**, **12** and **13** predicted in fraction **2G** (CDCl₃)

N° C	11 ^{exp}	11 ⁵⁰	12 ^{exp}	12 ⁵¹	13 ^{exp}	13 ⁵¹
C-1	149.0	148.8	37.4	37.3	37.4	37.2
C-2	149.3	149.1	32.1	31.9	32.1	31.9
C-3	120.4	120.2	72.0	71.8	72.0	71.8
C-4	113.4	113.1	42.5	42.4	42.5	42.4
C-4a	149.3	149.8				
C-4b	155.7	155.7				
C-5	117.6	117.3	140.9	140.8	140.9	140.8
C-6	134.6	134.4	121.9	121.7	121.9	121.7
C-7	123.8	123.6	34.1	34.0	34.1	34.0
C-8	126.9	126.7	32.3	31.9	32.3	31.9
C-8a	122.3	122.1				
C-9a	117.4	117.1				
C-9	176.9	176.6	50.3	50.2	50.3	50.2
C-10			36.7	36.2	36.7	36.5
C-11			21.3	21.2	21.3	21.1
C-12			39.8	39.8	39.8	39.8
C-13			42.4	42.4	42.4	42.4
C-14			56.9	56.8	56.9	56.8
C-15			24.5	24.3	24.5	24.3
C-16			29.1	28.9	29.1	28.9
C-17			56.1	56.1	56.1	56.1
C-18			12.2	12.0	12.2	12.0
C-19			19.4	19.4	19.4	19.4
C-20			39.6	39.8	39.6	39.8
C-21			19.2	19.1	20.0	18.8
C-22			138.5	138.3	31.8	31.9
C-23			129.9	129.3	26.2	26.2
C-24			50.3	50.2	45.9	45.9
C-25			32.1	31.7	29.7	29.7
C-26			21.3	21.2	19.8	19.8
C-27			19.8	19.8	19.8	19.8
C-28			25.2	25.4	23.2	23.1
C-29			12.0	12.0	12.0	11.9
OMe-1	61,9	61.7				
OMe-2	57.3	57.1				

Table S3. 7 Experimental and reported spectroscopic data for **4** and **14** predicted in fraction **2J** (Acetone-d₆)

N° C	4 ^{exp}	4 ⁴⁵	14 ^{exp}	14 ⁴⁵
C-1	110.1	110.2	162.8	162.8
C-2	155.0	154.9	110.6	110.6
C-3	125.1	125.1	137.9	137.8
C-4	120.3	120.3	107.8	107.7
C-4a	151.1	151.1	157.4	157.4
C-4b	157.1	157.2	151.1	151.1
C-5	119.1	119.0	120.3	120.2
C-6	135.5	135.7	126.2	126.2
C-7	124.5	124.7	155.0	155.0
C-8	127.1	127.1	109.2	109.2
C-8a	122.2	122.1	121.9	121.9
C-9a	123.6	123.4	109.0	109.2
C-9	177.1	176.9	183.0	183.0

Table S3. 8 Experimental and reported spectroscopic data for **5**, **14** and **15** predicted in the precipitate from fraction **2J** (dimethylsulfoxide-d₆)

N° C	5 ^{exp}	5 ⁵²	14 ^{exp}	14 ⁴⁴	15 ^{exp}	15 ⁴⁴
C-1	115.2	115.2	160.9	160.9	161.0	161.0
C-2	124.0	124.1	109.6	109.5	109.9	110.0
C-3	120.2	120.2	137.1	137.0	137.3	137.4
C-4	146.7	146.7	107.1	107.0	107.3	107.4
C-4a	145.2	145.2	155.6	155.7	155.8	155.7
C-4b	155.4	155.4	149.3	149.2	145.2	145.3
C-5	118.3	118.3	119.3	119.2	146.5	146.5
C-6	135.4	135.4	125.5	125.5	121.0	121.1
C-7	124.2	124.3	154.1	154.0	124.3	124.5
C-8	126.0	126.0	107.8	107.8	114.6	114.7
C-8a	120.9	120.9	120.4	120.4	120.9	121.0
C-9a	122.3	122.2	107.9	107.8	108.1	108.2
C-9	176.2	176.2	181.6	181.4	182.0	182.1

Table S3. 9 Experimental and reported spectroscopic data for **4** predicted in fraction **2K** (Acetone- d_6)

N° C	4^{exp}	4⁴⁵
C-1	109.9	110.2
C-2	154.8	154.9
C-3	125.1	125.1
C-4	120.3	120.3
C-4a	150.9	151.1
C-4b	157.1	157.2
C-5	119.1	119.0
C-6	135.8	135.7
C-7	124.7	124.7
C-8	127.0	127.1
C-8a	122.0	122.1
C-9a	123.3	123.4
C-9	176.9	176.9

Table S3. 10 Experimental and reported spectroscopic data for **16** and **17** predicted in fraction **2B** (CDCl₃)

N° C	16^{exp}	16⁵³	17^{exp}	17⁵⁴
C-1	-	-	22.5	22.3
C-2	167.6	167.5	41.7	41.5
C-3	37.0	36.8	213.6	213.2
C-4	28.5	28.5	58.4	58.2
C-4a	105.7	105.6	-	-
C-4b	156.2	156.1	-	-
C-5	-	-	42.3	42.1
C-6	79.1	79.1	41.4	41.3
C-7	46.2	46.5	18.4	18.2
C-8	199.8	199.7	53.3	53.1
C-8a	104.1	104.0	-	-
C-9	160.0	159.8	37.6	37.4
C-10	110.5	110.3	59.6	59.4
C-10a	156.2	155.9	-	-
C-11	21.4	21.3	35.5	35.6
C-12	121.6	121.4	30.7	30.5
C-13	132.6	132.4	39.7	39.7
C-14	25.9	25.7	38.5	38.3
C-15	18.0	17.8	32.7	32.8
C-16	34.6	34.3	36.2	36.0
C-17	20.1	19.9	30.2	30.0
C-18	14.1	13.8	42.9	42.8
C-19	19.5	19.5	35.3	35.3
C-20	10.3	10.2	28.4	28.2
C-21	-	-	32.5	32.4
C-22	-	-	39.1	39.2
C-23	-	-	7.0	6.8
C-24	-	-	14.8	14.6
C-25	-	-	17.9	17.9
C-26	-	-	20.3	20.3
C-27	-	-	18.9	18.7
C-28	-	-	32.0	32.1
C-29	-	-	31.8	31.8
C-30	-	-	35.2	35.0

Table S3. 11 Experimental and reported spectroscopic data for **11**, **12** and **13** predicted in fraction **2F** (CDCl₃)

N° C	11 ^{exp}	11 ⁵⁰	12 ^{exp}	12 ⁵¹	13 ^{exp}	13 ⁵¹
C-1	149.0	148.8	37.2	37.3	37.2	37.2
C-2	149.3	149.1	31.9	31.9	31.9	31.9
C-3	120.4	120.2	72.0	71.8	72.0	71.8
C-4	113.4	113.1	42.5	42.4	42.5	42.4
C-4a	149.3	149.8				
C-4b	155.7	155.7				
C-5	117.6	117.3	140.9	140.8	140.9	140.8
C-6	134.6	134.4	121.9	121.7	121.9	121.7
C-7	123.8	123.6	34.1	34.0	34.1	34.0
C-8	126.9	126.7	32.1	31.9	32.1	31.9
C-8a	122.3	122.1				
C-9a	117.4	117.1				
C-9	176.8	176.6	50.3	50.2	50.3	50.2
C-10			36.3	36.2	36.3	36.5
C-11			21.3	21.2	21.3	21.1
C-12			39.9	39.8	39.9	39.8
C-13			42.5	42.4	42.5	42.4
C-14			56.9	56.8	56.9	56.8
C-15			24.5	24.3	24.5	24.3
C-16			29.1	28.9	29.1	28.9
C-17			56.1	56.1	56.1	56.1
C-18			12.0	12.0	12.0	12.0
C-19			19.6	19.4	19.6	19.4
C-20			39.8	39.8	39.8	39.8
C-21			19.2	19.1	18.9	18.8
C-22			138.5	138.3	31.8	31.9
C-23			129.4	129.3	26.2	26.2
C-24			50.3	50.2	46.0	45.9
C-25			31.6	31.7	29.3	29.7
C-26			21.3	21.2	20.0	19.8
C-27			20.0	19.8	20.0	19.8
C-28			25.6	25.4	23.2	23.1
C-29			12.0	12.0	12.0	11.9
OMe-1	61,9	61,7				
OMe-2	57.3	57.1				

Eluting solvent: Hexane:Acetone 8:2
Stain: Phosphomolybdic Acid

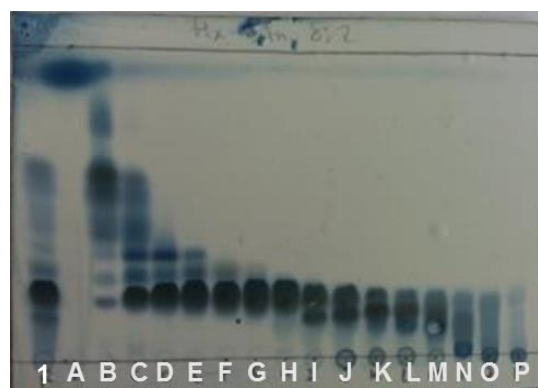


Figure S3. 1 Semipurified fractions (1A to 1P) obtained from the VLC purification of the low polarity fraction of the stem bark extract from *C. brasiliense*.

Eluting solvent: Hexane:Acetone 8:2
Stain: Phosphomolybdic Acid

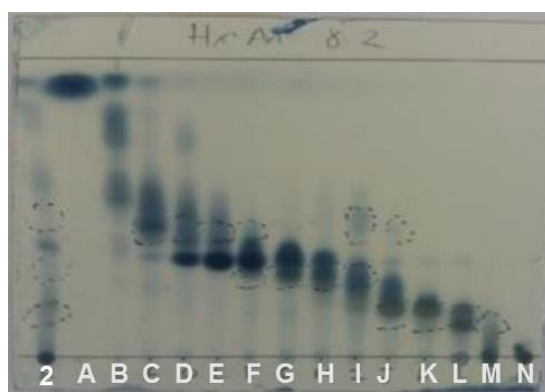


Figure S3. 2 Semipurified fractions (2A to 2N) obtained from the VLC purification of the medium polarity fraction of the stem bark extract from *C. brasiliense*.

Eluting solvent: Hexane:Acetone:Metanol 60:38:2
Stain: Phosphomolybdic Acid



Figure S3. 3 Chromatographic profile (TLC) of the precipitates from fractions **1I**, **1J**, and **1K**, obtained from the VLC purification of the low-polarity fraction.

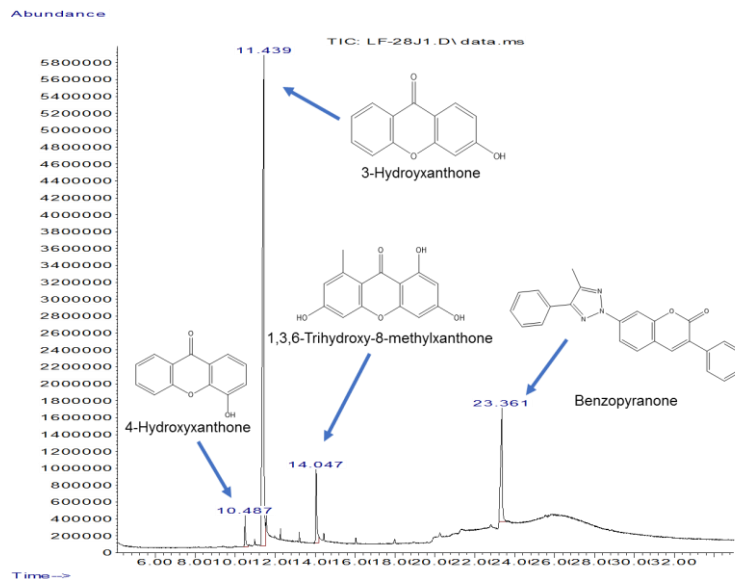


Figure S3. 4 12GC-MS chromatographic profile of the precipitate from fraction **1K**, obtained from VLC purification of the low polarity fraction of the stem bark extract of *C. brasiliense*.

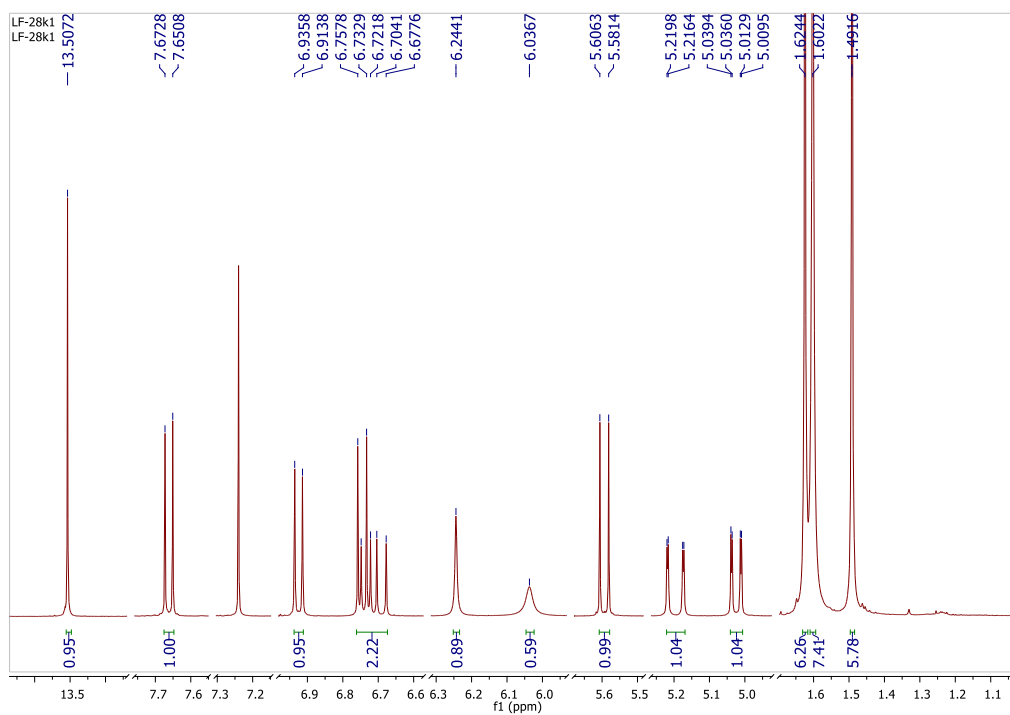


Figure S3.5 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) spectrum of the precipitate from fraction 1K.

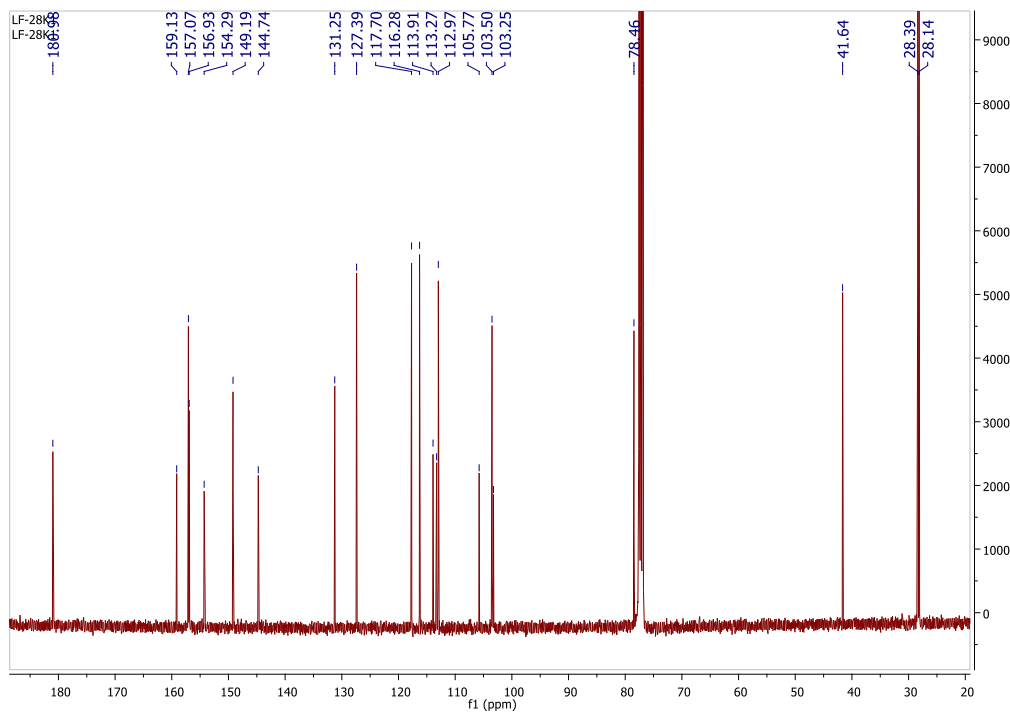


Figure S3.6 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) spectrum of the precipitate from fraction 1K.

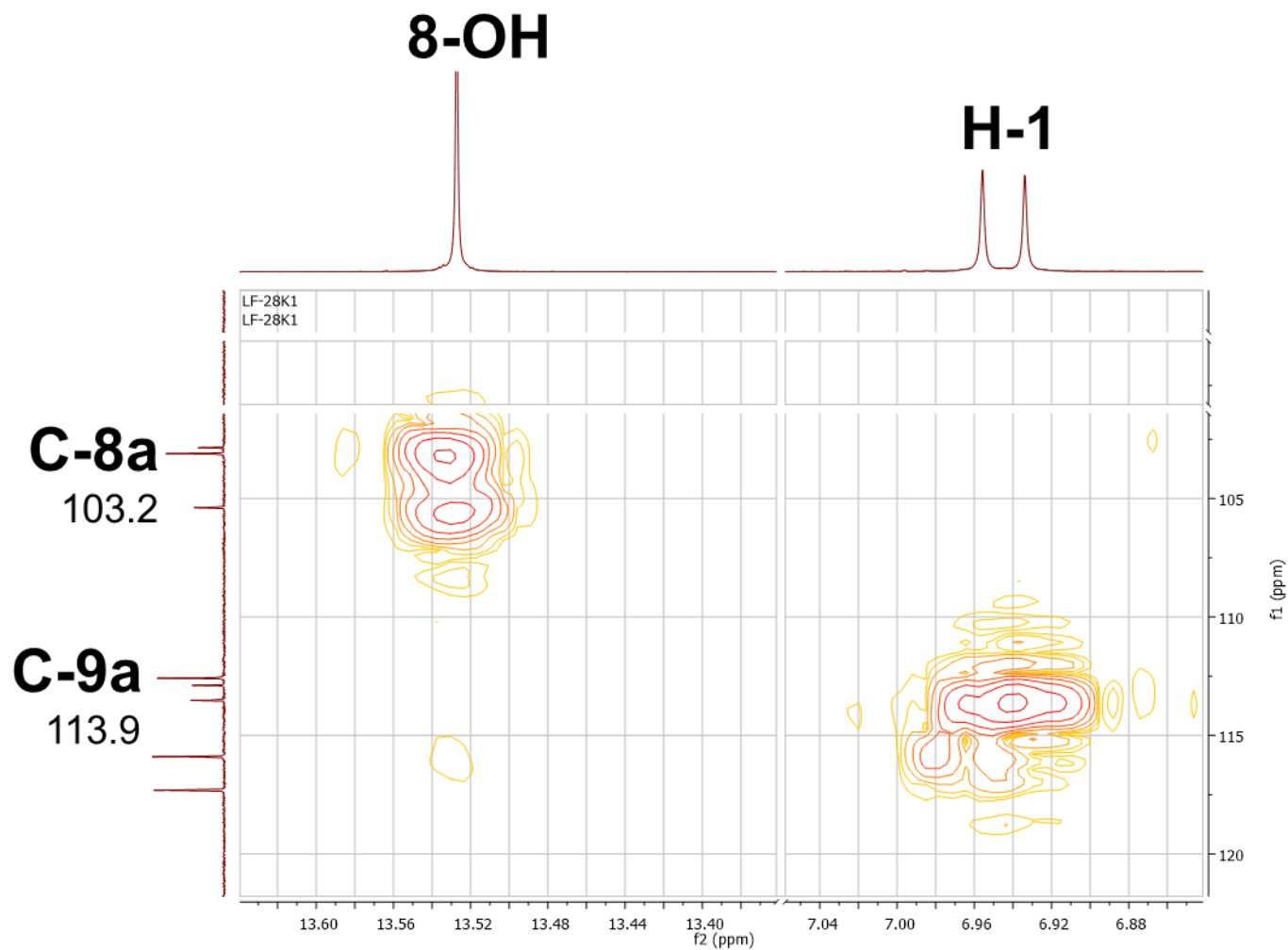
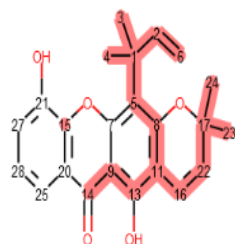
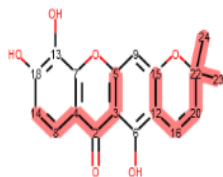


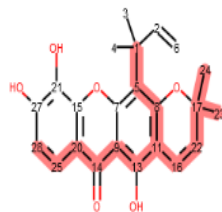
Figure S3.7 Expansion of HMBC experiment of the precipitate from fraction **1K**.



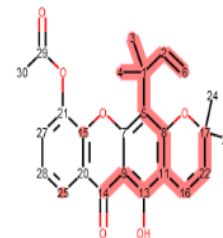
Rank: 1 MW: 378.42
CAS-155566-36-2
Score: 0.74 (17/23 C)
Deviation : 4.78 ppm



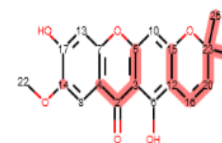
Rank: 2 MW: 326.3
CAS-3811-29-8
Score: 0.72 (13/18 C)
Deviation : 9.19 ppm



Rank: 3 MW: 394.42
CAS-5848-14-6
Score: 0.65 (15/23 C)
Deviation : 7.31 ppm



Rank: 4 MW: 420.45
CAS-853105-08-5
Score: 0.64 (16/25 C)
Deviation : 6.59 ppm



Rank: 5 MW: 340.33
CAS-407622-60-0
Score: 0.63 (12/19 C)
Deviation : 5.36 ppm

Figure S3.8 Part of displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **1K** using the *Calophyllum DB*

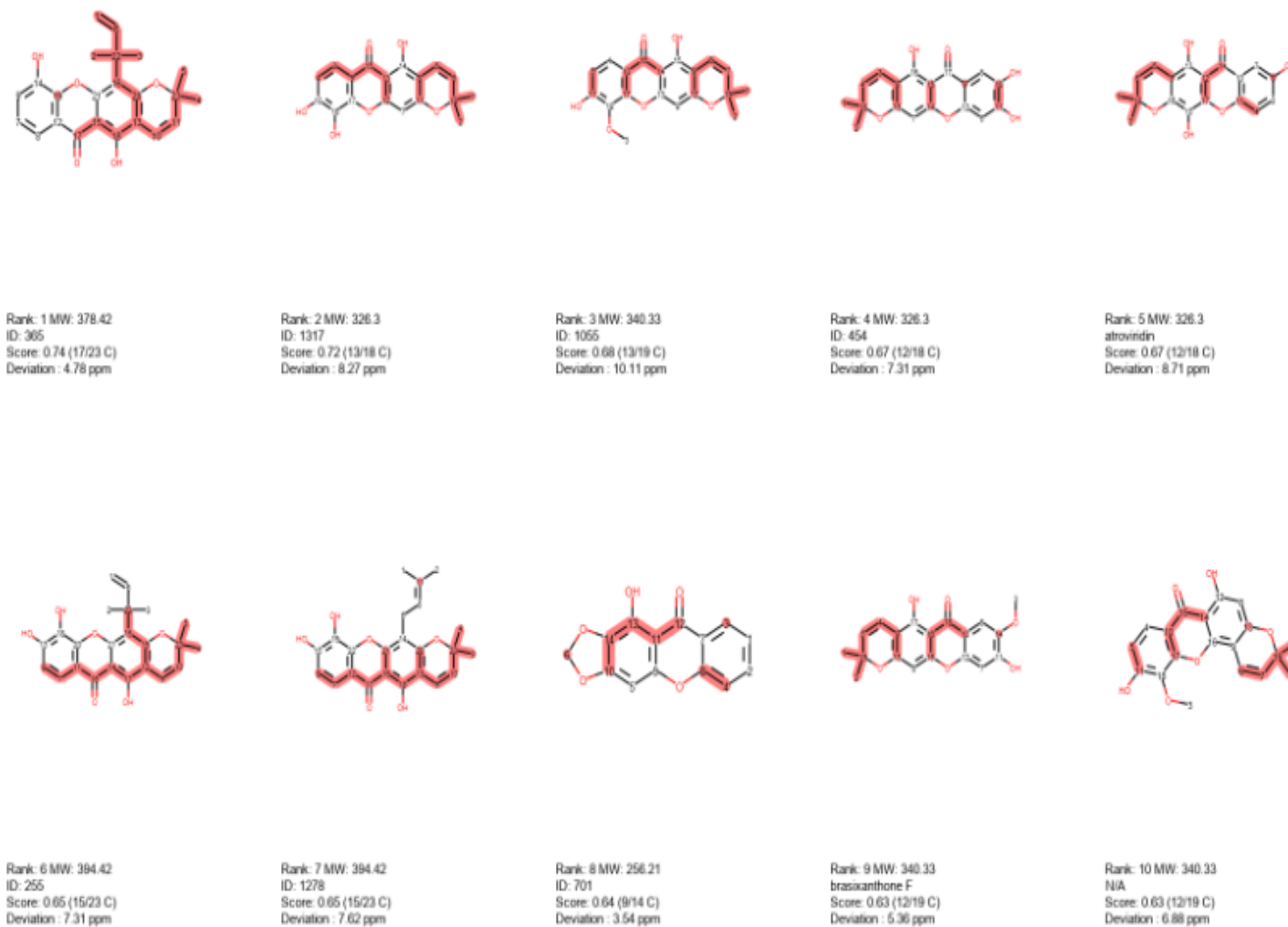


Figure S3.9 Part of displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **1K** using the Xanthones DB

Datafile Name: LF-CBM-2A-28K_27022020_005.lcd
 Sample Name: LF-CBM-2A-28K

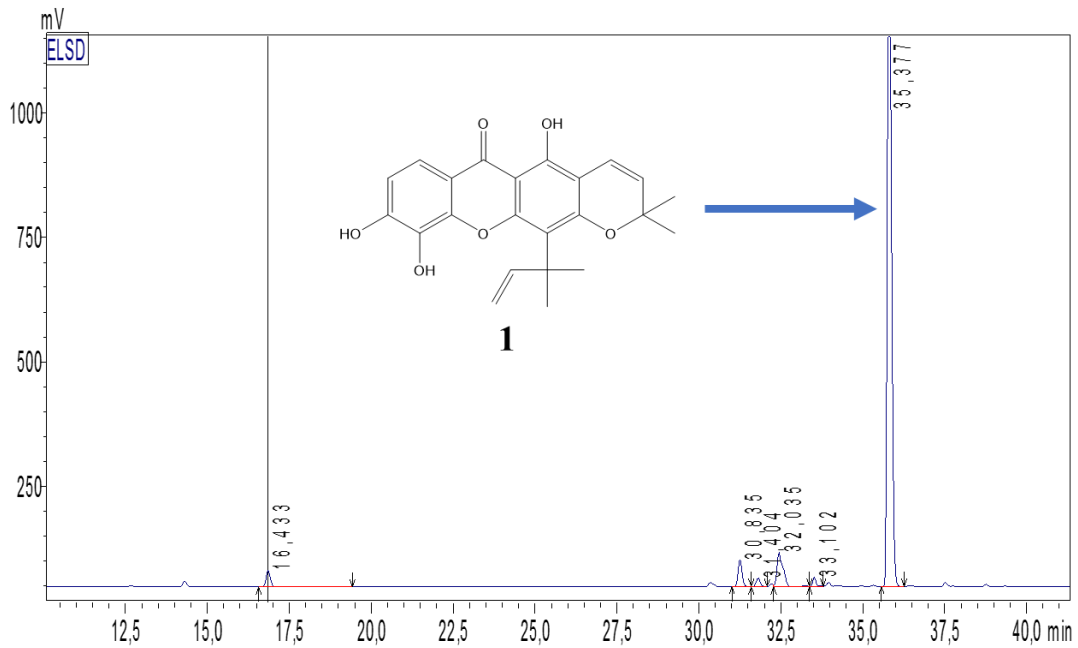


Figure S3.10 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 1K

Datafile Name: LF-CBM-2A-28J_27022020_004.lcd
 Sample Name: LF-CBM-2A-28J

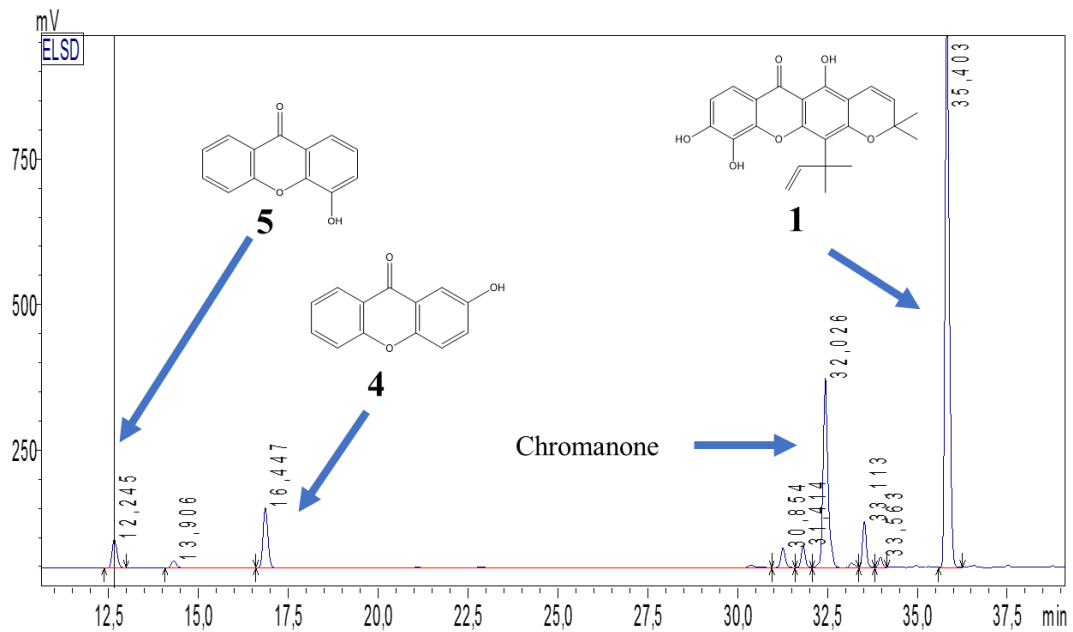


Figure S3.11 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 1J

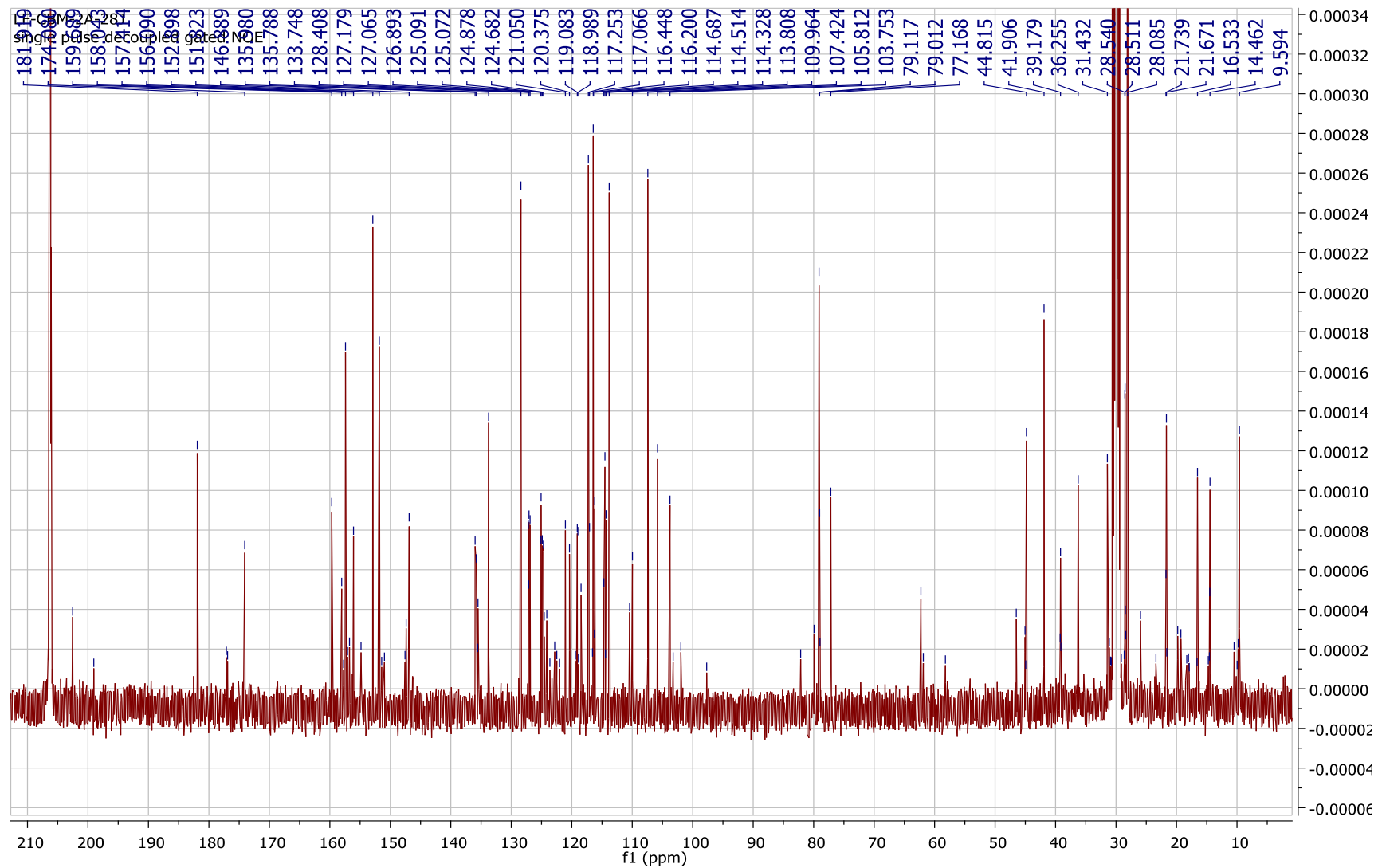


Figure S3.12 ^{13}C -NMR (100 MHz, acetone- d_6) spectrum of fraction 1J

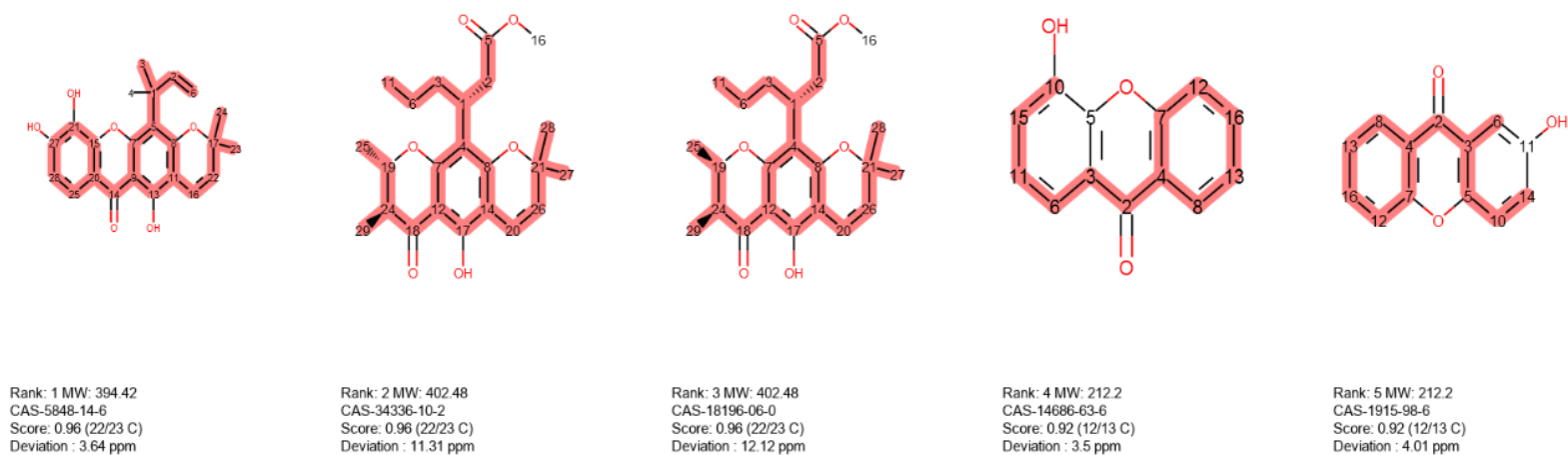
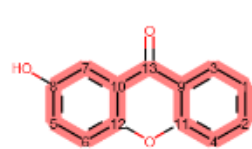
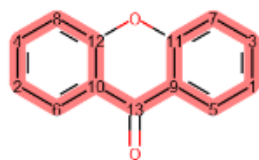


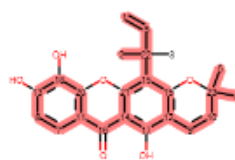
Figure S3.13 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **1J** using *Calophyllum* DB



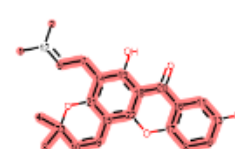
Rank: 1 MW: 212.2
ID: 308
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 5.82 ppm



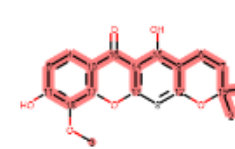
Rank: 2 MW: 196.2
ID: 1
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 7.85 ppm



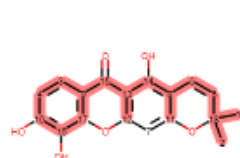
Rank: 3 MW: 394.42
ID: 255
Score: 0.96 (22/23 C)
Deviation : 3.64 ppm



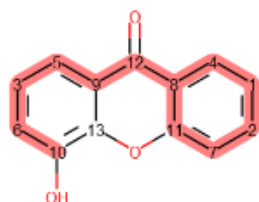
Rank: 4 MW: 378.42
ID: 1035
Score: 0.96 (22/23 C)
Deviation : 12.42 ppm



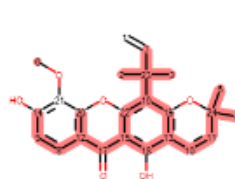
Rank: 5 MW: 340.33
ID: 1055
Score: 0.95 (18/19 C)
Deviation : 8.95 ppm



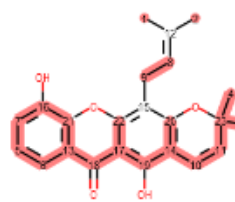
Rank: 6 MW: 326.3
ID: 1317
Score: 0.94 (17/18 C)
Deviation : 8.76 ppm



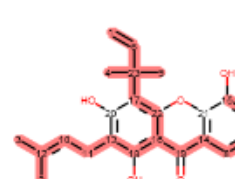
Rank: 7 MW: 212.2
ID: 519
Score: 0.92 (12/13 C)
Deviation : 4.95 ppm



Rank: 8 MW: 408.44
ID: 1182
Score: 0.92 (22/24 C)
Deviation : 9.07 ppm

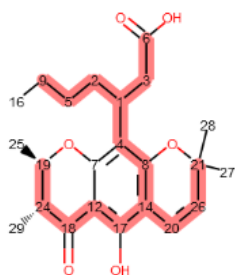


Rank: 9 MW: 378.42
ID: 1123
Score: 0.91 (21/23 C)
Deviation : 9.07 ppm

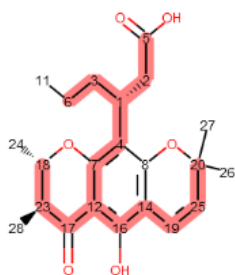


Rank: 10 MW: 380.43
ID: 1584
Score: 0.91 (21/23 C)
Deviation : 9.33 ppm

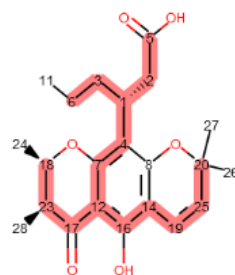
Figure S3.14 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction 1J using Xanthones DB



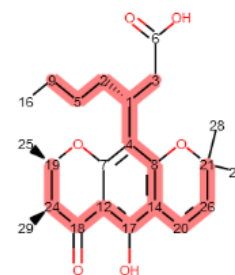
Rank: 1 MW: 402.48
CAS-1037015-53-4
Score: 0.74 (17/23 C)
Deviation : 6.5 ppm



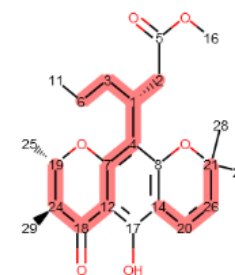
Rank: 2 MW: 388.45
CAS-34366-34-2
Score: 0.73 (16/22 C)
Deviation : 1.83 ppm



Rank: 3 MW: 388.45
CAS-18196-05-9
Score: 0.73 (16/22 C)
Deviation : 1.84 ppm

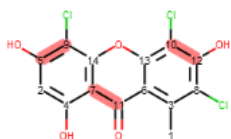


Rank: 4 MW: 402.48
CAS-2098424-85-0
Score: 0.7 (16/23 C)
Deviation : 5.09 ppm

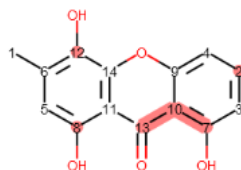


Rank: 5 MW: 402.48
CAS-34336-10-2
Score: 0.61 (14/23 C)
Deviation : 1.9 ppm

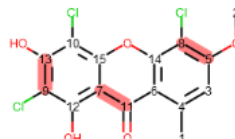
Figure S3.15 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **1D** using *Callophyllum* DB



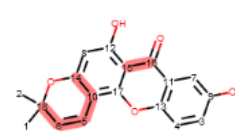
Rank: 1 MW: 361.56
ID: 336
Score: 0.43 (6/14 C)
Deviation : 3.25 ppm



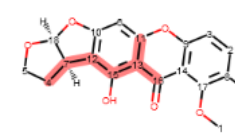
Rank: 2 MW: 258.23
ID: 1399
Score: 0.43 (6/14 C)
Deviation : 3.67 ppm



Rank: 3 MW: 375.59
ID: 741
Score: 0.4 (6/15 C)
Deviation : 2.9 ppm



Rank: 4 MW: 310.3
ID: 1692
Score: 0.39 (7/18 C)
Deviation : 5.68 ppm



Rank: 5 MW: 360.75
ID: 1088
Score: 0.39 (7/18 C)
Deviation : 6.85 ppm

Figure S3.16 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **1D** using Xanthonces DB

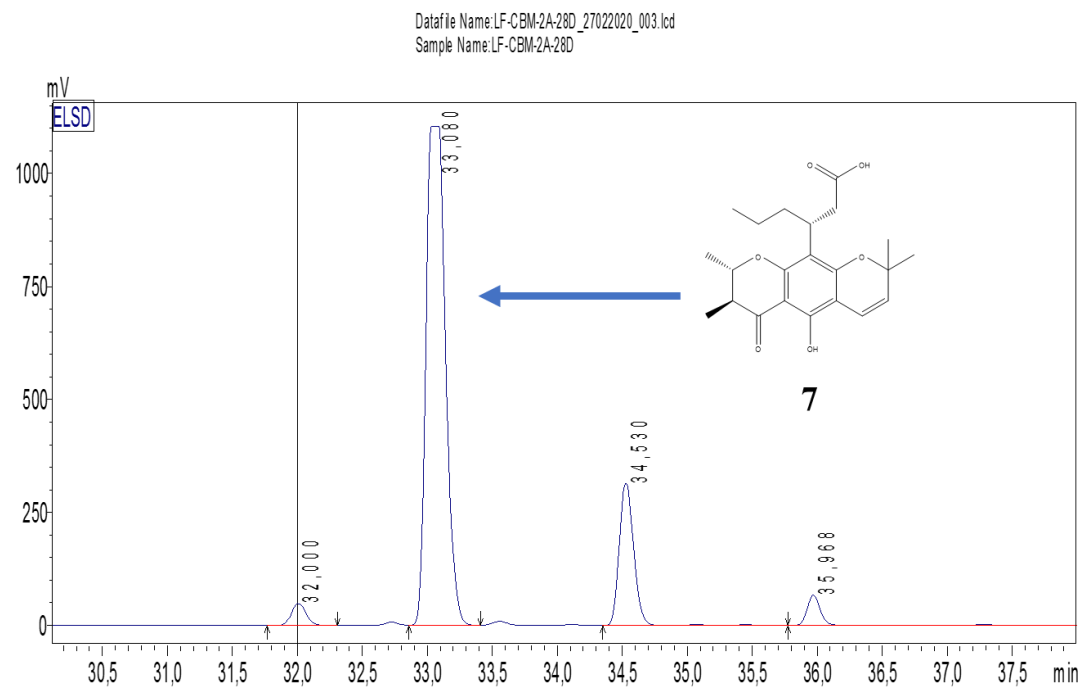


Figure S3. 17 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 1D

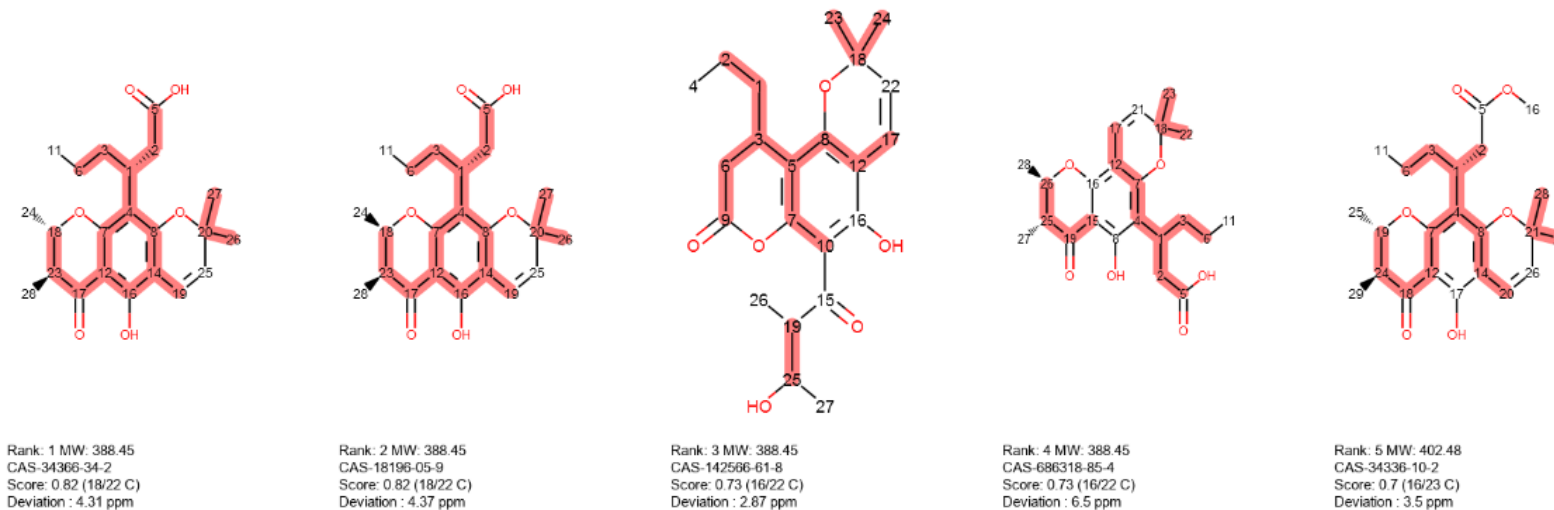


Figure S3.18 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **1G** using *Callophyllum* DB

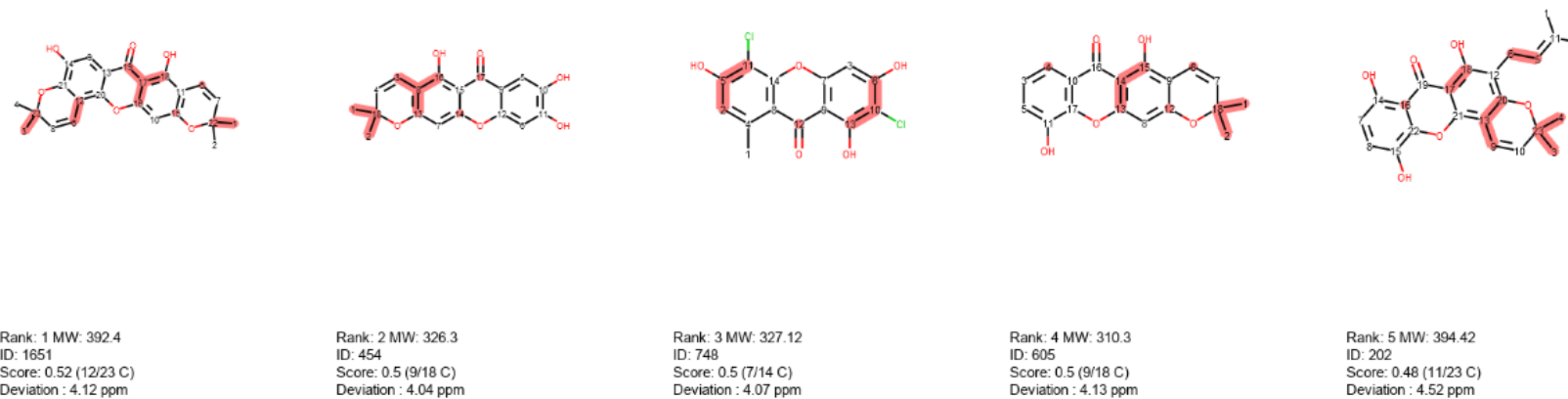


Figure S3.19 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **1G** using Xanthenes DB

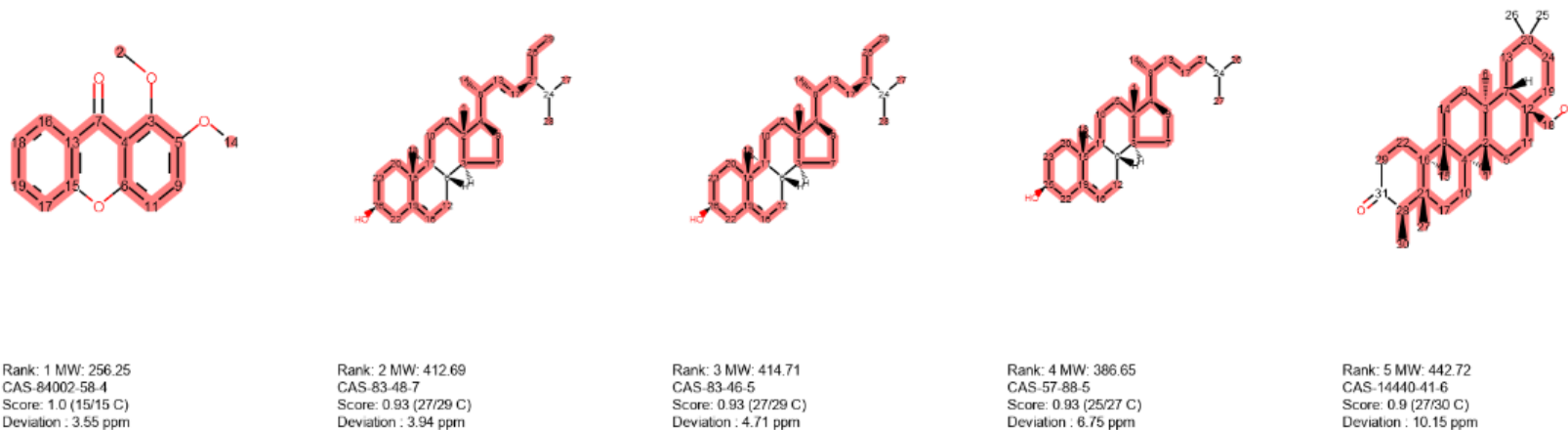


Figure S3.20 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2G** using *Calophyllum* DB

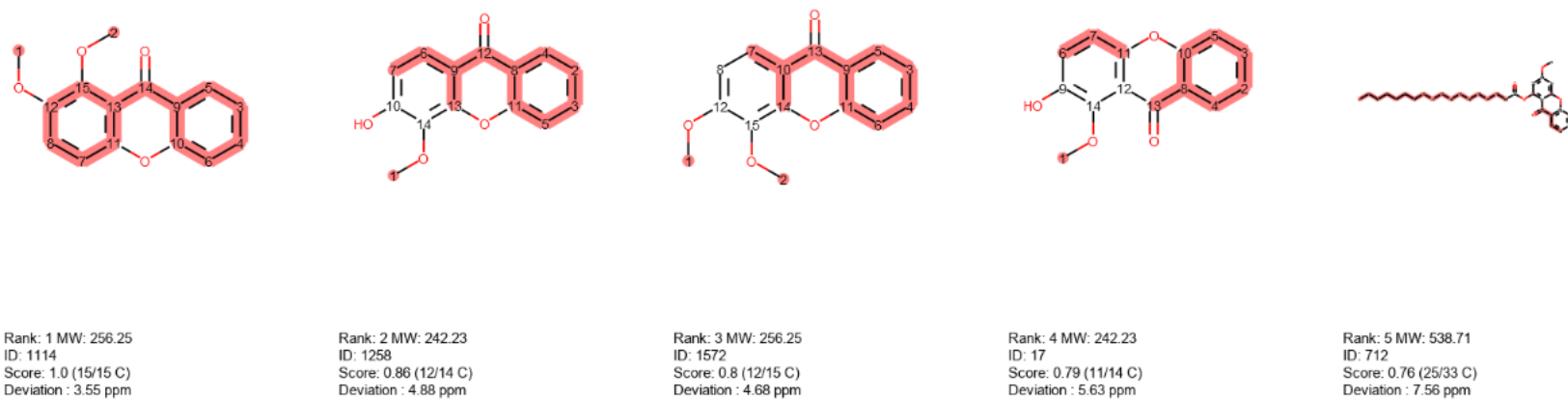


Figure S3.21 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2G** using Xanthonenes DB

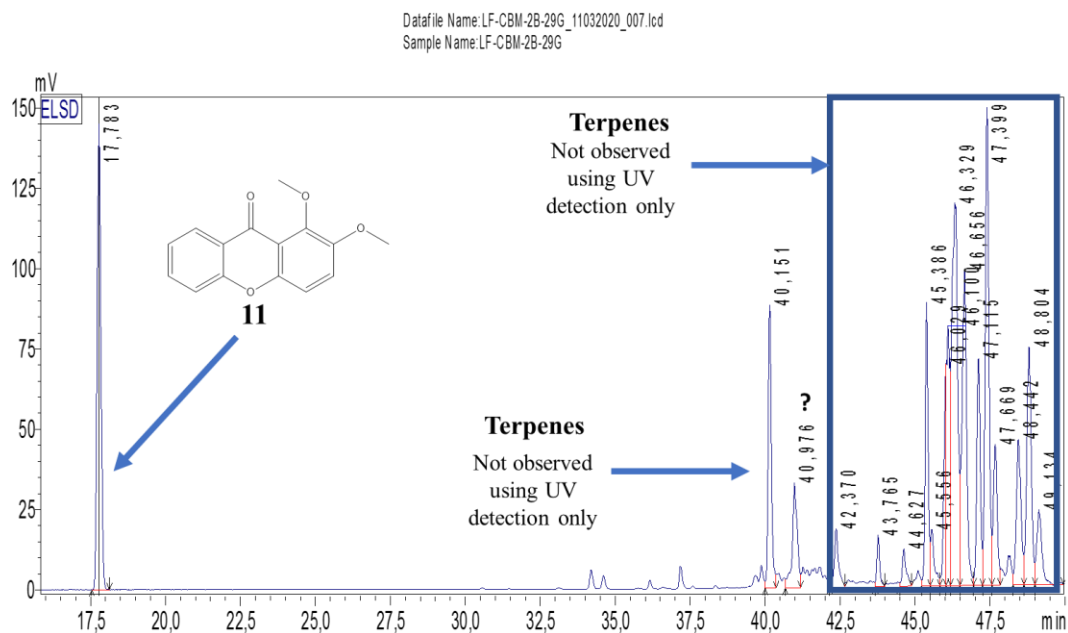


Figure S3.22 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 2G

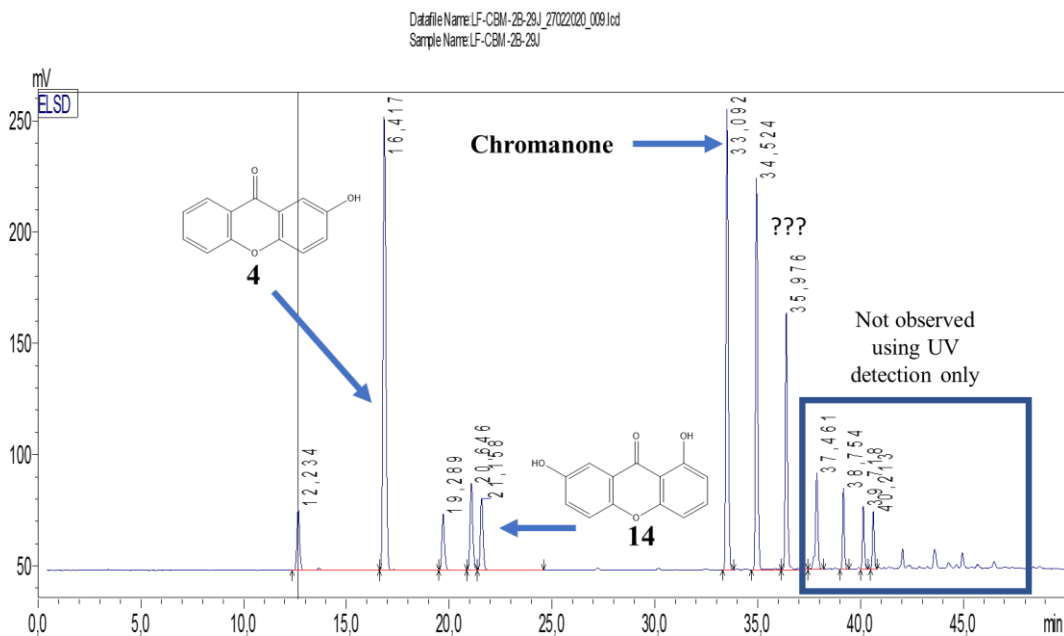


Figure S3.23 HPLC-ELSD chromatographic profile of fraction 2J

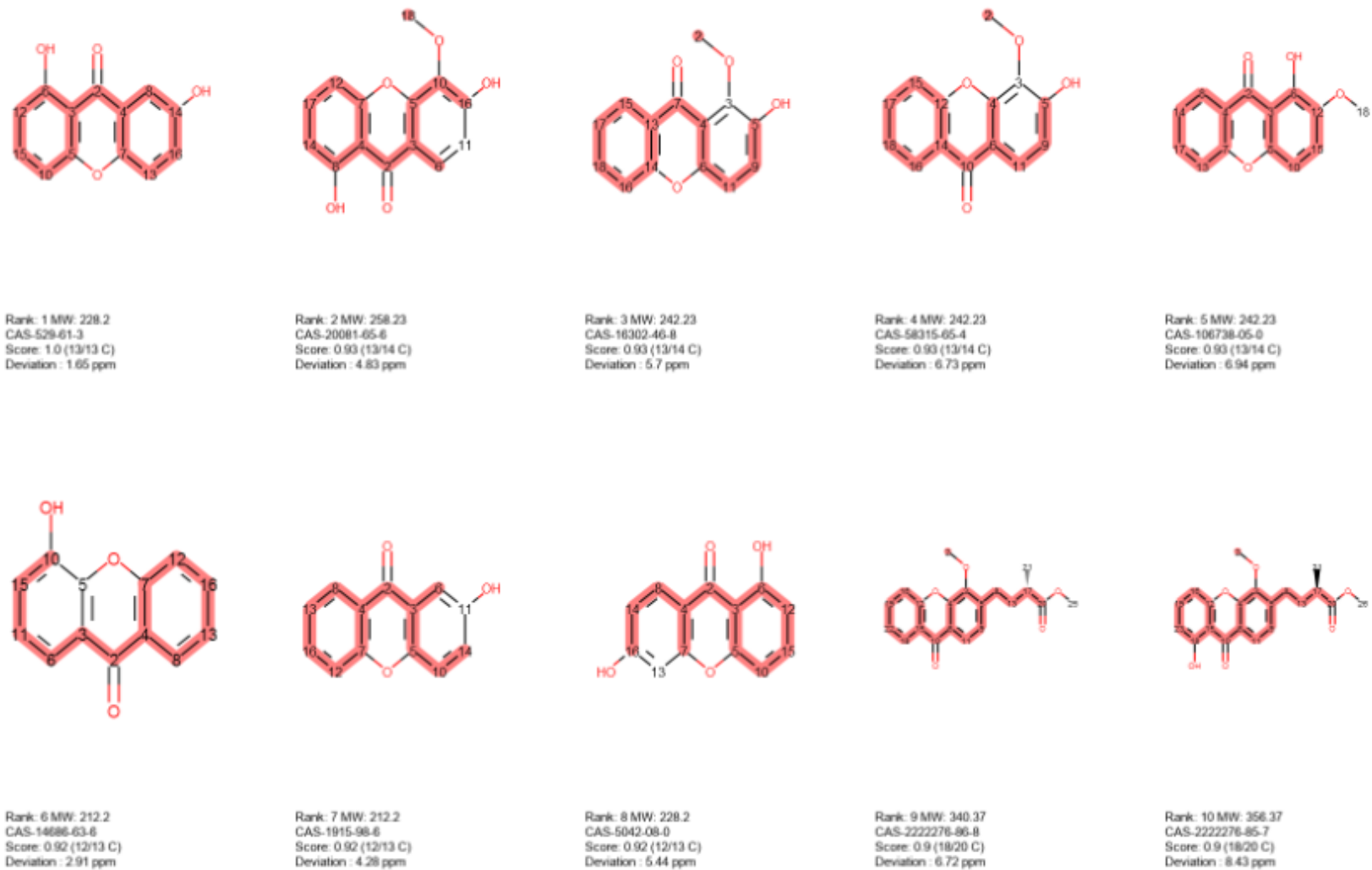


Figure S3. 24 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2J** using *Calophyllum* DB

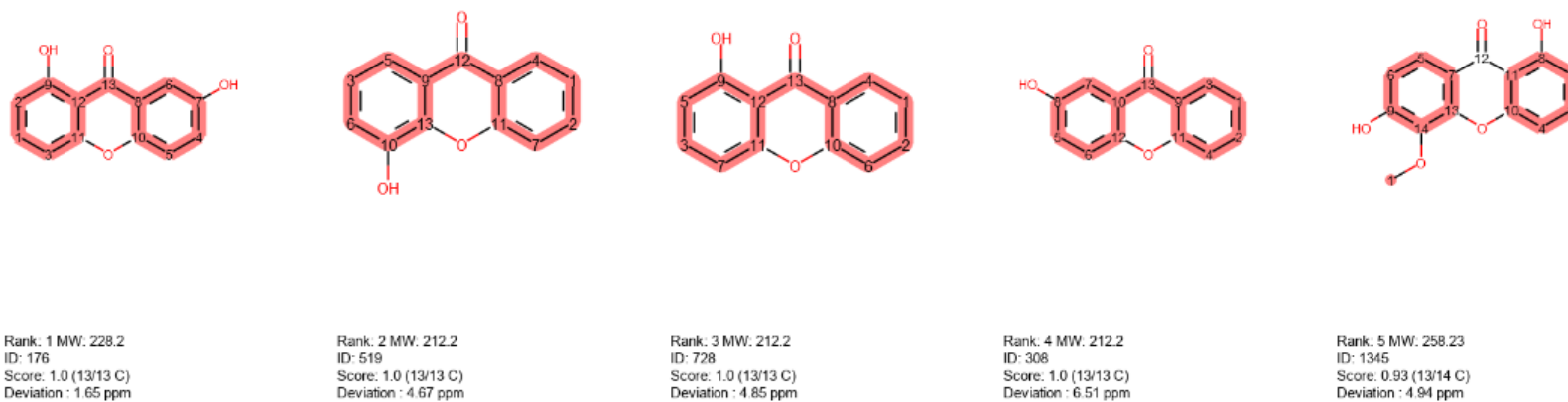


Figure S3. 25 Part of the displayed results for the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2J** using Xanthones DB

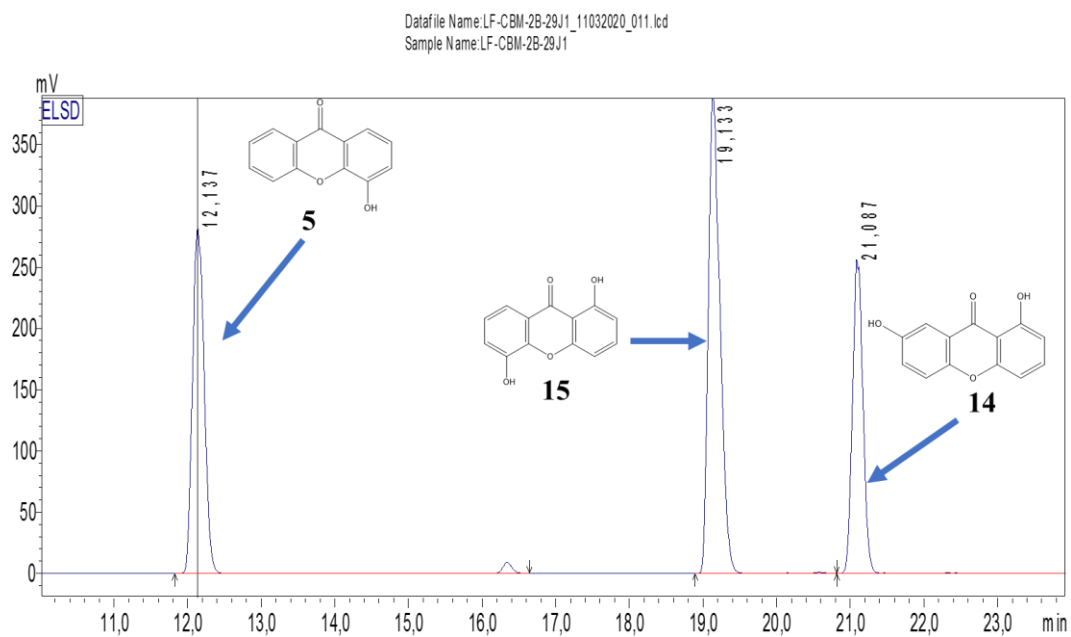


Figure S3. 26 HPLC-ELSD chromatographic profile of precipitate from fraction 2J

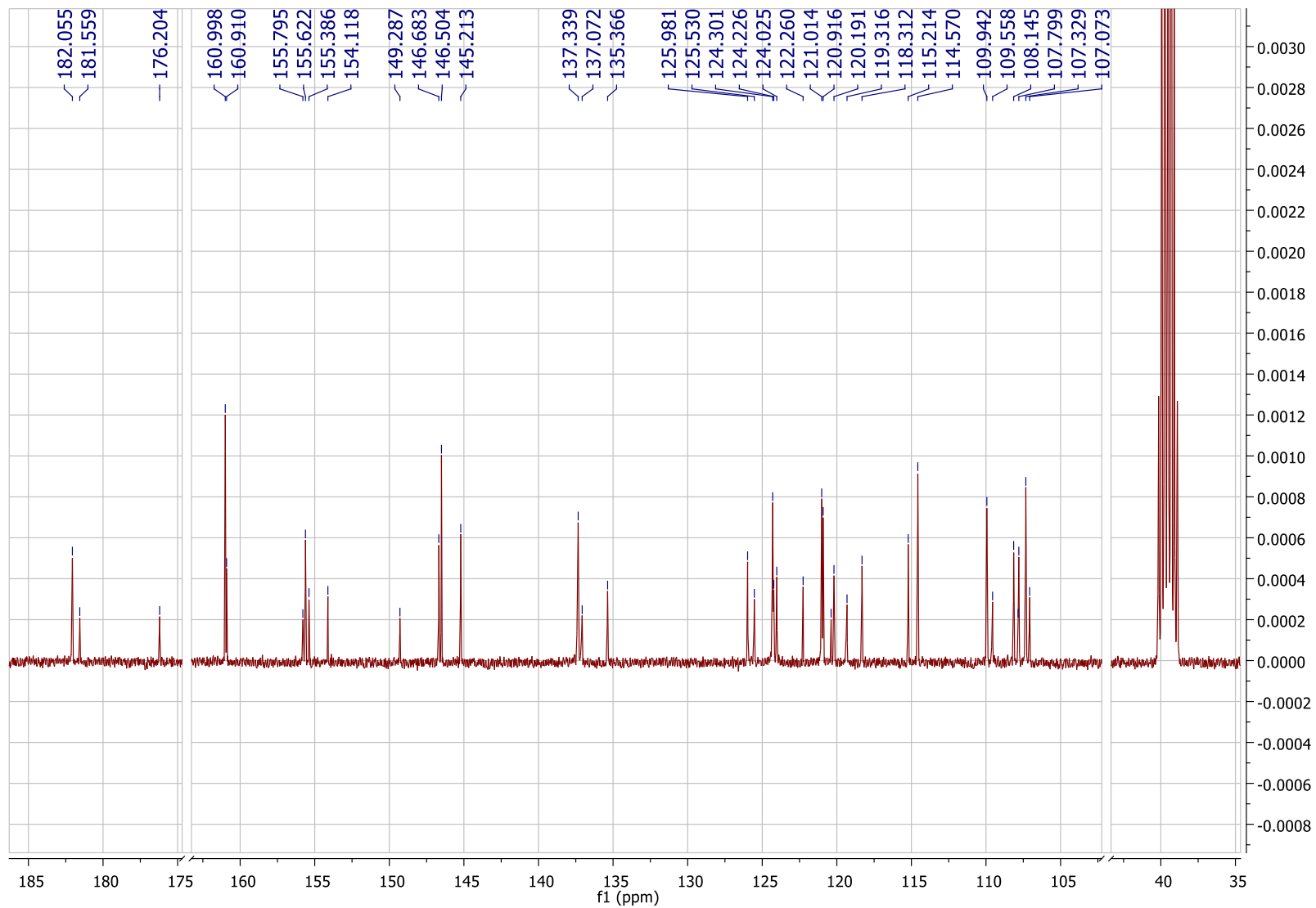
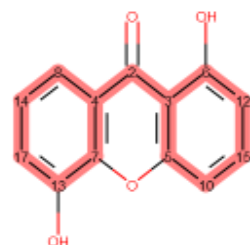
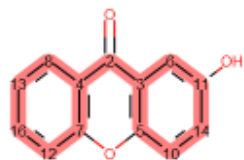


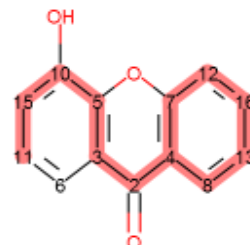
Figure S3. 27 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) spectrum of precipitate from fraction 2J



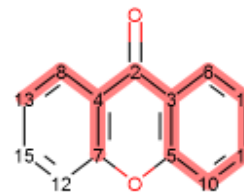
Rank: 1 MW: 228.2
CAS: 14686-65-8
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 4.11 ppm



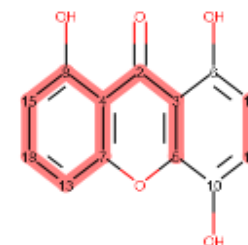
Rank: 2 MW: 212.2
CAS: 1915-98-6
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 7.11 ppm



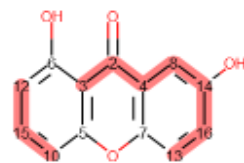
Rank: 3 MW: 212.2
CAS: 14686-63-6
Score: 0.92 (12/13 C)
Deviation : 4.2 ppm



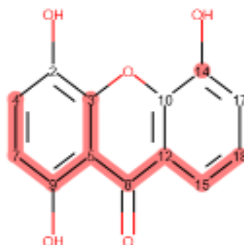
Rank: 4 MW: 196.2
CAS: 90-47-1
Score: 0.85 (11/13 C)
Deviation : 3.41 ppm



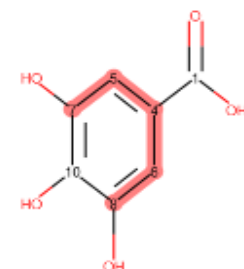
Rank: 5 MW: 244.2
CAS: 1216863-99-5
Score: 0.85 (11/13 C)
Deviation : 5.48 ppm



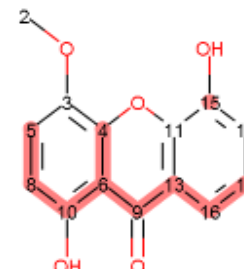
Rank: 6 MW: 228.2
CAS: 529-61-3
Score: 0.77 (10/13 C)
Deviation : 4.16 ppm



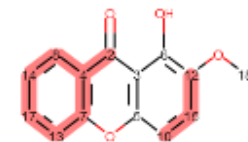
Rank: 7 MW: 244.2
CAS: 162473-22-5
Score: 0.77 (10/13 C)
Deviation : 4.27 ppm



Rank: 8 MW: 170.12
CAS: 149-91-7
Score: 0.71 (5/7 C)
Deviation : 2.27 ppm

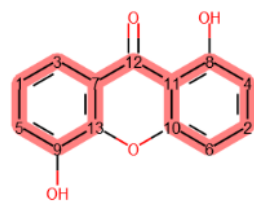


Rank: 9 MW: 258.23
CAS: 315240-08-5
Score: 0.71 (10/14 C)
Deviation : 3.4 ppm

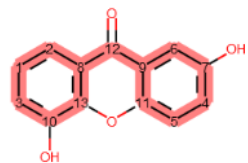


Rank: 10 MW: 242.23
CAS: 106738-05-0
Score: 0.71 (10/14 C)
Deviation : 3.67 ppm

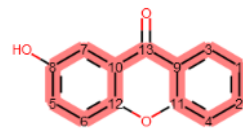
Figure S3. 28 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of the precipitate from fraction 2J using *Callophyllum* DB



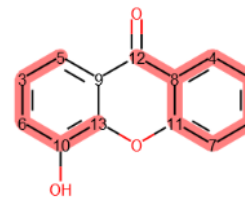
Rank: 1 MW: 228.2
ID: 1542
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 4.0 ppm



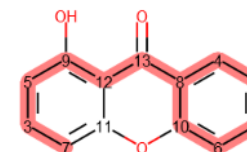
Rank: 2 MW: 228.2
ID: 1232
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 4.77 ppm



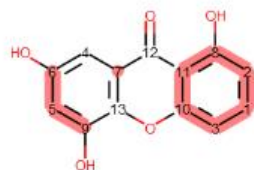
Rank: 3 MW: 212.2
ID: 308
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 6.12 ppm



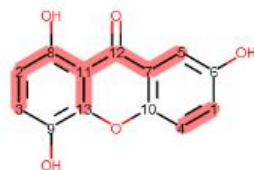
Rank: 4 MW: 212.2
ID: 519
Score: 0.92 (12/13 C)
Deviation : 3.85 ppm



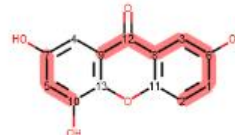
Rank: 5 MW: 212.2
ID: 728
Score: 0.92 (12/13 C)
Deviation : 4.14 ppm



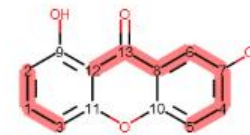
Rank: 26 MW: 244.2
ID: 468
Score: 0.77 (10/13 C)
Deviation : 2.96 ppm



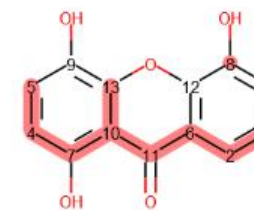
Rank: 27 MW: 244.2
ID: 1342
Score: 0.77 (10/13 C)
Deviation : 3.46 ppm



Rank: 28 MW: 244.2
ID: 979
Score: 0.77 (10/13 C)
Deviation : 3.67 ppm

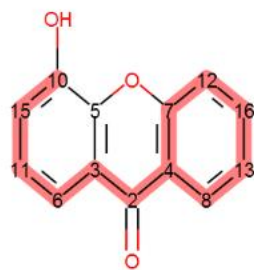


Rank: 29 MW: 228.2
ID: 176
Score: 0.77 (10/13 C)
Deviation : 4.16 ppm

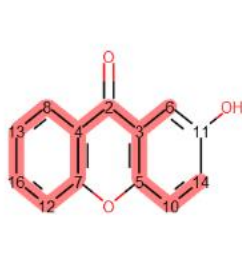


Rank: 30 MW: 244.2
ID: 123
Score: 0.77 (10/13 C)
Deviation : 4.94 ppm

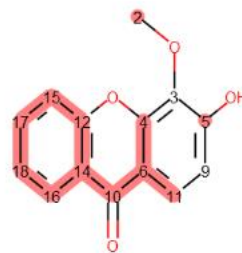
Figure S3. 29 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of the precipitate from the fraction **2J** using Xanthonés DB



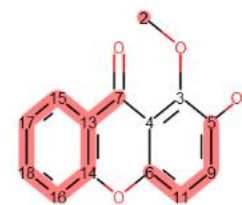
Rank: 1 MW: 212.2
CAS-14686-63-6
Score: 0.92 (12/13 C)
Deviation : 3.33 ppm



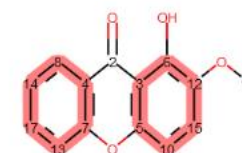
Rank: 2 MW: 212.2
CAS-1915-98-6
Score: 0.92 (12/13 C)
Deviation : 3.86 ppm



Rank: 3 MW: 242.23
CAS-58315-65-4
Score: 0.86 (12/14 C)
Deviation : 4.95 ppm

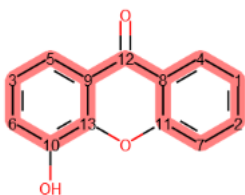


Rank: 4 MW: 242.23
CAS-16302-46-8
Score: 0.86 (12/14 C)
Deviation : 5.21 ppm

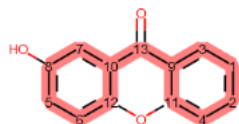


Rank: 5 MW: 242.23
CAS-106738-05-0
Score: 0.86 (12/14 C)
Deviation : 6.08 ppm

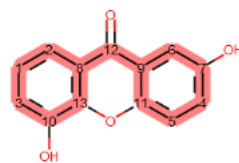
Figure S3. 30 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2K** using *Calophyllum* DB



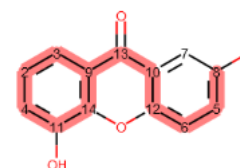
Rank: 1 MW: 212.2
ID: 519
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 4.53 ppm



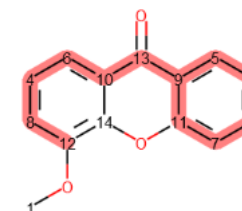
Rank: 2 MW: 212.2
ID: 308
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 5.65 ppm



Rank: 3 MW: 228.2
ID: 1232
Score: 1.0 (13/13 C)
Deviation : 6.2 ppm



Rank: 4 MW: 242.23
ID: 1501
Score: 0.86 (12/14 C)
Deviation : 4.11 ppm



Rank: 5 MW: 226.23
ID: 121
Score: 0.86 (12/14 C)
Deviation : 4.2 ppm

Figure S3. 31 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2K** using Xanthonces DB

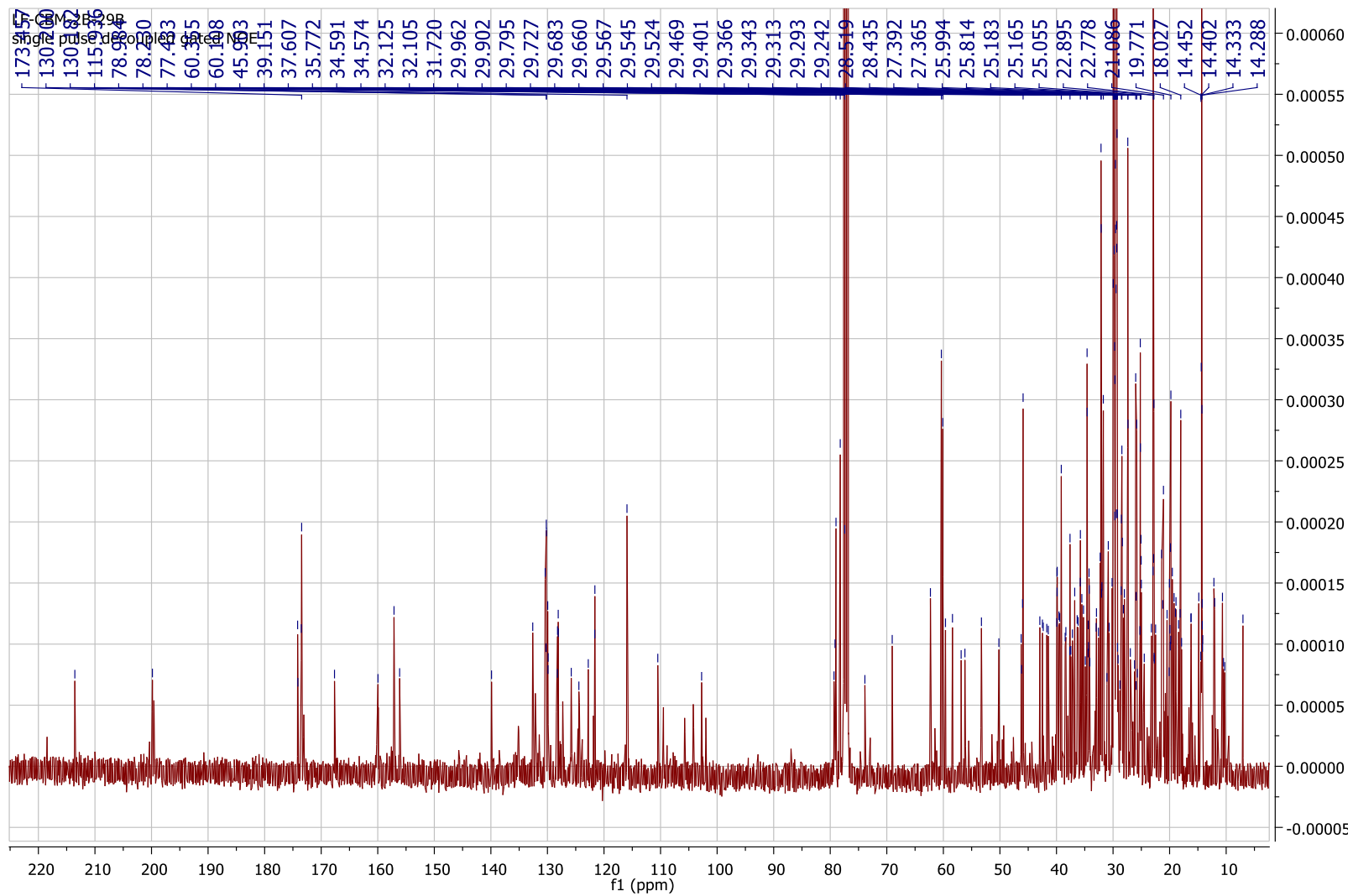


Figure S3. 32. ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of fraction 2B

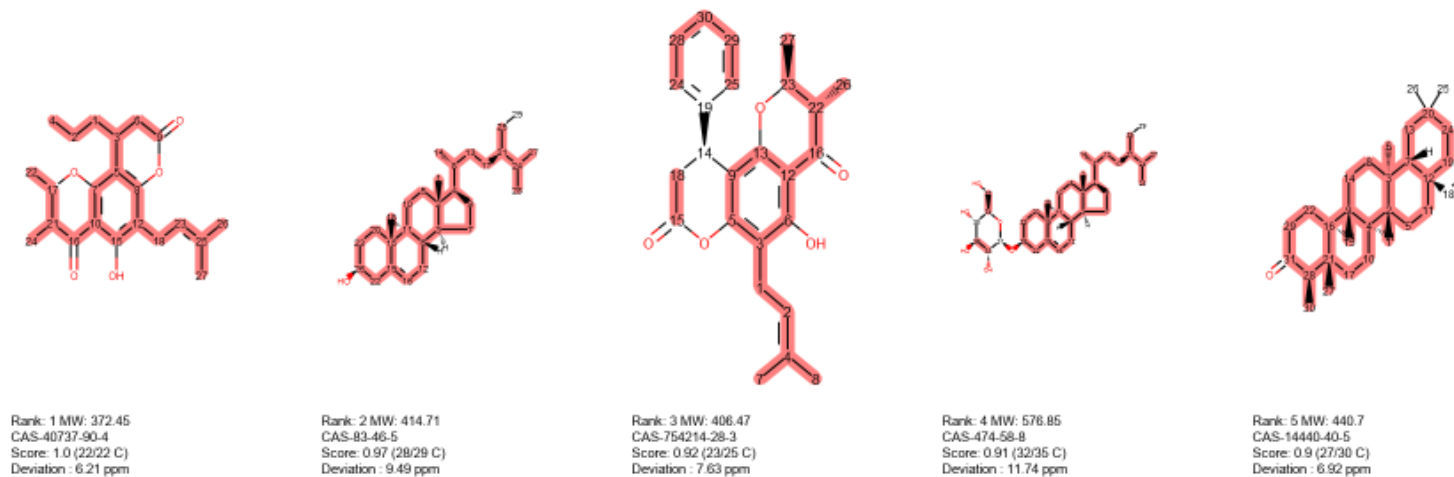


Figure S3.33 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2B** using *Calophyllum* DB

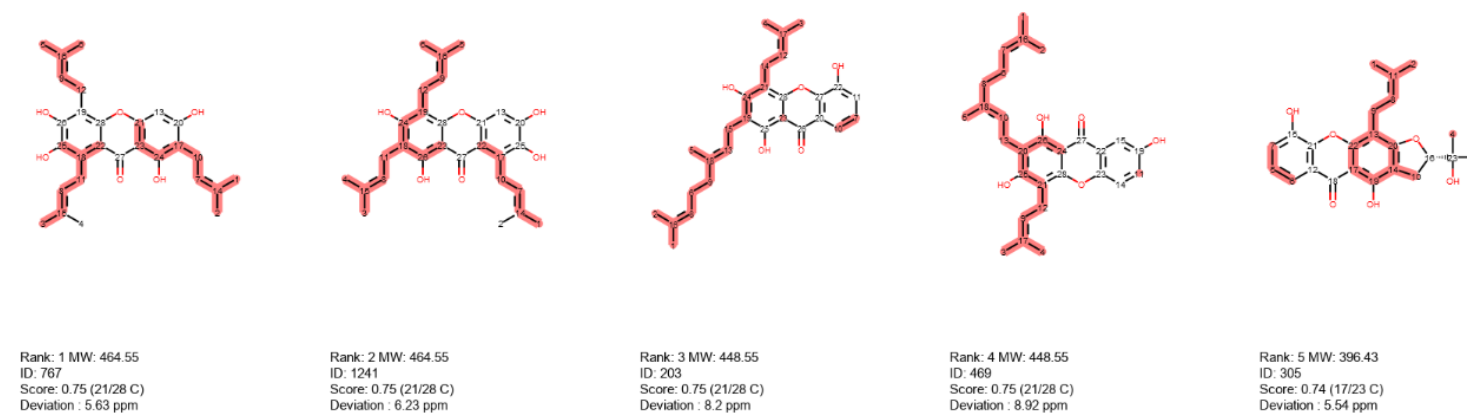


Figure S3.34 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2B** using Xanthones DB

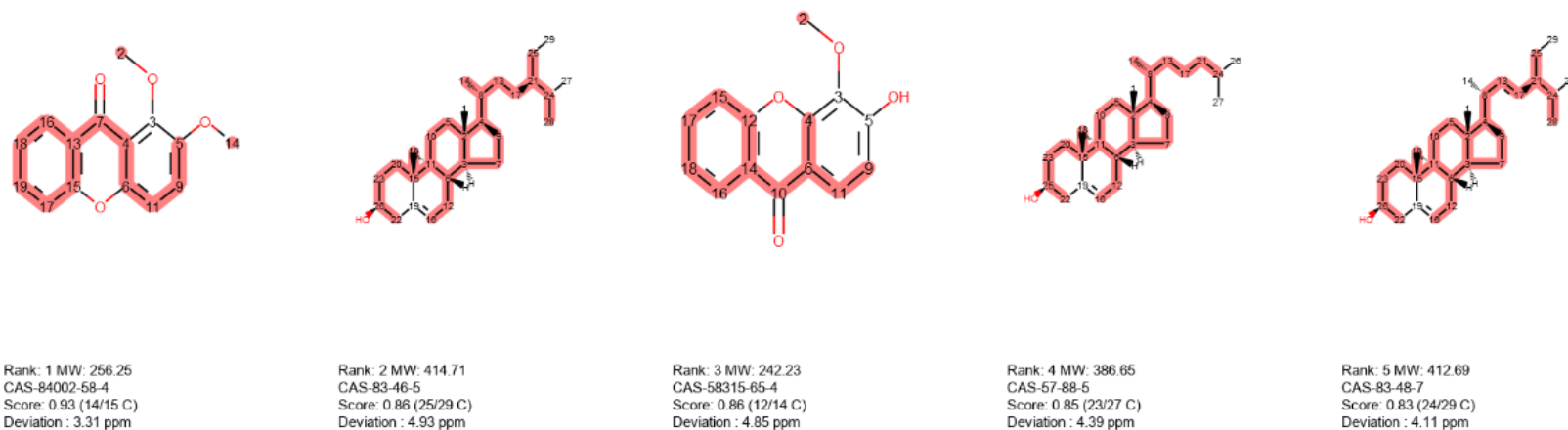


Figure S3. 35 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2F** using *Calophyllum* DB

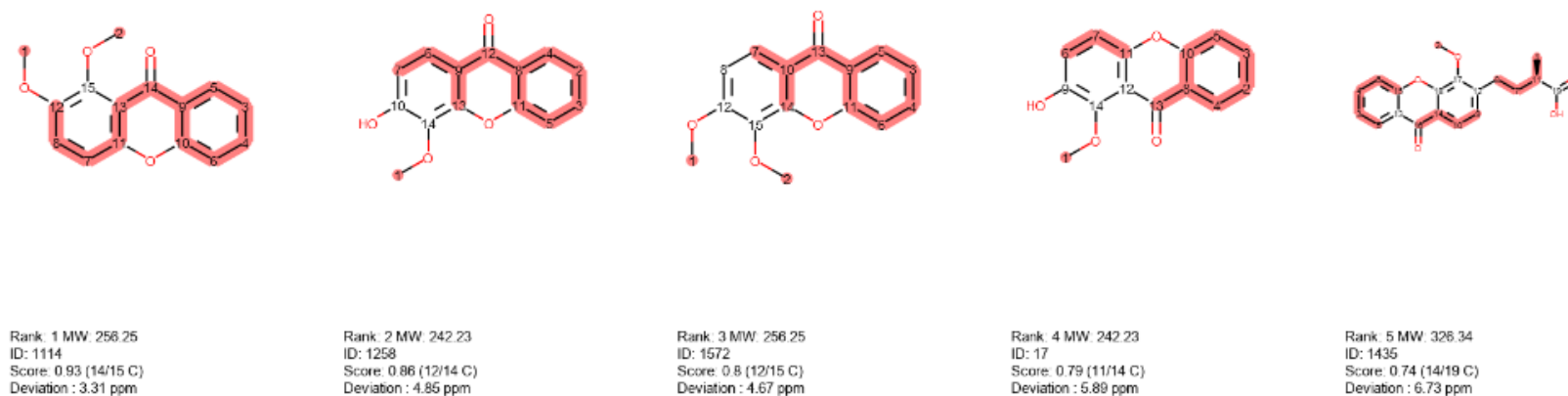


Figure S3. 36 Part of the displayed results from the ^{13}C -NMR dereplication analysis (+ DEPT- 90 and 135) of fraction **2F** using Xanthonces DB

