



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**METABOLITOS BIOACTIVOS DE *Clusia* spp.**

Tesis que presenta

LUIS ALFREDO HERBERT DOCTOR

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2021



## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis del **M. en B. Luis Alfredo Herbert Doctor** titulado “**Metabolitos Bioactivos de *Clusia* spp.**”, fue realizado en la **Unidad de Biotecnología**, en la línea de Química 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 y en el laboratorio ***Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux*** de la **Universidad de Angers, Francia**, bajo la codirección del **Prof. Dr. Pascal Richomme Peniguel**.

Atentamente.

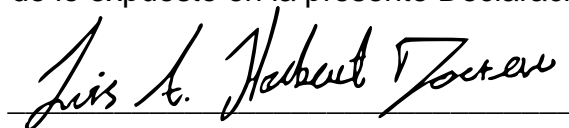
---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 24 de agosto de 2021

## 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 regirán 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.

A handwritten signature in black ink, reading "Luis A. Herbert Doctor", is written over a horizontal line.

M. en B. Luis Alfredo Herbert Doctor

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., y en el laboratorio *Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux* de la Universidad de Angers, Francia, y forma parte del proyecto titulado "Valoración de los recursos vegetales, naturales y renovables de la península de Yucatán" (SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS-NORD, Mexico-France collaborative Project No. 276520) en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y codirección del Prof. Dr. Pascal Richomme Peniguel.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, en cualquiera de sus expresiones y/o manifestaciones.

A mi mamá, la Sra. Graciela Doctor Parada. Sin ella nunca hubiera podido alcanzar esta meta. Gracias por todo.

A mi papá el Sr. Isaac Herbert Herrera, q.e.p.d.

A mi familia. Mi hermana la Srta. Lucila Herbert Doctor. Mis tías, la Sra. Martha Doctor Parada y la Sra. Thania Vernet Parada.

A mi prometida, la M.C. Evelyn Arlette Carrillo Bermejo, por su apoyo incondicional.

A mi otra familia. La Profa. Nora Adela Bermejo Baeza y el Prof. Ángel Javier Carrillo Palma.

A mi viejo amigo, el M.C. Pablo José Palma Cancino, por ofrecerme motivación para no darme por vencido, en la búsqueda de un programa de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 288061 otorgada para la realización de este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), por el apoyo para la realización de este trabajo y por el apoyo económico para asistir a la Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, del 23 al 26 de mayo de 2018 en Cuernavaca, Morelos, México.

A mi director de tesis el Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por permitir mi integración a su grupo de investigación, por las enseñanzas recibidas, su crítica constructiva y por el apoyo técnico y científico en la realización de este trabajo.

A mi co-director de tesis, el Prof. Pascal Richomme-Peniguel, por su apoyo técnico y científico para la realización de este trabajo.

A la técnica académica, Q.B.B. Karlina García Sosa, por su apoyo técnico y científico.

Al Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y el Dr. Gumersindo Mirón López, por sus comentarios técnicos, como parte de mi comité tutorial de avances de tesis.

A los miembros de la Unidad de Materiales del CICY, el Dr. José Manuel Cervantes Uc y la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, por permitir el uso de su equipo de laboratorio, para la realización de este trabajo.

A la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, por las enseñanzas recibidas y por el apoyo técnico y científico de los ensayos moleculares realizados como parte de este trabajo.

Al técnico M.C. Bartolomé H. Chi Manzanero, por el apoyo técnico y científico de los ensayos moleculares realizados como parte de este trabajo.

A la Bióloga Silvia Hernández Aguilar, encargada del Herbario del CICY, por su asistencia en la preparación de los ejemplares del material vegetal colectado como parte de este trabajo.

A los técnicos de la Unidad de Recursos Naturales del CICY, Gabriel Rolando Dzib y José Luis Simá Gómez, por su asistencia en la colecta e identificación del material vegetal necesario para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gloria Ivonne Hernández Bolio, el M.C. Radamés Álvarez Zapata y la Dra. Naybi Muñoz Cazares, por el apoyo técnico para la realización de este trabajo y sus productos generados.

Al Prof. Barry E. Hammel del *Missouri Botanical Garden*, por su apoyo en la identificación del material vegetal colectado para la realización de este trabajo.

Al laboratorio SONAS de la Universidad de Angers en Francia, por permitir la realización de la estancia de investigación durante noviembre-diciembre de 2019.

A la Dra. Séverine Derbré, Dr. Antoine Bruguière y al Técnico Breard Dimitri del laboratorio SONAS, por su asistencia técnica y científica.

A mis compañeros e integrantes del Laboratorio de Química Orgánica del CICY, por su apoyo y consejos.

## **DEDICATORIAS**

A todas y todos quienes de una u otra forma me ayudaron, enseñaron, motivaron y me acompañaron y/o me siguen acompañando; mientras luchaba por conseguir esta meta.

*No ha sido fácil, pero en el camino hacia mi formación académica, aprendí algo invaluable.*

*¡Aprendí a vivir!*

- Luis A. Herbert Doctor -





INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I .....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. Familia Clusiaceae .....	3
1.2. Metabolitos Secundarios y Actividad Biológica de Géneros y Especies de la Familia Clusiaceae .....	3
1.3. El Género <i>Clusia</i> L. ....	6
1.4. Metabolitos Secundarios Reportados en <i>Clusia</i> spp.....	7
1.5. <i>Clusia flava</i> Jacq. ....	13
1.6. <i>Clusia rosea</i> Jacq.....	13
1.7. <i>Clusia lundellii</i> Standl.....	14
1.8. <i>Clusia suborbicularis</i> Lundell.....	14
JUSTIFICACIÓN .....	17
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	18
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL .....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	20
 CAPÍTULO II .....	 21
2.1. INTRODUCTION .....	22
2.2. MATERIALS AND METHODS .....	23
2.2.1. Collected Plant Material.....	23
2.2.2. Plant Material for Chemometric Analyses .....	24
2.2.3. HPLC Profiles of <i>Clusia</i> spp. Crude Extracts.....	24
2.2.4. Multivariate Data Analyses.....	24
2.2.5. DNA Extraction, Amplification and Sequencing.....	25
2.2.6. Phylogenetic Analysis.....	26
2.2.7. Simulation of an Ecological Niche of <i>Clusia suborbicularis</i> .....	26
2.3. RESULTS .....	27
2.3.1. Collection of <i>Clusia</i> spp.....	27
2.3.2. Morphological Evaluation of <i>Clusia</i> spp.....	28
2.3.3. Chemometric Analysis of Chromatographic Profiles of <i>Clusia</i> spp. ....	29
2.3.4. Phylogenetic Reconstruction of <i>Clusia</i> spp. ....	31
2.3.5. Prediction of Distribution of <i>C. suborbicularis</i> .....	33
2.4. DISCUSSION.....	33
2.5. CONCLUSIONS.....	36
 CAPÍTULO III .....	 38
3.1. INTRODUCTION.....	36
3.2. EXPERIMENTAL SECTION .....	41
3.2.1. General Experimental Procedures.....	41
3.2.2. Database of Natural Products for Dereplication .....	41
3.2.3. <sup>13</sup> C-NMR Dereplication Assisted Isolation.....	42
3.2.4. Plant Material .....	43
3.2.5. Extraction and Isolation.....	43
3.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	44

CAPÍTULO IV .....	53
4.1. INTRODUCCIÓN.....	53
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
4.2.1. Evaluación de la Actividad Antioxidante por Reducción del Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).....	56
4.2.2. Determinación de la Actividad Anti-AGEs.....	58
4.2.3. Actividad Biológica de Extractos, Fracciones y Metabolitos Secundarios Obtenidos de la Corteza de <i>C. flava</i> .....	59
4.3. RESULTADOS.....	56
4.3.1. Actividad Biológica de Extractos, Fracciones y Metabolitos Secundarios Obtenidos de la Corteza de <i>C. flava</i> .....	56
 CAPÍTULO V .....	 64
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	64
5.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	62
6.2. CONCLUSIÓN GENERAL.....	67
6.3. PERSPECTIVAS .....	68
 BIBLIOGRAFÍA.....	 70
ANEXOS.....	90
6.1. ANEXO 1.....	90
6.1.1. Bibliografía Anexo 1 .....	94
6.2. ANEXO 2.....	95
6.2.1. Purification Details of Lupeol and Betulinic Acid .....	104
6.2.2. Bibliografía Anexo 2 .....	105
6.3. ANEXO 3.....	106

Figura 1.1 Distribución mundial del género <i>Clusia</i> L.....	6
Figura 1.2 Esquema de la estrategia experimental. ....	20
Figura 2.1 Collection sites of <i>Clusia</i> spp.....	28
Figura 2.2 Chemometric analysis of chromatographic profiles of <i>Clusia</i> spp.....	30
Figura 2.3 Clustering analysis of <i>Clusia</i> spp. HCA. ....	31
Figura 2.4 Phylogenetic reconstruction of <i>Clusia</i> spp.....	32
Figura 2.5 Predicted distribution of <i>C. suborbicularis</i> .....	33
Figura 3.1 <sup>13</sup> C-NMR dereplication results.....	46
Figura 3.2 Results for the <sup>13</sup> C-NMR dereplication analysis of fraction B5 .....	47
Figura 3.3 Results for the <sup>13</sup> C-NMR dereplication analysis of fraction B11. ....	50
Figura 3.4 Chemical structures of trapezifolixanthone and paralycolin A. ....	50
Figura 3.5 Key HMBC, NOESY and HSQC correlations observed for paralycolin A (1)....	50
Figura 4.1 Mecanismo inicial en la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs).....	54
Figura 4.2 Trastornos relacionados con la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs).....	55
Figura 4.3 Generación de ERO y su implicación en diferentes enfermedades.. ....	56
Figura 6.1 S3. Herbarium specimen of <i>C. flava</i> .....	92
Figura 6.2 S4. Herbarium specimen of <i>C. suborbicularis</i> .....	93
Figura 6.3 S4. <sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spectrum of trapezifolixanthone (TPX). ....	97
Figura 6.4 S5. <sup>13</sup> C-NMR (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spectrum of trapezifolixanthone (TPX).....	97
Figura 6.5 S6. HMBC experiment of trapezifolixanthone (TPX).....	98
Figura 6.6 S7. <sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spectrum of paralycolin A (1). ....	99
Figura 6.7 S8. <sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spectrum of paralycolin A (1). ....	99
Figura 6.8 S9. Gradient-enhanced-HMBC experiment of paralycolin A (1).....	100
Figura 6.9 S10. NOESY experiment of paralycolin A (1). ....	100
Figura 6.10 S11. HSQC experiment of paralycolin A (1). ....	101
Figura 6.11 S12. <sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO) spectrum of betulinic acid.....	102
Figura 6.12 S13. <sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, DMSO) spectrum of betulinic acid. ....	102
Figura 6.13 S14. GC-MS chromatographic profile of lupeol.....	103
Figura 6.14 S15. Fragmentation pattern of lupeol. ....	103
Figura 6.15 Extracción de ADN de <i>C. flava</i> y <i>C. suborbicularis</i> .....	106
Figura 6.16 Perfil cromatográfico mediante HPLC-PDA y HPLC-ELSD.....	106

**Índice de tablas****Página**

Tabla 1.1 Número de especies pertenecientes a los géneros de la familia Clusiaceae, reportados en el mundo, en México y en Yucatán.....	6
Tabla 3.1 <sup>13</sup> C-NMR data comparing experimental results of fraction B5.....	48
Tabla 3.2 Experimental and reported <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C-NMR data for paralycolin A (1).....	51
Tabla 4.1 Concentración efectiva media correspondiente a la actividad antioxidante de los extractos de hoja y corteza de <i>C. flava</i> .....	59
Tabla 4.2 Actividad anti-AGEs y antioxidante correspondiente a las fracciones obtenidas a partir de la fracción de mediana polaridad (B).....	61
Tabla 4.3 Actividad anti-AGEs y antioxidante de los metabolitos secundarios aislados de la corteza de <i>C. flava</i> .....	62
Tabla 6.1 S1. Principal differences in the morphological characters of <i>C. flava</i> and <i>C. suborbicularis</i> .....	90
Tabla 6.2 S2. Data of collected plant material.....	91
Tabla 6.3 S1. Experimental and reported <sup>13</sup> C-NMR chemical shift ( $\delta_c$ ) values of NPs predicted in dereplication analyses results of fractions B1, B3, B6, B9, B16.....	95
Tabla 6.4 S2. First 20 predicted NPs from the <sup>13</sup> C-NMR dereplication analysis results (C/DB) of fraction B5.....	96
Tabla 6.5 S3. First 20 predicted NPs from the <sup>13</sup> C-NMR dereplication analysis results (C/DB) of fraction B11.....	96

## RESUMEN

Los metabolitos secundarios (MS), producidos por diferentes organismos como mediadores en sus procesos ecológico-evolutivos, a menudo presentan diferentes tipos de actividad biológica. Este conocimiento se ha utilizado en la búsqueda de productos naturales con aplicación en áreas como la medicina, la agricultura y la alimentación. Entre los diferentes tipos de actividades biológicas que actualmente son de interés por su potencial para desarrollar nuevos fármacos, se encuentra la actividad antioxidante y anti-AGEs (capacidad de inhibir productos finales de glicación avanzada), debido a las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo o los procesos de glicación avanzada como inflamación, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos. El reino Plantae representa una fuente importante de metabolitos con diferentes tipos de actividades biológicas. La familia Clusiaceae es reconocida por su producción de metabolitos secundarios tales como terpenos, xantonas, flavonoides y benzofenonas, muchos de los cuales se ha reportado que tienen actividad antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante y anti-AGEs. En la península de Yucatán, hay cuatro especies reportadas del género *Clusia*: *Clusia flava* Jacq., *Clusia rosea* Jacq., *Clusia lundellii* Standl y *Clusia suborbicularis* Lundell. Debido a que el conocimiento fitoquímico de estas especies es limitado, y a las dificultades de clasificación para la identificación morfológica del material biológico, los objetivos principales de este trabajo se basan en investigar la relación quimiotaxonómica y llevar a cabo el aislamiento e identificación de metabolitos con actividad antioxidante y anti-AGEs de las especies de *Clusia* que crecen en la península de Yucatán, México.

**ABSTRACT**

Secondary metabolites (MS), produced by different organisms as mediators in their ecological-evolutionary processes, often present different types of biological activity. This knowledge has been used in the search for natural products with application in areas such as medicine, agriculture and food. Among the different types of biological activities that are currently of interest for their potential to develop new drugs are antioxidant and antiAGEs (advanced glycation end product) activities, due to the number of diseases related to oxidative stress or to advanced glycation processes which include inflammation, as well as cardiovascular and neurodegenerative disorders. The Plantae kingdom represents an important source of metabolites with different types of biological activities. The family Clusiaceae is recognized for its production of secondary metabolites such as terpenes, xanthenes, flavonoids and benzophenones, many of which have been reported to have anti-inflammatory, anticancer, antioxidant and antiAGEs activity. In the Yucatán peninsula there are four species reported of the *Clusia* L. genus: *Clusia flava* Jacq., *Clusia rosea* Jacq., *Clusia lundellii* Standl., and *Clusia suborbicularis* Lundell, since their phytochemical and pharmacological knowledge is limited and the difficulties in identifying biological material, due to synonymy reported in the literature, the main objectives of this investigation were to both investigate the chemotaxonomic relationship between the three species and to carry out the isolation and identification of metabolites with antioxidant and anti-AGEs activity produced by *Clusia* species growing in the Yucatan Peninsula, Mexico.

## INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos necesitan energía para su sobrevivencia. Los organismos tanto autótrofos como heterótrofos obtienen dicha energía mediante la captación y transformación de moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentran presentes en el medio ambiente. Para esta transformación los organismos utilizan diversas reacciones químicas que son catalizadas por enzimas, dentro de diferentes vías que forman parte del llamado metabolismo primario (Nelson y Cox, 2005). El metabolismo primario es el encargado de transformar y sintetizar diferentes macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, conocidas como metabolitos primarios, que son esenciales para el desarrollo de todos los seres vivos (Dewick, 2009). A través del metabolismo primario se forman diferentes intermediarios a lo largo de vías metabólicas como la glucólisis y el ciclo de Krebs; algunos de estos intermediarios pueden participar como precursores en la biosíntesis de otro tipo de moléculas, conocidas como metabolitos secundarios (MS), los cuales se encuentran presentes en todos los organismos.

La función de los metabolitos secundarios está relacionada con procesos ecológico-evolutivos y su función depende tanto del medio ambiente como del organismo que los está produciendo. En el caso específico de las plantas, los MS pueden participar como mecanismos de defensa contra plagas y enfermedades y/o como mecanismos de competencia con otras especies vegetales. Su participación también está relacionada con la protección ante factores abióticos, en la acumulación de productos de reserva y en mecanismos de señalización (Brusotti *et al.*, 2014; Wink, 2010b; Dewick, 2009).

Por otro lado, se reconoce que los MS de plantas y otros organismos, además de jugar un papel ecológico, poseen diferentes tipos de actividad biológica, es decir, un efecto benéfico o adverso sobre un blanco en particular. Este conocimiento ha sido aprovechado a lo largo de la historia en el uso de plantas con fines estimulantes, repelentes, bélicos y medicinales así como para la búsqueda de metabolitos secundarios con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos para combatir diferentes problemas de salud, como distintos tipos de cáncer, enfermedades producidas por microorganismos, enfermedades cardiovasculares, reducir las complicaciones relacionadas con el estrés oxidativo o para contrarrestar reacciones propias del metabolismo como la producción de productos finales de glicación avanzada (AGEs), por mencionar algunas (Newman y Cragg, 2016; Baker *et al.*, 2007; Phillipson, 2007; Cortez-Gallardo *et al.*, 2004).

La búsqueda y obtención de MS potencialmente bioactivos se suele realizar siguiendo diferentes enfoques, como el etnobotánico, el etnomédico, la elección al azar, el quimiotaxonómico, etc. (Heinrich *et al.*, 2012). En referencia al enfoque quimiotaxonómico, este se basa en el hecho de que ciertos grupos de MS pueden estar restringidos a grupos de organismos, incluso a nivel de especie, ya sea dentro de una población o poblaciones aisladas; debido a un proceso evolutivo y/o a las distintas interacciones ecológicas que pueden ocurrir en un lugar y momento determinado (Medina *et al.*, 2006; Porto *et al.*, 2000).

La búsqueda de nuevos MS a menudo se enfoca a grupos taxonómicos que producen moléculas estructuralmente similares que pudieran tener una actividad biológica importante. Una familia de plantas a partir de la cual se ha realizado la búsqueda de MS siguiendo un enfoque etnobotánico y quimiotaxonómico es la familia Clusiaceae; esta representa un grupo taxonómico importante dado que de algunos de sus géneros y especies se han reportado grupos de metabolitos secundarios de tipo polifenólicos, los cuales presentan una actividad biológica importante (Ferreira *et al.*, 2014; Xiao-Hui *et al.*, 2008). Uno de los géneros más importantes de Clusiaceae es *Clusia* L., un género poco estudiado, cuyas especies presentes en la península de Yucatán, fueron estudiadas en este trabajo.

Este documento está organizado de la siguiente manera: En el capítulo 1 se muestran los antecedentes de este trabajo. En el capítulo 2 se describe el uso de quimiometría (Alvarez-Zapata *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2006) y de biología molecular para determinar la relación quimiotaxonómica de las *Clusia* spp. presentes en la península de Yucatán. Los resultados de este capítulo forman parte del artículo "*Clusia suborbicularis is not a synonym of Clusia flava. Molecular and metabolomic evidence*". Por otra parte, en el capítulo 3 se reporta la purificación y aislamiento de metabolitos secundarios, siguiendo una estrategia basada en el aislamiento asistido por desreplicación de  $^{13}\text{C}$ -RMN, y el uso de técnicas cromatográficas (Brusotti *et al.*, 2014; Schwikkard y Mulholland, 2014). Los resultados de este capítulo forman parte del artículo " *$^{13}\text{C}$ -NMR dereplication assisted isolation of natural products: A two case study in *Clusia flava* Jacq*". En el capítulo 4 se presenta la actividad antioxidante y anti-AGEs de los metabolitos secundarios aislados durante la realización de este trabajo. Finalmente, en el capítulo 5 se aborda una discusión y conclusión general, así como las perspectivas planteadas para la continuación de esta investigación.



## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1. Familia Clusiaceae

Clusiaceae es una familia de plantas angiospermas y dicotiledóneas, generalmente con crecimiento en forma de árboles, arbustos, epífitas y hemiepífitas, distribuidas dentro de las zonas tropicales del mundo. La familia comprende 40 géneros de uso principalmente ornamental, maderable, para el curtido de pieles y en la medicina tradicional (Martínez y Perez *et al.*, 2015). Entre los usos medicinales de estas plantas están los padecimientos relacionados con el reumatismo, problemas gastrointestinales y renales, fiebre, enfermedades venéreas, y agentes antiparasitarios, el dolor de muelas, enfermedades cutáneas en niños, etc. (Ferreira *et al.*, 2014; Xiao-Hui *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2006). Por otro lado, la familia Clusiaceae es una fuente importante de metabolitos bioactivos de tipo triterpenos, cumarinas, xantonas, cromanonas, flavonoides, biflavonoides y benzofenonas (Hemshkhar *et al.*, 2011; Xiao-Hui *et al.*, 2008).

#### 1.2. Metabolitos Secundarios y Actividad Biológica de Géneros y Especies de la Familia Clusiaceae

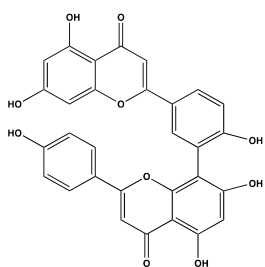
La actividad biológica de los metabolitos secundarios reportados en diferentes géneros de la familia Clusiaceae (Villaseñor, 2004) ha sido bien documentada, *e.g.*, en extractos etanólicos de hojas de *Calophyllum flavoramulum* M.R. Hend. & Wyatt-Sm se ha reportado la presencia de amentoflavona (1), 3-metoxi-2-hidroxixantona (2), quercitrina (3) y ácido protocatecuico (4), las cuales poseen actividad antioxidante y una marcada actividad anti-AGEs (Ferchichi *et al.*, 2012).

Otros flavonoides como luteolina (5), rutina (6), apigenina (7), volkensiflavona (8), fukugetina (9) y fukugesida (10) (Baureithel *et al.*, 1997; Luzzi *et al.*, 1997) identificados en extractos metanólicos de hojas y flores de *Garcinia kola* Heckel y *Rheedia gardneriana* Planch. & Triana han mostrado actividad analgésica, antiinflamatoria y capacidad de inhibir productos de glicación avanzada (anti-AGEs) (Derbré *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008).

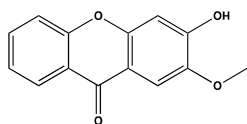
De manera similar, se han reportado siete xantonas obtenidas de una partición hexánica de un extracto metanólico de corteza de *Garcinia nobilis* Engl. De estas siete xantonas, esmeathxantona (**11**) y gartanina (**12**) se reportan con actividad anti-AGEs (Fouotsa *et al.*, 2012).

Las actividades anti-AGEs, antioxidante y quelante también se han reportado en MS de tipo benzofenonas como el garcinol (**13**), aislado de extractos etanólicos de los frutos de *Garcinia indica* Choisy (Cuesta-Rubio *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2000).

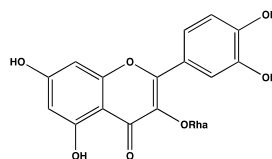
Uno de los géneros más importantes de la familia Clusiaceae en cuanto a su amplia diversidad y número de especies es el género *Clusia* L.; a pesar de que las especies de este género representan una fuente de moléculas bioactivas, en algunos casos su conocimiento fitoquímico y su actividad biológica son limitados.



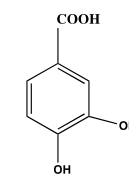
(1)



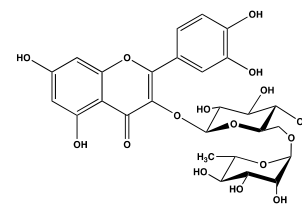
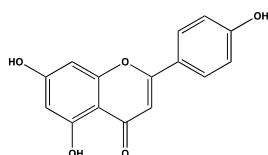
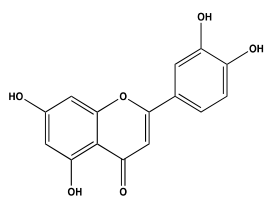
(2)



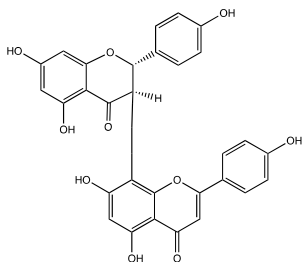
(3)



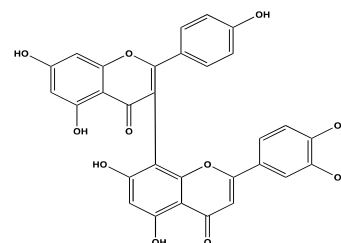
(4)



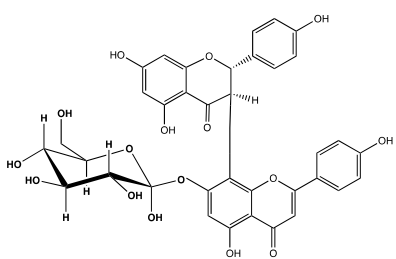
(5)



(6)

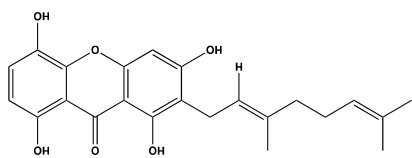


(7)

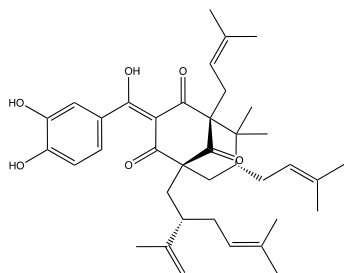


(8)

(9)

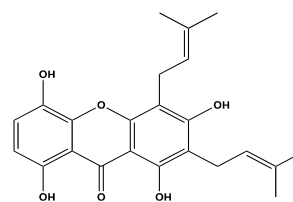


(11)



(13)

(10)



(12)

### 1.3. El Género *Clusia* L.

El género *Clusia* L. (Clusiaceae) comprende alrededor de 250-400 especies que presentan diferentes formas de vida y una amplia morfología floral que deriva en una alta especialización biológica (Gustafsson y Bittrich, 2002; Lüttge, 1999). El género presenta una distribución neotropical y una alta diversificación en el centro y sur de América (Figura 1.1). En México están reportadas 16 especies distribuidas en toda la república (Villaseñor, 2004) (Tabla 1.1). Las especies de *Clusia* L. presentan canales laticíferos a lo largo de la planta, que producen látex resinoso que funciona como una barrera defensiva. La abundancia y características físicas del látex difieren entre cada especie y entre cada órgano vegetal. Por otro lado, diferentes *Clusia* spp. producen resinas florales, producidas por los estambres y/o pistilos que actúan como recompensa para sus polinizadores (Anholeti *et al.*, 2015; Gustafsson y Bittrich, 2002).



**Figura 0.1** Distribución mundial del género *Clusia* L.

**Tabla 0.1** Número de especies pertenecientes a los géneros de la familia Clusiaceae, reportados en el mundo, en México y en Yucatán (Villaseñor, 2004).

Géneros de Clusiaceae presentes en México	Número de especies en el mundo	Número de especies en México	Número de especies en Yucatán
<i>Ascyrum</i> L.	40	1	-
<i>Calophyllum</i> L.	319	1	1
<i>Clusia</i> L.	400	16	4
<i>Garcinia</i> L.	225	2	1

<i>Hypericum</i> L.	400	23	-
<i>Mammea</i> L.	50	1	-
<i>Marila</i> Sw.	34	1	-
<i>Rheedia</i> L.	79	1	-
<i>Symphonia</i> L.	13	1	-
<i>Thornea</i> B&E.	2	2	-
<i>Tovomita</i> A.	45	1	-
<i>Vismia</i> V.	107	4	-

La adaptación ecológica, la presencia en diferentes ecosistemas y las diversas formas de crecimiento de *Clusia* spp. han generado una amplia plasticidad que en ocasiones dificulta su clasificación basada en datos morfológicos. La identificación por estos caracteres puede ser impreciso debido a que la floración dura poco tiempo y las especies presentan diferentes morfotipos (Gehrig *et al.*, 2003; Lüttge, 1999; Hammel, 1986). Adicional a los análisis morfológicos, otros marcadores tanto químicos como moleculares han sido utilizados para clasificar a *Clusia* spp. Las ceras cuticulares y florales así como marcadores moleculares ITS (*Internal Transcribed Spacer*) a menudo han sido utilizados para definir relaciones entre especies, proporcionando una visión de la diferenciación genética entre grupos relacionados (Ferreira *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2001; Porto *et al.*, 2000).

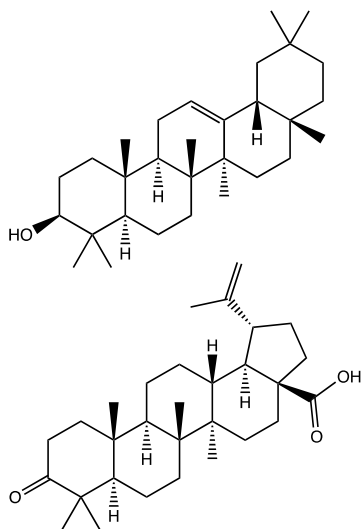
#### 1.4. Metabolitos Secundarios Reportados en *Clusia* spp.

Las especies de *Clusia* L. se caracterizan por producir metabolitos secundarios (MS) de tipo terpenoides y polifenólicos. La composición química del látex, resina, flores y hojas comprende principalmente triterpenos, sesquiterpenos, flavonoides glicosilados, taninos y benzofenonas. Reportes sobre *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, *Clusia melchiorii* Gleason, *Clusia obdeltifolia* Bittrich y *Clusia latipes* Planch. & Triana describen el aislamiento de  $\beta$ -amirina (**14**), ácido betulínico (**15**), ácido betulónico (**16**), betulinaldehído (**17**), glutinol (**18**), friedelina (**19**), friedelinol (**20**), estigmastenona (**21**),  $\beta$ -sitosterol (**22**) lanosterol (**23**) y/o estigmasterol (**24**) (Duprat *et al.*, 2017; Bailón-Moscoso *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2006).

Por otro lado, también en *C. melchiorii* y *C. latipes* se ha reportado la presencia de antraquinonas como xiloidona (**25**) y hesperidina (**26**), respectivamente (Teixeira *et al.*, 2006). *Clusia lanceolata* Cambess. presenta una gran variedad de sesquiterpenos, taninos y flavonoides como orientina (**27**), isoorientina (**28**), vitexina-2"-O-ramnósido (**29**) e isovitexina-2"-O-ramnósido (**30**) (Ferreira *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2013).

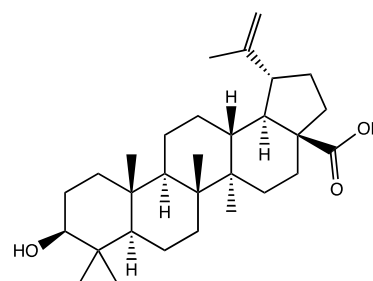
Por su parte, Ribeiro *et al.* (2011) describe el aislamiento en *Clusia burle-marxii* Bittrich de flavonoides tipo quercetina (**31**) y kaempferol (**32**), así como  $\beta$ -tocotrienol (**33**), ácido protocatéquico (**4**), lioniresinol (**34**) y un bifenilo nombrado 2,2-dimetil-3,5-dihidroxi-7-(4-hidroxifenil) cromano (**35**). En *Clusia insignis* Mart., y *Clusia nemorosa* G. Mey., han sido reportados metabolitos secundarios de tipo xantona como clusona (**36**) derivados de ácido ferúlico como octacosanoil ferulato (**37**) y fenil cromanos (**38**) (Ishiguro *et al.*, 1998; De Andrade *et al.*, 1998).

Metabolitos de tipo benzofenonas como ácido nemorosínico (**39**), clusiafenona A y B (**40**, **41**), vismiafenona B (**42**), chamona 1 (**43**), chamona 2 (**44**), nemerosona (**45**), oxatetraciclo-heptadecano diona (**46**) y plukenetiona A (**47**) han sido aislados principalmente de frutos y resinas florales de *C. nemorosa*, *Clusia sandiensis* Engl., *Clusia ellipticifolia* Cuatrec., *Clusia multiflora*, *Clusia grandiflora* Splitg., *C. insignis*, *C. obdeltifolia* y *Clusia plukenetii* Urb. (Teixeira y Cruz, 2005; Lokvam *et al.*, 2000; Porto *et al.*, 2000; De Oliveira *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 1999; González *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 1994; Cerrini *et al.*, 1993; Delle-Monache, *et al.*, 1991; González *et al.*, 1983).

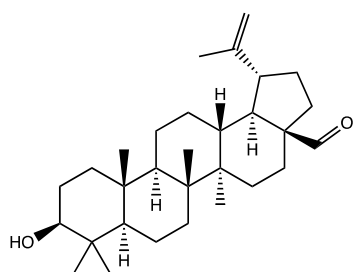


(14)

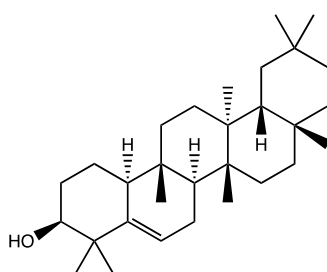
(15)



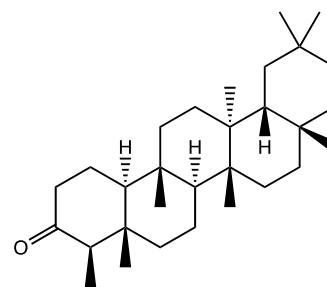
(16)



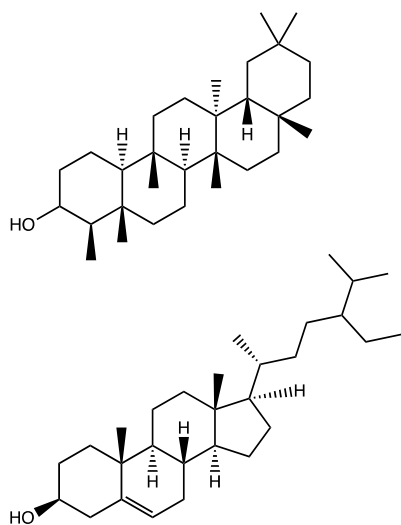
(17)



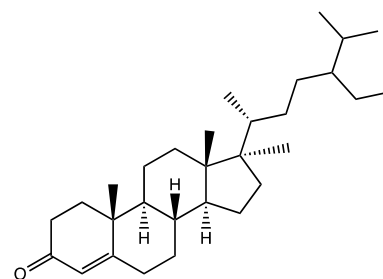
(18)



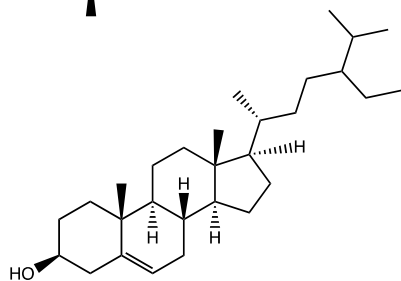
(19)



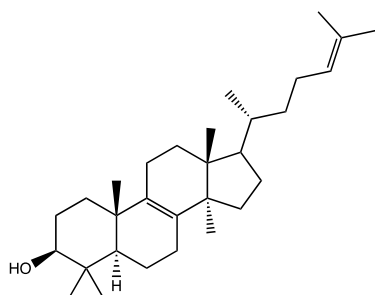
(20)



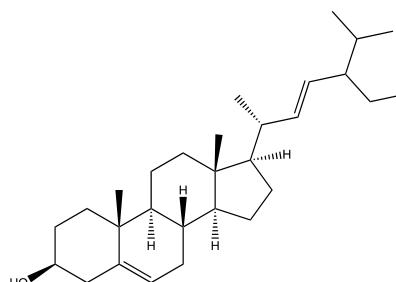
(21)



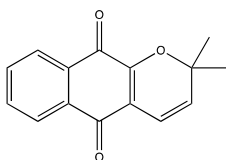
(22)



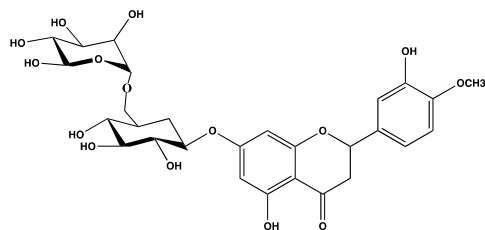
(23)



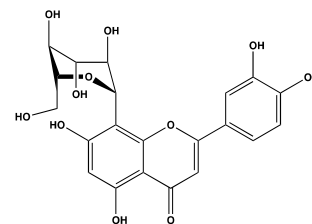
(24)



(25)

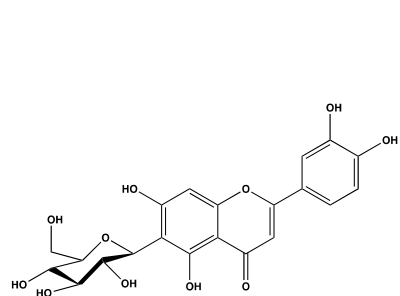


(26)

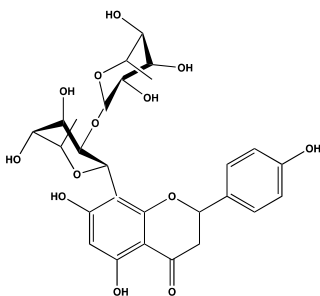


(27)

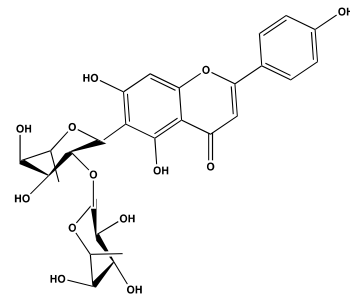




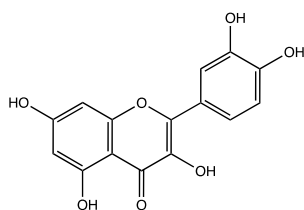
(28)



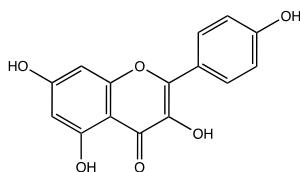
(29)



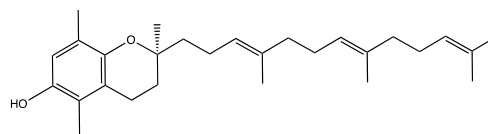
(30)



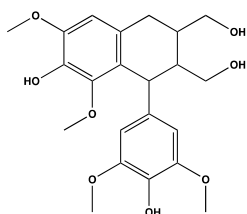
(31)



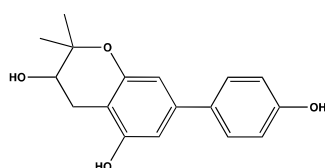
(32)



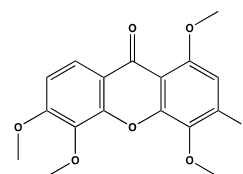
(33)



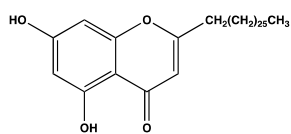
(34)



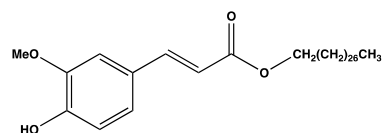
(35)



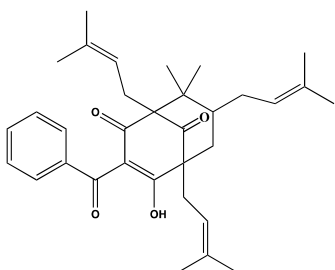
(36)



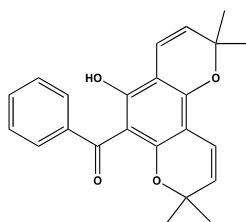
(37)



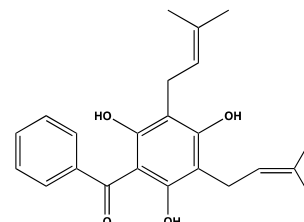
(38)



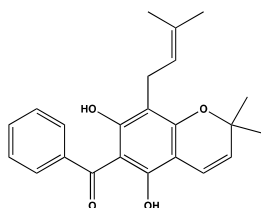
(39)



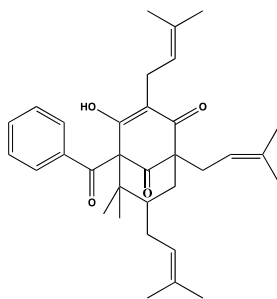
(40)



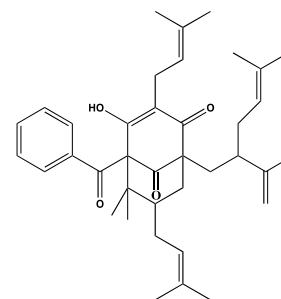
(41)



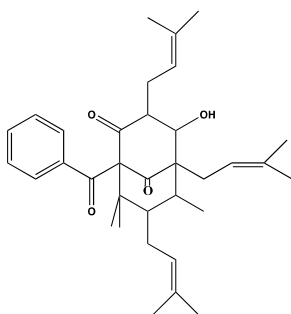
(42)



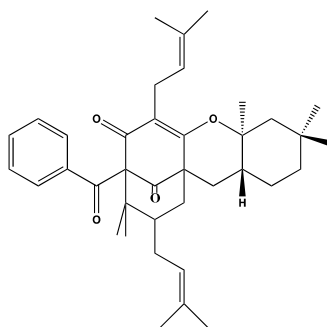
(43)



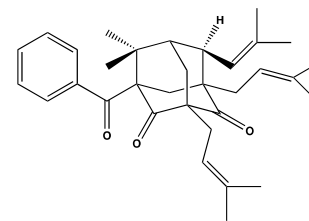
(44)



(45)



(46)



(47)

Dentro de la península de Yucatán, existen reportadas cuatro *Clusia* spp., determinadas como *Clusia flava* Jacq., *Clusia rosea* Jacq., *Clusia lundelli* Standl. y *Clusia suborbicularis* Lundell., las cuales se describen a continuación.

### **1.5. *Clusia flava* Jacq.**

La especie *C. flava* (*chuunup*, *k'an chuunup*, en maya) presenta una amplia distribución en Centroamérica, el Caribe y Norteamérica. En México se distribuye en el centro y sur del país. En la península de Yucatán, existen grandes poblaciones creciendo cerca de cuerpos de agua como cenotes; su desarrollo incluye diferentes formas de vida como arbustos, árboles y/o epífitas; se caracteriza por el olor a plátano proveniente de sus flores, debido a la presencia de acetato de isoamilo (48). En la península se ha reportado su uso ornamental y medicinal (Duno de Estefano *et al.*, 2010; Tropicos.org, 2021).

De las ceras cuticulares de *C. flava* se han reportado alcanos y triterpenos como  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina (49, 14), friedelina (19), lupenona (50) así como  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -tocoferol (51) y  $\beta$ -sitosterol (22) (Jetter y Riederer, 2016), diferentes sesquiterpenos como  $\alpha$ -copaeno (52),  $\beta$ -cariofileno (53),  $\alpha$ -humuleno (54), d-germacreno (55),  $\alpha$ -farneseno (56) y  $\alpha$ -cadineno (57) (Nogueira *et al.*, 2001). Los extractos etanólicos obtenidos de hojas, corteza y raíz presentan inhibición en el crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* y efecto acaricida contra *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Rosado-Aguilar *et al.*, 2009; Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

### **1.6. *Clusia rosea* Jacq.**

*C. rosea* (matapalo, sello) tiene una forma de vida principalmente arbórea, de hasta 15 m de altura, presenta hojas de gran tamaño; flores de color blanco y rosado que son visitadas por abejas, debido a la abundante cera que producen. Presenta una amplia distribución en América del sur, Centroamérica, el Caribe y América del Norte. En México se distribuye en la región centro-sur. En la península de Yucatán se registra en los

estados de Campeche y Quintana Roo. A pesar de que *C. rosea* no se encuentra catalogada como una especie en peligro, sus poblaciones se han visto disminuidas en los últimos años. En la península se ha reportado su uso medicinal y en la construcción de palapas (Duno de Estefano *et al.*, 2010; Tropicos.org, 2021).

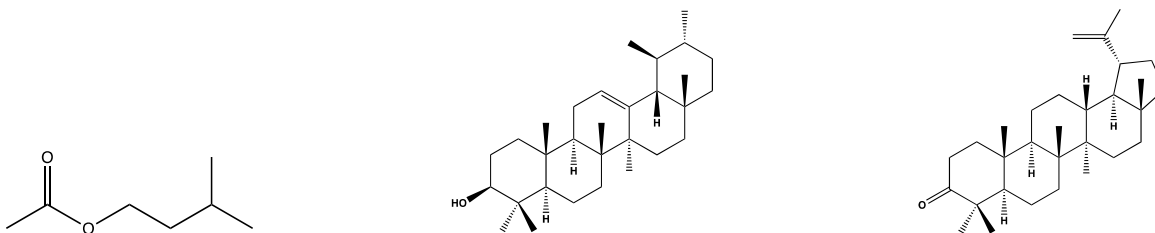
Los estudios fitoquímicos de *C. rosea* han identificado diferentes alcanos, alquenos, ácidos grasos y triterpenos, incluyendo aplotaxeno (**58**), friedelina (**19**),  $\alpha$ - y  $\beta$ -friedelinol (**59**), ácido oleanólico (**60**) y  $\beta$ -sitosterol (**22**) (Medina *et al.*, 2006; Mathur, 1972). Así mismo, se ha reportado bergamoteno (**61**) (Nogueira *et al.*, 2001) y diferentes benzofenonas como nemerosona (**45**) bromanona (**62**) y xantoquimol (**63**) con actividad antitumoral y antiinflamatoria (Da Cunha *et al.*, 2016; Camargo *et al.*, 2015; Díaz-Carballo *et al.*, 2012; Cuesta-Rubio *et al.*, 2001, 2005; De Oliveira *et al.*, 1999; Dreyer, 1974).

### 1.7. *Clusia lundellii* Standl.

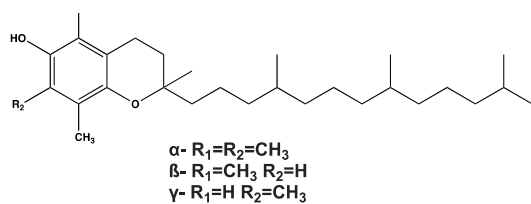
*C. lundellii* (sin. *Clusia chanekiana* Lundell) es un taxón con distribución en Belice, Guatemala, Honduras, el Caribe y México. En México su distribución comprende los estados de Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. En la península de Yucatán se describe como una especie con crecimiento arbóreo de hasta 4 m de altura; con uso medicinal contra la úlcera del chiclero (leishmaniasis) (Duno de Estefano *et al.*, 2010; Tropicos.org, 2021), hasta la fecha no se tienen registros fitoquímicos.

### 1.8. *Clusia suborbicularis* Lundell.

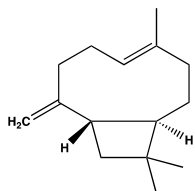
*C. suborbicularis* (sin. *C. flava*) fue descrita por primera vez en Belice. Su distribución se ha reportado en los países de Guatemala, Honduras y en México en la península de Yucatán. A la fecha no se cuentan con registros fitoquímicos (Duno de Estefano *et al.*, 2010; Tropicos.org, 2021).



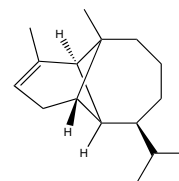
(48)



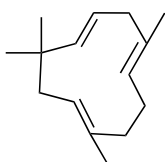
(49)



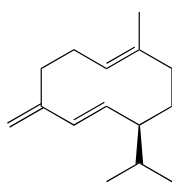
(50)



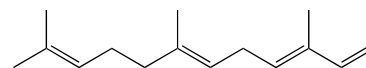
(51)



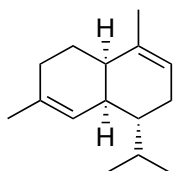
(52)



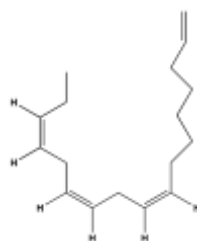
(53)



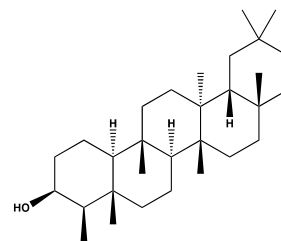
(54)



(55)



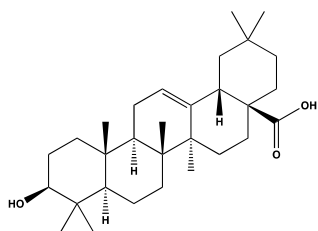
(56)



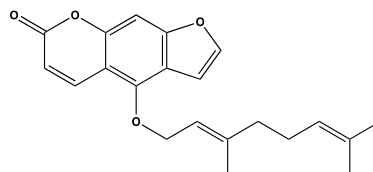
(57)

(58)

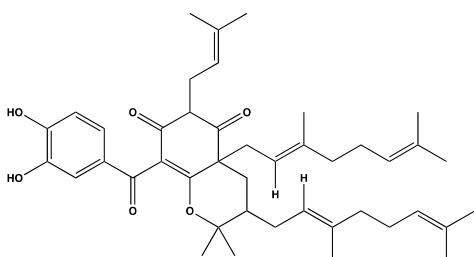
(59)



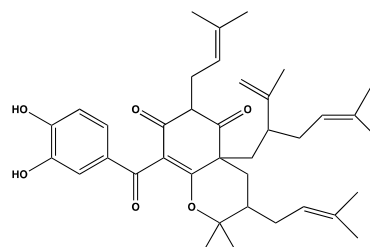
(60)



(61)



(62)



(63)

De acuerdo con lo anterior, y debido a que la familia Clusiaceae y las diferentes *Clusia* spp. representan una fuente de metabolitos secundarios taxonómicamente únicos y con potencial actividad biológica, se plantearon las siguientes preguntas, justificación, hipótesis y objetivos para la realización de este proyecto de investigación.

## **JUSTIFICACIÓN**

Los miembros de la familia Clusiaceae producen metabolitos secundarios con diferentes tipos de actividad biológica, incluyendo actividad antioxidante y anti-AGEs lo que supone una fuente de productos naturales con un potencial farmacéutico. Sin embargo, hasta ahora el conocimiento sobre la fitoquímica y la actividad biológica de las especies del género *Clusia* L. que se encuentran en la península de Yucatán es limitado. Ante esta situación, el presente trabajo se basa en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antioxidante y anti-AGEs como agentes potenciales en la bioprospección de nuevos fármacos, más eficaces y/o sin efectos secundarios.

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la relación quimiotaxonómica de las especies del género *Clusia* L. presentes en la península de Yucatán?

¿Cuáles son los metabolitos con actividad antioxidante y anti-AGES de las especies de *Clusia* L. de la península de Yucatán?

## **HIPÓTESIS**

De acuerdo con los metabolitos secundarios presentes en los diferentes géneros de la familia Clusiaceae y/o su actividad biológica reportada, las especies del género *Clusia* L. distribuidas en la península de Yucatán presentan una relación quimiotaxonómica entre ellas, y sus metabolitos secundarios de tipo xantonas, flavonoides y/o benzofenonas presentan actividad antioxidante y anti-AGES similar a la de los metabolitos secundarios reportados en otras especies del género *Clusia* L. y la familia Clusiaceae.



## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la relación quimiotaxonómica entre las especies del género *Clusia* L. presentes en la península de Yucatán y llevar a cabo el aislamiento e identificación de metabolitos biológicamente activos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Utilizar herramientas quimiométricas y moleculares para establecer una posible relación taxonómica entre las diferentes especies del género *Clusia* L. presentes en la península de Yucatán, México.
2. Establecer un protocolo de purificación utilizando técnicas cromatográficas y espectroscópicas para la purificación biodirigida de metabolitos secundarios biológicamente activos de las especies del género *Clusia* L. presentes en la península de Yucatán, México.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Durante la realización de este proyecto se siguió un flujo de trabajo, representado en la Figura 1.2. Partiendo de la búsqueda, identificación y colecta de poblaciones de *Clusia* spp., seguido de la obtención de extractos vegetales, un fraccionamiento semibiodirigido asistido por  $^{13}\text{C}$ -RMN, y el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios biológicamente activos, así como el establecimiento de la relación quimiotaxonómica de las *Clusia* spp., presentes en la península.

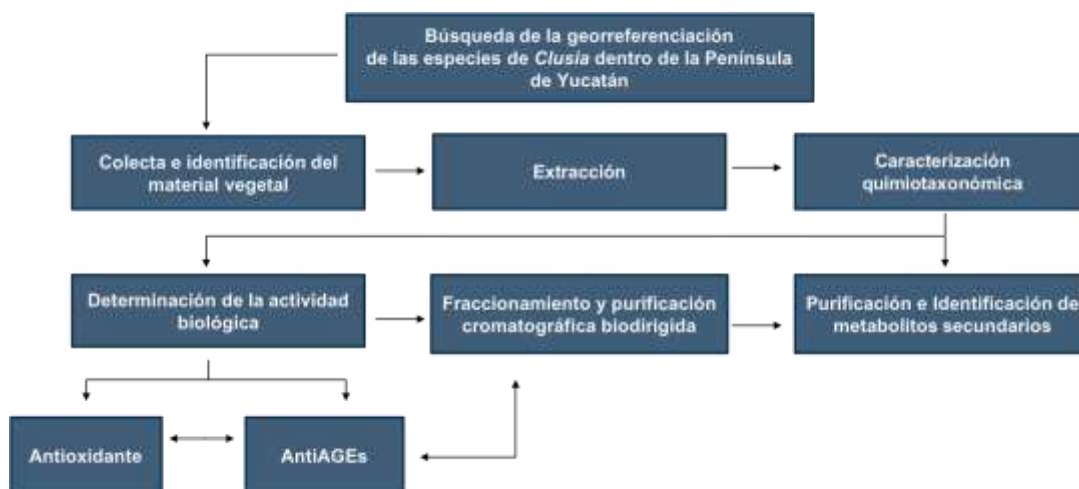


Figura 0.2 Esquema de la estrategia experimental.

## CAPÍTULO II

### ***Clusia suborbicularis* IS NOT A SYNONYM OF *Clusia flava*. MOLECULAR AND METABOLOMIC EVIDENCE**

Luis Alfredo Herbert-Doctor<sup>1</sup>, Gabriel Dzib<sup>2</sup>, Barry Edward Hammel<sup>3</sup>, Bartolomé Humberto Chí-Manzanero<sup>1</sup>, Blondy Beatriz Canto-Canché<sup>1</sup>, Karlina García-Sosa<sup>1</sup>, Pascal Richomme<sup>4</sup>, Séverine Derbré<sup>4</sup>, Luis Manuel Peña-Rodríguez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología and <sup>2</sup>Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo; C.P. 97205. Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup>Missouri Botanical Garden MO. 4344 Shaw Blvd, St. Louis MO; P.C. 63110. USA

<sup>4</sup>Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux, SFR 4207 QUASAV. Université d'Angers, Campus du Végétal, St. 42 rue Georges Morel; P.C. 49070. Angers, Francia.

Los resultados descritos en este capítulo forman parte del objetivo 1, descritos en el manuscrito "*Clusia suborbicularis* is not a synonym of *Clusia flava*. molecular and metabolomic evidence", en segunda revisión

después de correcciones menores en TAXON (TAXON MS: TAXON-D-20-00140\_R3). Autores: Luis Alfredo Herbert-Doctor, Gabriel Dzib, Barry Edward Hammel, Bartolomé Humberto Chí-Manzanero, Blondy Beatriz Canto-Canché, Karlina García-Sosa, Pascal Richomme, Séverine Derbré, Luis Manuel Peña-Rodríguez.

## 2.1. INTRODUCTION

The genus *Clusia*, which contains 300 to 400 species having a neotropical distribution (Gustafsson *et al.*, 2007), is notorious for its difficult taxonomy. Most of its species are dioecious, with distantly related species often having very similar vegetative morphology, and closely related species being virtually identical, with only cryptic fertile morphological differences (Hammel, 1986). Positive identification often depends on having mature material of both staminate and pistillate individuals (Luján, 2019), which is not an easy task in such arborescent, often dioecious taxa. Many *Clusia* spp. are hemiepiphytes or epiphytes, some are terrestrial shrubs or trees and, occasionally, a particular species may display different growth forms (Gustafsson y Bittrich, 2002). The diversity of life forms and growth habits, together with the ecological adaptation and the specialization of *Clusia* spp. especially with regards to floral and fruit morphology, have resulted in some of the more obvious morphological variations in the genus (Gustafsson y Bittrich, 2002). Often *Clusia* spp., are easily misidentified on the basis of their morphological characteristics, with names later shown to be synonyms (*e.g.*, *C. minor* L., considered a synonym of *C. parvicapsula* Vesque) (Hammel, 1986), or names considered synonyms subsequently thought to represent distinct species. Occasionally, studies have shown male and female individuals of a single species being described as different species or in different genera (*e.g.*, male individuals of *C. sellowiana* Schltld. identified as syntype *Oedematopus dodecandrus* Triana & Planch.) (Luján, 2019; Gustafsson *et al.*, 2007). The delimitation of species represents a problem in the classification of organisms because their existence is seldom evaluated integrating different types of data (*e.g.*, phenetic, genetic, biochemical, and ecological) that allow organisms to be distinguishable from one another (De Queiroz, 2007). One well known case of synonymy in *Clusia* spp., is that of *C. suborbicularis* Lundell, first described from a collection in Belize (Lundell, 1937), and *C. flava* Jacq. Even though different species accounts suggested that *C. suborbicularis* and *C. flava* could be recognized as distinct taxa (Ulloa *et al.*, 2017; Villaseñor, 2004; Hammel, 1986; Maguirre, 1979), the former was not accepted nor listed in the 1999 *World Checklist of Seed Plants* (POWO, 2020) and, to date, *C. suborbicularis* is still considered to be a synonym of *C.*

*flava* (POWO, 2020; Martínez *et al.*, 2015; ‘The Plant List’, 2013; Balick *et al.*, 2000). Currently, morphological classification of *Clusia* spp. is often combined with other methods such as molecular and chemical markers for appropriate identification (Anja Vaasen *et al.*, 2002; Gustafsson y Bittrich, 2002). Accordingly, sequencing results of the ITS (Internal Transcribed Spacer of nuclear ribosomal of DNA) marker of different *Clusia* spp. have been used to confirm species classification into different morphological groups (*e.g.*, the *C. flava*, *C. minor* and *C. multiflora* groups) (Hammel, 1986) or into groups having different photosynthetic metabolism (*e.g.*, *C. minor* and *C. uvitana* Pittier., with CAM photosynthesis; and *C. salvinii* Donn. Sm. and *C. triflora* Cuatrec., with C3 metabolism) (Gehrig *et al.*, 2003). Similarly, the SSRs (Simple Sequence Repeats) markers, which can detect polymorphism at the population level, have been used to genotipify individuals of *Clusia* spp. collected in different geographical sites (Vaasen *et al.*, 2002). Additionally, chemotaxonomical markers have allowed to distinguish between different *Clusia* spp. on the basis of the main families of secondary metabolites found in flower volatiles, leaves, and other parts of the plants (Ribeiro *et al.*, 2019; Anholeti *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2001); often, chemotaxonomic groupings in *Clusia* spp., have coincided with those generated by molecular markers (Medina *et al.*, 2006). Recently, as part of a project directed towards the identification of bioactive metabolites produced by *Clusia* spp. of the Yucatán peninsula we encountered a problem of classification between two apparently different taxa, which are reported as synonyms in the literature. Here we report the use of both chemometric analyses of HPLC metabolic profiles and phylogenetic analyses using ITS molecular markers to evaluate whether *C. suborbicularis* should be considered a distinct taxon or a synonym of *C. flava*, and the use of theoretical geographical distribution analysis to suggest that *C. suborbicularis* could be a native species to the Yucatán peninsula.

## **2.2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.2.1. Collected Plant Material**

Leaves and stems of *Clusia flava*, *Clusia suborbicularis*, *Clusia rosea*, and *Clusia lundellii* were collected in different locations of the Yucatán Peninsula in México. The specimens were deposited in the herbarium of Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) (see Table 6.2 S2 in Supplementary Material for the full listing of collection sites

and voucher specimen numbers. Annex 1). Identification of the different species using morphological characters was carried out by José Luis Simá-Gómez (CICY) and Barry E. Hammel (Missouri Botanical Garden, MO). *C. flava* and *C. suborbicularis* were identified using a resin marks from the leaves (see Figure 6.1 S3 and 6.4 S4 in Supplementary Material. Annex 1); while *C. rosea* and *C. lundellii* were identified using characters from the flowers and leaves, respectively.

### **2.2.2. Plant Material for Chemometric Analyses**

The collected plant materials were cleaned to remove dust and all non-plant material, the leaves and bark were manually removed from the stems. The plant materials were dried in an oven at 60 °C, ground in a mortar, and extracted by maceration (three times, 24 h ea.) with ethanol (1 L/100 mg). The solvent was filtered first through cotton, then through Whatman No. 1 filter paper, and then removed under reduced pressure in a rotary evaporator (Büchi, R-300) equipped with a vacuum controller (Büchi, V-800) to obtain the corresponding crude extracts.

### **2.2.3. HPLC Profiles of *Clusia* spp. Crude Extracts**

The HPLC chromatographic profiles were obtained using a Waters e2695 HPLC equipped with a PDA detector (Waters, 2998). An Eclipse XDB-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) was used for the analyses. The mobile phase was made of methanol (A) and water-formic acid, pH. 5.0 (B) with a gradient program as follows: 0-25 min, 10% A; 25-44 min, 75% A; 44-50 100% A; 50-60 min, 10% A. The flow rate was set at 1 mL/min and 20 µL (10 mg/mL) of the sample were injected in duplicate. The absorbance was measured at a wavelength (λ) of 350 nm.

### **2.2.4. Multivariate Data Analyses**

The data analyses were carried out with modification of the method described by (Alvarez-Zapata *et al.* (2015)). The data of the chromatographic profiles obtained by HPLC were exported in ARW format using the Empower software (QuickStart v. 5.0) and imported into a matrix in Excel software (Microsoft v. 2016). The baseline correction of the chromatographic profiles was performed using the Adaptive Iteratively Reweighted Penalized Least Squares (AirPLS) algorithm for MATLAB (Mathworks v. R2016b) and the

alignment was done using the Correlation Optimized Warping (COW) algorithm for MATLAB. Data normalization was performed using a function equation on Excel. The Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) were carried out using MetaboAnalyst (v. 5.0) software, using the retention times from the different components observed in the HPLC profiles of the leaf and bark extracts of individuals from the different *Clusia* spp.

### **2.2.5. DNA Extraction, Amplification and Sequencing**

Fresh leaves were cut into pieces and macerated with liquid nitrogen. The extraction of genomic DNA was carried out using the Nucleon Phytopure Plant DNA kit, Amersham (Biosciences). The ITS region comprising ITS1, the 5.8S gene and ITS2, was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the universal primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). The PCR reaction was carried out in reaction mixtures of 25  $\mu$ L. The mixture contained 12.5  $\mu$ L (1X) of Master Mix Dream Taq (2X) buffer (Thermo Scientific K1081), 0.5  $\mu$ L of each of the primers (0.2  $\mu$ M), 1  $\mu$ L of genomic DNA (50 ng/ $\mu$ L), and 10.5  $\mu$ L of sterile double-distilled water. The PCR was performed using T100 thermal cycler (BioRad), with the program: initial denaturation at 94 ° C for 3 min, followed by 30 cycles at 94 ° C for 1 min and 58 ° C for 30 seconds, with an extension at 72 ° C for 40 seconds and a final extension at 72 ° C for 5 min, ending at 4 ° C. The amplicons (1.25  $\mu$ L) were observed on agarose gel (1%) using TAE buffer (1X) with a molecular marker of 1 Kb (Ogene Ruler Plus, Thermo Scientific). Purification of DNA band was carried out using the QiAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). The ITS (37 ng) was ligated into the pGEM-T Easy 3015 bp vector (Promega) to prevent loss of sequence information at the 5' and 3' ends, as usually happens after *in silico* edition. The transformation was carried out by thermal shock using the *E. coli* top 10 strain (Invitrogen). Colony PCR was performed and the plasmid DNA was purified and sent for sequencing to "Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA-IPICYT)". Sequences were deposited in GenBank of NCBI (National Biotechnology Information Center) with accessions numbers: MT361507, MT361508, MT361509, MT361510.

### 2.2.6. Phylogenetic Analysis

The ITS sequences obtained for this investigation were compared using the BLAST algorithm, with those contained in the database of homologous sequences of *Clusia* spp. (GenBank) at NCBI to confirm amplification of the ITS1, the 5.8S gene and the ITS2 regions. The experimentally obtained ITS sequences were analyzed using the MEGA-X (v. MacOS) software (Stecher *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2018; Tamura y Nei, 1993), and aligned with non-redundant sequences of *Clusia* spp. from the GenBank using the CLUSTAL-W algorithm. Values of pairwise sequence ( $p$ -distance) were computed; the phylogenetic relationship was inferred by using the Maximum Likelihood (ML) method and the Tamura-Nei model, using 1000 bootstrap replicates and the MEGA-X software.

### 2.2.7. Simulation of an Ecological Niche of *Clusia suborbicularis*

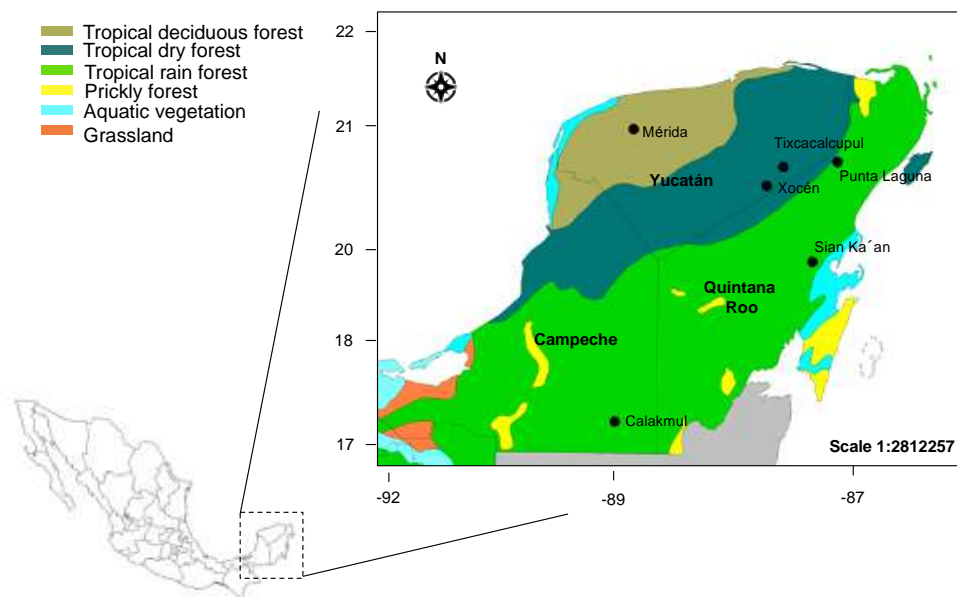
Ecological niche models were obtained for *C. suborbicularis* and *C. flava* using BIOCLIM and DOMAIN, two statistical methods that use different environmental conditions and occurrence data (Arieira *et al.*, 2018). The coordinates occurrence data of *C. suborbicularis* and *C. flava* were obtained from the Global Biodiversity Information Facility (GBIF) available at [www.gbif.org](http://www.gbif.org), using data of the 18 specimens reported and identified as *C. suborbicularis* (15 determined by B.E. Hammel, which include seven specimens collected for this investigation, one specimen reported by J. Morales-Can and listed in MO, one specimen from the Field Museum of Natural History, and the holotype specimen collected by C.L. Lundell). The occurrence data for *C. flava* were obtained from 295 records contained in an open GBIF database prepared with specimens deposited and curated in different herbaria. The models were constructed in Diva-GIS software (v. 7.5). Data of 19 climatic variables were obtained from WorldClim database ([www.worldclim.org](http://www.worldclim.org)) and used at a resolution of 2.5 min. The data included annual mean temperature, mean diurnal range, isothermality, temperature seasonality, max temperature of warmest month, min temperature of coldest month, annual range of temperature, mean temperature of wettest quarter, mean temperature of driest quarter, mean temperature of warmest quarter, mean temperature of coldest quarter, annual precipitation, precipitation of wettest month, precipitation of driest month, seasonality precipitation, precipitation of wettest quarter, precipitation of driest quarter, precipitation of warmest quarter, precipitation of coldest quarter.



## 2.3. RESULTS

### 2.3.1. Collection of *Clusia* spp.

Populations of *Clusia* spp. in the Yucatán peninsula were located using database records from collected specimens in the herbarium of Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), together with data from Herbario Nacional de México (MEXU) and from the Missouri Botanical Garden (MO). The records indicated the presence of four *Clusia* spp. in the Yucatán peninsula: *C. flava*, *C. rosea*, *C. lundellii*, and *C. suborbicularis*. However, database records and morphological data from the herbarium at CICY only listed the first three *Clusia* spp. Accordingly, populations of *C. flava* were collected from the communities of Punta Laguna (PL), Tixcacalcupul (TX), and Xocén (XN); *C. rosea* from Mérida (MR) and Calakmul (CK); and *C. lundellii* from Calakmul (CK) and Sian Ka'an (SK) (note that the results of this investigation have allowed the correct identification of the population of *C. lundellii* collected in Sian Ka'an, as *C. suborbicularis*). The main dominant ecosystems in the collection sites include tropical deciduous forest, dry tropical forest and tropical rain forest (Figure 2.1).



**Figure 0.1** Collection sites of *Clusia* spp. Map of the Yucatán peninsula showing the collection sites of *Clusia flava* [Punta Laguna (PL), Tixcacalcupul (TX), Xocén (XN)], *Clusia rosea* [Mérida (MR), Calakmul (CK)] and *Clusia lundellii* [Calakmul (CK), Sian Ka'an (SK)].

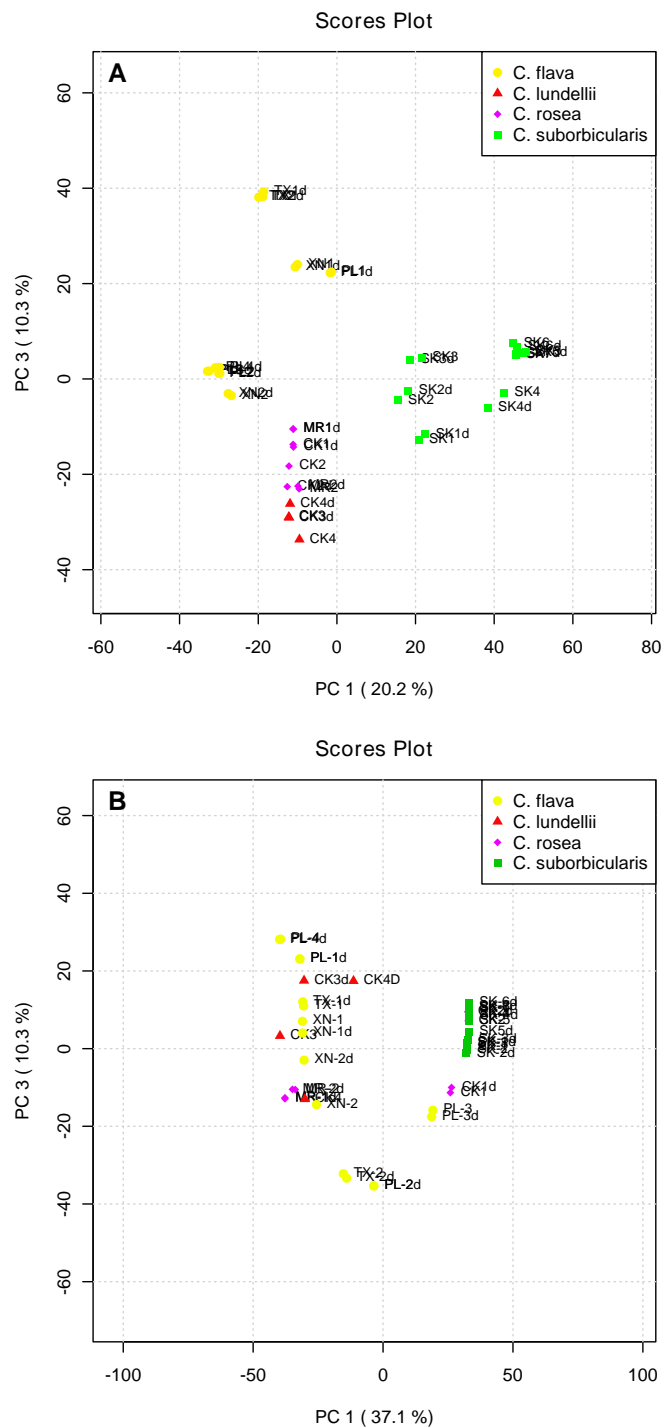
### 2.3.2. Morphological Evaluation of *Clusia* spp.

Common morphological characteristics of *Clusia* spp. (Martínez *et al.*, 2015; Hammel, 1986) confirmed the identification of both *C. rosea* [individuals collected from the populations in Calakmul (CK) and Mérida (MR)] and *C. lundellii* [individuals collected from the population in Calakmul (CK)]. Alternatively, while the resin marks in the leaves of the individuals collected from the populations in Punta Laguna (PL), Xocén (XN) and Tixcacalcupul (TX), observed as rather obscure to more obvious dark lines or dashes, rather parallel to the lateral veins, often visible on both surfaces, confirmed their identification as *C. flava* (Barry E. Hammel, personal observation), the scarcely visible (with hand lens) resin marks observed as intermittent, often branched and curved lines that appear to form a web or maze (Barry E. Hammel, personal observation) in the underside of the leaves of the individuals from the population collected in Sian Ka'an, listed in the herbarium registry at CICY as *C. lundellii*, allowed their identification as *C. suborbicularis*. Additionally, the individuals identified as *C. suborbicularis* showed larger (12-15 cm long, 8-10 cm wide) with suborbicular lamina, when compared to individuals

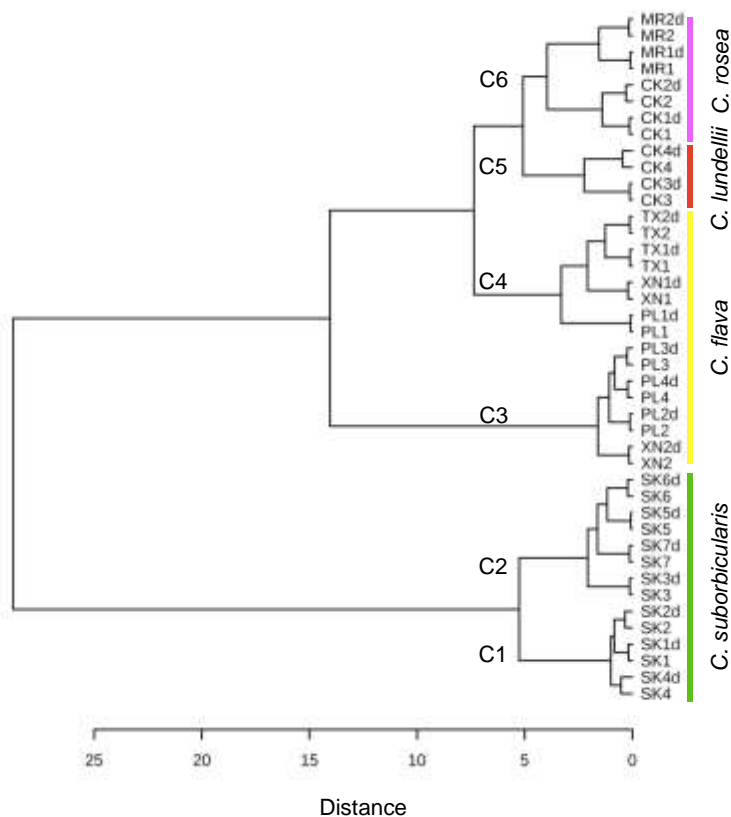
identified as *C. flava* which displayed smaller leaves and a lamina obovate (Table 6.1 S1, Figures 6.1 S3 and 6.2 S4 in Supplementary Material. Annex 1).

### **2.3.3. Chemometric Analysis of Chromatographic Profiles of *Clusia* spp.**

The analyses were carried out constructing two independent PCAs using the HPLC profiles of the leaf and bark extracts of individuals from the different *Clusia* spp. While the PCA analyses of the HPLC chromatographic profiles of the leaf extracts showed a center grouping in the plot (Figure 2.2A), making it impossible to differentiate the collected *Clusia* spp., the principal components PC-1 vs PC-3 obtained from the PCA analyses of the HPLC data from the bark chromatographic profiles showed a better discrimination of the species (Figure 2.2B), with four groups clearly defined; one group belonging to individuals of *C. flava*, the second corresponding to those of *C. rosea*, and a third and fourth groups corresponding to individuals of *C. lundellii* collected in Sian Ka'an and Calakmul, respectively. A Hierarchical Clustering Analysis (HCA) of the HPLC chromatographic profiles of the bark extracts from individuals of the different *Clusia* spp. also showed four distinct groups (Figure 2.3), with a similar distribution as that obtained from the PCA analysis.



**Figure 0.2** Chemometric analysis of chromatographic profiles of *Clusia* spp. PCA analyses of chromatographic profiles of leaf (A) and bark (B) extracts from *Clusia* spp. of the Yucatán peninsula. B, Only the PCA analyses of the chromatographic profiles of bark extracts allowed to discriminate between *C. flava* (●), *C. rosea* (◆), *C. lundellii* (▲) and *C. suborbicularis* (■).

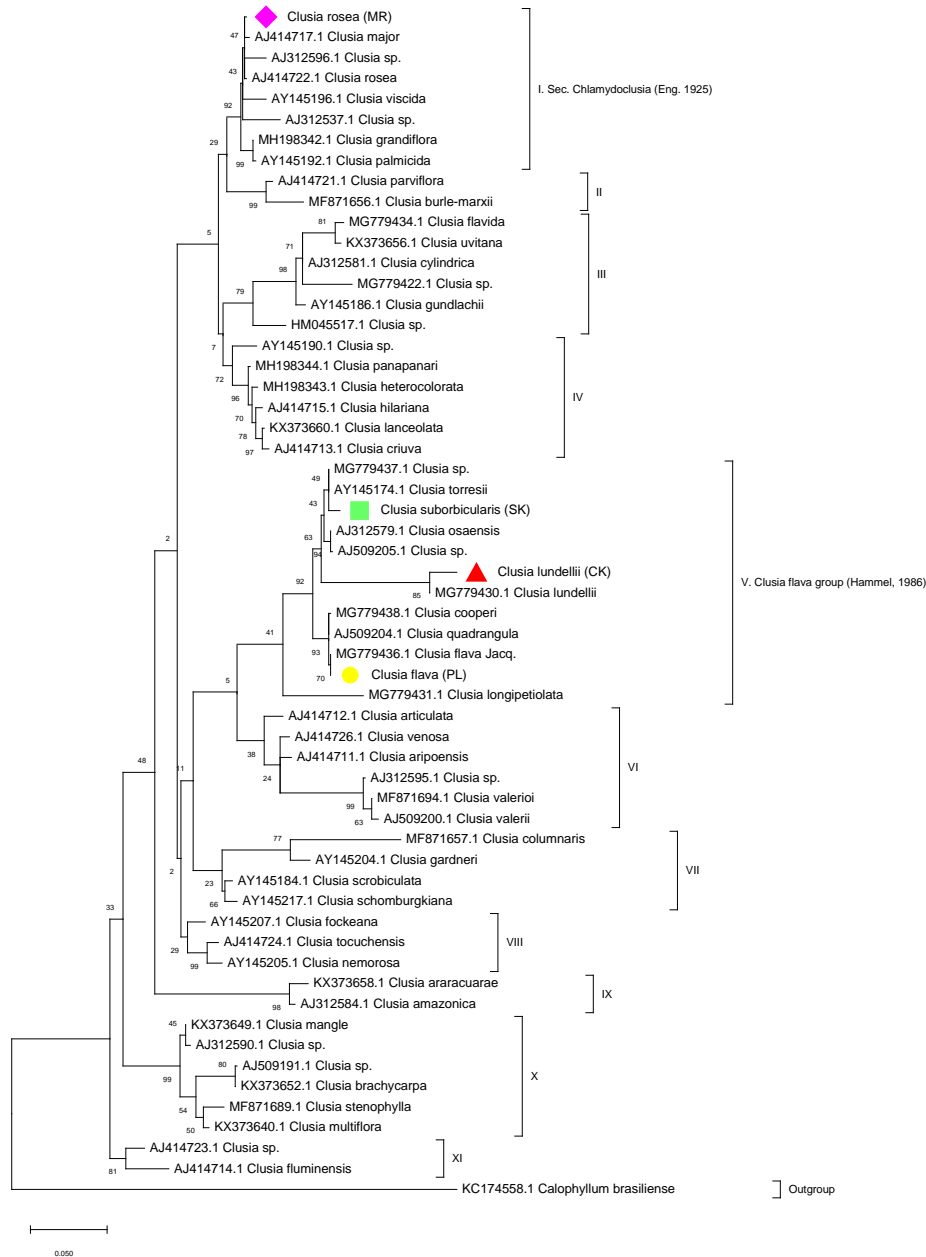


**Figure 0.3** Clustering Analysis of *Clusia* spp. HCA from chemometric analyses of HPLC chromatographic profiles showed four clades, each clustering individuals of the same *Clusia* spp., independently of their collection site.

#### 2.3.4. Phylogenetic Reconstruction of *Clusia* spp.

The Maximum Likelihood (ML) analysis based on the ITS sequences of *Clusia* spp. involved 58 nucleotide sequences and 998 nucleotides in the final dataset. The ML tree showed the species collected in the Yucatán peninsula in clades labeled I and V, formed by two monophyletic groups (Figure 2.4). While *C. rosea* appeared in clade I, *C. flava*, *C. suborbicularis*, and *C. lundellii* were located in clade V. The phylogenetic tree clearly showed the individuals collected in Sian Ka'an (SK), morphologically identified by their leaf resin marks as *C. suborbicularis*, in a different branch of the tree than those individuals collected in Punta Laguna (PL), morphologically identified as *C. flava*. Similarly, individuals of *C. lundellii* collected in Calakmul (CK) appeared in a different clade than *C.*

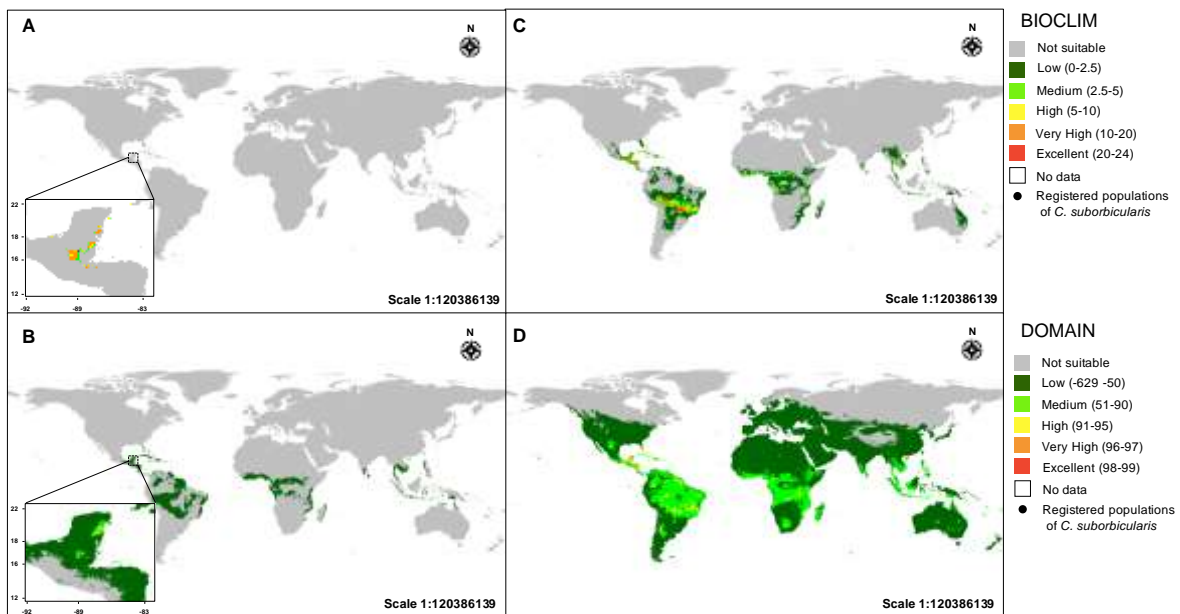
*suborbicularis* (SK). Values of pairwise sequence divergence for ITS between samples of *C. suborbicularis* (SK) and *C. flava* (PL) showed a *p*-distance of 0.18%, whereas samples of *C. suborbicularis* (SK) and *C. lundellii* (CK) showed a *p*-distance of 0.39%.



**Figure 0.4** Phylogenetic reconstruction of *Clusia* spp. Phylogenetic tree derived from Maximum Likelihood (ML) analysis of ITS sequences with 1,000 bootstrap replicates, focusing on the placement relationships of *C. suborbicularis* (■), *C. flava* (●), *C. lundellii* (▲) and *C. rosea* (◆).

### 2.3.5. Prediction of Distribution of *C. suborbicularis*

Two models of species-distribution based on a geographic information system were used to acquire information concerning the potential geographical distribution of *C. suborbicularis* and *C. flava*. Both algorithms produced similar results, showing a high probability for the presence of *C. suborbicularis* in the Caribbean coast of the Yucatán peninsula and the northern regions of Guatemala (Figures 2.5A,B), and a wider distribution of *C. flava*, from southern México to Central and South America (Figures 2.5C,D).



**Figure 0.5** Predicted distribution of *C. suborbicularis*. Models of distribution comparing for *C. suborbicularis* (A,B) and *C. flava* (C,D) using the Bioclim and Domain algorithms.

## 2.4. DISCUSSION

Even though the existence of four *Clusia* spp. in the Yucatán peninsula, namely *C. flava*, *C. rosea*, *C. lundellii*, and *C. suborbicularis*, was established after revising registry data from three herbaria, only one record for *C. suborbicularis* was found in MEXU. A detailed morphological analysis of the collected plant material confirmed the identification of three different populations (PL, TX, XN) as *C. flava* and one population (MR) as *C. rosea*; a similar analysis of the populations collected in Calakmul (CK) and Sian Ka'an (SK) suggested that each corresponded to a different species; while the CK population was

confirmed as *C. lundellii*, the SK one was identified as *C. suborbicularis*. After the initial morphological identification of the plant material was completed, it was decided to confirm these results using metabolomics and chemometric analyses, since both have been used in the differentiation of closely related species (Zhao *et al.*, 2019), as well as in the authentication of plant materials and the purification of bioactive metabolites (Yulianto *et al.*, 2016; Alvarez-Zapata *et al.*, 2015). The PCA resulting from the chemometric analysis of the HPLC metabolic profiles of the leaf extracts of individuals identified morphologically as *C. flava*, *C. rosea*, *C. lundellii*, and *C. suborbicularis* indicated that these extracts could not be used to differentiate the four species, likely because of their similarity in chemical composition (Figure 2.2A); a similar analysis of the HPLC metabolic profiles of bark extracts (Figure 2.2B), which are more diverse in their content of secondary metabolites than leaf extracts (Wink, 2010a), showed four distinct groups, one corresponding to *C. flava* individuals, another one to *C. rosea*, and a third and fourth groups corresponding to *C. lundellii* and *C. suborbicularis* individuals, thus confirming the findings in the morphological analysis.

The results of the PCA analyses were further confirmed by an HCA analysis (Figure 3.2), which also showed the grouping of the different chromatographic profiles of the bark extracts in four distinct clades. Furthermore, the results obtained in the HCA suggested the existence of different chemotypes that can originate from changes in the metabolome, which can be traced back to the phenotypic plasticity (morphotypes and physiotypes) of *Clusia* spp. (Lüttge, 2007; Lüttge, 1999); since physiotypes and morphotypes in a population of *Clusia* spp. can occur as a consequence of the availability of resources (light, water, etc.), the development of chemotypes can ensure a better adaptation to new environmental conditions (Li *et al.*, 2018). The presence of chemotypes is particularly evident in *C. flava*; while the PCA analysis groups together individuals from the different populations (Figure 2.2B), the HCA clearly shows the presence of two distinct groups indicating significant chemical diversity, even in individuals within the same population (Figure 3.2). To date, a number of chemotaxonomic approaches have been used to differentiate *Clusia* spp.; these include the GC-MS analyses of epicuticular waxes (Medina *et al.*, 2006) and flower volatiles (Nogueira *et al.*, 2001), as well as determining the degree of benzophenone prenylation using  $^{13}\text{C}$ -NMR (Anholeti *et al.*, 2015).



Alternatively, molecular markers such as ITS and SSR's have also been used to identify *Clusia* spp. (Gehrig *et al.*, 2003; Vaasen *et al.*, 2002). In this investigation, the ITS molecular marker (ITS1, 5.8S and ITS2), used to both reconstruct the phylogenetic history and evaluate the conspecific relationship within *Clusia* spp. was obtained with a significantly longer sequence than that reported for *Clusia* spp. in the literature (Vaasen *et al.*, 2002). Initial comparison of the interspecific distance ( $p$ -distance) between the ITS sequences obtained experimentally and those contained in the GenBank, showed a significant variation between *C. flava* and *C. suborbicularis* ( $p$ -distance of 0.18%), which indicated their being two different species. This was confirmed by the observed topology of the ML ITS-based tree which placed *C. flava* and *C. suborbicularis* in different clades (Figure 4.2).

It is important to mention that the 5.8S motif (5'-GAATTGCAGAATCC) rules out the potential contamination from bryophyte algae or fungi in the sequence (Jobes y Thien, 1997), and that the clades of the phylogenetic ITS tree are in agreement (with some exceptions) with similar phylogenetic analyses used in the classification of *Clusia* spp. (Gehrig *et al.*, 2003; Gustafsson y Bittrich, 2002; Vaasen *et al.*, 2002). It is also important to point out that while the clade V containing *C. flava*, *C. suborbicularis*, *C. lundellii* and other *Clusia* spp. in the ML phylogenetic tree (Figure 4.2) coincides with the *Clusia flava* group originally proposed by Hammel on the basis of floral and pollen morphology (Hammel, 1986), the clade I containing *C. rosea* corresponds to the *Chlamydoclusia* section proposed by Engler (1925) on the basis of floral morphology (Figure 4.2) (Gustafsson y Bittrich, 2002). Furthermore, the results in the ML tree coincide with previous findings suggesting that *C. rosea* and *Clusia major* L. are the same species (Vaasen *et al.*, 2002a).

The different branch length observed in the topology of ML phylogenetic tree, between the accessions from *C. lundellii* collected for this investigation and those from *C. lundellii* registered in the NCBI (GenBank MG779430.1) (Figure 4.2), might be due to the differences in the geographical and ecological sites where plant materials were collected (Smith *et al.*, 2019; Rukhsana *et al.*, 2014; Lüttge, 2007). Phylogenetic reconstruction of the evolutionary relationship between *C. flava* and *C. suborbicularis* indicated they are not

conspecific taxa. The fact that *C. suborbicularis* appears to be more closely related to *C. lundellii* than to *C. flava* further supports their being recognized as two distinct taxa.

Finally, since the use of algorithms can assist in establishing the distribution of plant species, as well as in determining areas of endemism where a species can maintain a stable population (Arieira *et al.*, 2018; Beaumont *et al.*, 2005), two different algorithms were used in this investigation to establish the probable distribution of *C. suborbicularis* and *C. flava*, to demonstrate that both species have potentially different geographical distributions, and to explore the possibility of *C. suborbicularis* being an endemic species to the Yucatán peninsula. The results of the analyses to define the geographical areas of distribution of *C. suborbicularis*, compared to those of *C. flava*, showed the former having a more restricted distribution (Figure 5.2); these results, together with the reconstruction of evolutionary trajectories based on the ecological niches of the region (Godoy *et al.*, 2018; Serra-Varela *et al.*, 2015), suggest that *C. suborbicularis* could be considered a native species to the Mayan forest.

## 2.5. CONCLUSIONS

On the basis of the results from this investigation, which integrated data from the chemometric analyses of HPLC chromatographic profiles, with those from the study of morphological characteristics, and from the use of molecular markers of the different *Clusia* spp. it is possible to conclude that *C. suborbicularis* cannot be considered a synonym of *C. flava*, but a different species. The correct identification of these two species, as well as the inventory of their chemical profiles, are important contributions for cataloguing *Clusia* spp. occurring in Yucatán, México, and establish the basis for their protection and future bioprospecting studies.



## CAPÍTULO III

### **<sup>13</sup>C-NMR DEREPLICATION ASSISTED ISOLATION OF NATURAL PRODUCTS: A TWO CASE STUDY IN *Clusia flava* Jacq.**

Luis A. Herbert-Doctor<sup>†</sup>, Antoine Bruguière<sup>‡</sup>, Séverine Derbré<sup>‡</sup>, Pascal Richomme<sup>‡</sup>, and Luis M. Peña-Rodríguez<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup>Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo; C.P. 97205. Mérida, Yucatán, México.

<sup>‡</sup>SONAS, EA921, UNIV Angers, SFR QUASAV, Faculty of Health Sciences, Department of Pharmacy, 49045 Angers, France.

Los resultados descritos en este capítulo forman parte del objetivo 2, descritos en el manuscrito “<sup>13</sup>C-NMR dereplication assisted isolation of natural products: a two case study in *Clusia flava* Jacq.”, sometido a Journal of Natural Products (JNP-MS: np-2021-001372). Autores: Luis A. Herbert-Doctor, Antoine Bruguière, Séverine Derbré, Pascal Richomme, and Luis M. Peña-Rodríguez.

### 3.1. INTRODUCTION

Natural products (NPs) continue to represent an important source of new and better pharmaceuticals (Newman y Cragg, 2016). Presently, it is estimated that approximately 4,000 new NPs are isolated every year (El-Elimat *et al.*, 2013); most of these new NPs are often isolated together with a significantly larger number of already known NPs following complicated, long, and expensive isolation processes (Lang *et al.*, 2008). Because of this, dereplication strategies have been developed to avoid the isolation of already known NPs and to target molecules of interest using simple and quick ways of extraction and/or identification (Gaudêncio y Pereira, 2015). These strategies represent an advantage when carrying out phytochemical studies to reisolate NPs too complex to be obtained commercially via organic synthesis, *e.g.*, the alkaloids vinblastine and vincristine (Sharma *et al.*, 2020), or to identify better sources of known bioactive metabolites, *e.g.*, the pyranoxanones with potential anti-coronavirus activity (Ya-Ching *et al.*, 2005).

The first report of a dereplication analysis used a combination of HPLC analysis and receptor binding results to identify known chemotypes of *Croton cuneatus* Klotzsch (Euphorbiaceae) and *Lyngby majuscula* Harvey (Hubert *et al.*, 2017; Beutler *et al.*, 1990). To date, in addition to biological and chemical methods (Cassiano *et al.*, 2019; Oldoni *et al.*, 2019; Palleros, 1995), a number of chromatographic and spectroscopic methods have been developed and used in the dereplication of NPs (Hubert *et al.*, 2014; Bradshaw *et al.*, 2001); of the different methodologies used, dereplication processes using mass spectrometry (MS) (Carnevale Neto *et al.*, 2016) and/or nuclear magnetic resonance (NMR) (Bruguère *et al.*, 2018) allow to efficiently identify compounds in complex mixtures without purification.

However, one of the main limitations of the dereplication analyses using MS, or combined instrumentation such as LC-UV, LC-MS or GC-MS (Yu *et al.*, 2019; Kildgaard *et al.*, 2017), is that these tools cannot distinguish between stereoisomers (Bradshaw *et al.*, 2001). Recently, however, new dereplication analyses using  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT-135 and DEPT-90 experiments, together with the MixONat free software, have been used to identify the main components in complex extracts or fractions (Bruguère *et al.*, 2020). In this case the analysis is carried out by comparing the experimental  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift values of the sample, with the predicted  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift values of NPs contained in an

appropriate database (DB) (Sientzoff *et al.*, 2015; Hubert *et al.*, 2014). Final confirmation about the presence of a given natural product in a particular extract or fraction comes from comparing the experimental  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift values with those previously reported in the literature. The  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication analysis has been recently used to identify poppy (*Papaver somniferum* L., Papaveraceae) alkaloids, terpenes and polyphenols in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae) extracts (Bruguière *et al.*, 2020), as well as xanthenes and polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols in *Garcinia bancana* Miq. (Clusiaceae) (Bruguière *et al.*, 2018).

One of the most important genus of the Clusiaceae family, in terms of its biodiversity (300-400 species) and its production of NPs (terpenoids, flavonoids, xanthenes, biphenyls, dihydrophenanthrenes and prenylated benzophenones), is the genus *Clusia* (Ribeiro *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2014; Delle Monache *et al.*, 2002; Cuesta-Rubio *et al.*, 2001). A number of *Clusia* spp. are widely used in traditional medicine (Sanz-Biset y Cañigueral, 2011; Barbosa y Pinto, 2003) and their biological activity has been correlated to their content of polyphenolic natural products (Ferreira *et al.*, 2014, 2016; Oliveira *et al.*, 2012). However, to date, the phytochemical knowledge and the biological activity of *Clusia* spp. such as *Clusia flava* Jacq., is still limited. While the phytochemistry of *C. flava* includes reports of terpenes, sesquiterpenes and tocopherols (Jetter y Riederer, 2016; Nogueira *et al.*, 2001), its reported biological activity only includes an antiprotozoal and acaricidal effect against *Leishmania mexicana* and *Rhipicephalus microplus*, respectively (Rosado-Aguilar *et al.*, 2009; Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

Recently, as a part of a project directed towards investigating *Clusia* spp. occurring in the Yucatán peninsula as potential sources of novel bioactive metabolites, we have used a  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication process to isolate and identify trapezifolixanthone and paralycolin A (**1**) from the polyphenolic-rich stem bark extract of *C. flava*. The complete and correct assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data for **1** is reported here for the first time.

## 3.2. EXPERIMENTAL SECTION

### 3.2.1. General Experimental Procedures

Proton and carbon NMR spectra as well as DEPT-135 and DEPT-90 were recorded at 298 K using either a JEOL 400 MHz YH spectrometer (JEOL Europe, Croissy-sur-Seine) equipped with an inverse 5 mm probe (ROYAL RO5) or a Varian/Agilent 600 MHz spectrometer (AR Premium COMPACT). GC-MS analyses were carried out on an Agilent 7890b chromatograph, connected to an Agilent 5977a mass detector; separations were carried out using an Agilent HP-5ms column (30 m × 0.32 mm, 0.50 μm film thickness; stationary phase 5%-phenyl-methylpolysiloxane) using the following conditions: manual injection (3 μL); carrier gas: N<sub>2</sub>; flow rate 1.0 mL/min. Oven temperature program: 110 °C (2min), 15 min 260 °C, (3 min), 2 min 280 °C (10 min). HPLC-UV analyses were carried out using a Waters e2695 chromatography system, connected to a Waters 2998 PDA detector. Separations were carried out on an Eclipse XDB-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), using a gradient elution program with mixtures of MeOH (A) and water-formic acid, pH 5 (B): 0-25 min, 10% A; 25-44 min, 75% A; 44-50 min, 100% A; 50-60 min, 10% A. Flash column chromatography purifications were carried out using a CombiFlash Rf-200 system (Teledyne Isco, Lincoln, NE) or glass columns packed with silica gel (E.M. Merck) 200-400 mesh. Open column chromatography purifications were carried out using silica gel (Sigma-Aldrich) 70-230 mesh. Analytical thin layer chromatography (TLC) was carried out using aluminum-backed silica gel plates (Merck, 0.2 mm); chromatograms were visualized using a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of 5% sulfuric acid followed by drying and heating. Preparative TLC (prep TLC) was carried out using glass-coated 20 x 20 cm silica gel plates (Merck, 0.25 mm).

### 3.2.2. Database of Natural Products for Dereplication

The data base (DB) of natural products (NpDB) containing the experimental <sup>1</sup>H ( $\delta_H$ ) and <sup>13</sup>C ( $\delta_C$ ) chemical shifts of 32854 NPs was prepared as previously described from the data available on the dedicated JEOL RESONANCE Inc. website (Bruguère *et al.*, 2020), available at <https://www.j-resonance.com/en/nmrdb/>. Additionally, DBs containing the

predicted  $\delta_c$  values of NPs isolated from species belonging to the *Clusia* (CDB) and *Calophyllum* (CaDB) genera were prepared by including the 166 and 307 metabolites described from *Clusia* and *Calophyllum* genera, respectively, in the SciFinder® website (Bruguière *et al.*, 2018). The C-typeGen program included in the MixONat software created then a DB, in the format required by MixONat (Bruguière *et al.*, 2020), containing the predicted  $\delta_c$  values for the methyl, methylene, methine, and quaternary carbons of each metabolite.

### 3.2.3. $^{13}\text{C}$ -NMR Dereplication Assisted Isolation

Dereplication analyses were carried out using the MixONat software available at <https://sourceforge.net/projects/mixonat/>. A small amount (15 mg) of fractions **B1-23** was dissolved in deuterated chloroform or methanol- $d_4$  (600  $\mu\text{L}$ ). A WALTZ-16 decoupling sequence was used to obtain  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) spectra, with an acquisition time of 1.04 s (32768 data points) and a relaxation delay of 2 s. Twelve thousand scans were collected to obtain a satisfactory S/N ratio. The spectral width was 250 ppm. A 1 Hz exponential 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, Santiago de Compostela, Spain) and referenced on the central resonance of the deuterated solvent. For DEPT-135 and DEPT-90 experiments, 6,000 scans were required for 15 mg of extract and alignment of the  $^{13}\text{C}$  spectrum was carried out using a selected  $\delta_c$ . A minimum intensity threshold was then used to automatically collect positive  $^{13}\text{C}$ -NMR and DEPT-90 signals and positive and negative DEPT-135 signals, while avoiding potential noise artifacts. The peak list and intensity data obtained from each spectrum were exported as a .csv file using Excel Microsoft Office (Microsoft, Redmond, WA) software and used as an input file in MixONat software. The software sorted data from metabolites contained in the DB (NpDB, CDB or CaDB) and assigned a score between 1 and 0, depending on the number of matching experimental/predicted  $\delta_c$  values for each metabolite contained in the DB. The presence of the predicted NPs was confirmed by comparing the experimental  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift values with those reported in the literature, with a displacement tolerance range of  $\pm 0.4$  ppm.



### 3.2.4. Plant Material

Leaves and stems of *C. flava* were collected in the locality of Punta Laguna, Quintana Roo, México. The plants were identified by Prof. Barry E. Hammel of Missouri Botanical Garden (MO), and registered with specimen numbers CICY-70894/70895/70896/70897 at the herbarium of Centro de Investigación Científica de Yucatán.

### 3.2.5. Extraction and Isolation

The stems of the plant were barked with a conventional peeler and dried in oven at 60 °C for three days. The dried bark was ground in mortar and 380 g of the ground material was macerated three times (24 h) with ethanol (EtOH, 100 g/L) at room temperature. The solvent was filtered through Whatman No. 1 filter paper and evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator (Büchi R-300) coupled to vacuum controller (Büchi V-800), to give 60 g of organic crude extract. The extract was suspended in a 2:3 (v/v) mixture of MeOH and water (1 g/10 mL) and the resulting aqueous suspension was partitioned successively with *n*-hexane (three times, 2:1, v/v), EtOAc (three times, 2:1, v/v) and BuOH (once, 1:1, v/v). Evaporation of the corresponding solvents yielded the low (**A**, 10 g), medium (**B**, 30 g) and high (**C**, 5 g) polarity fractions. A portion (10 g) of the medium polarity fraction **B** was adsorbed on silica gel (E.M., Merck, 200/400 mesh, 1:2 w/w) and subjected to flash chromatography column (Chromabond, 16 cm × 6 cm) eluting (flow rate: 50 mL/min) with a gradient program (0-10 min, 100% A; 10-50 min, 5% B; 50-110 min, 10% B; 110-170 min, 100% B; 170-240 min, 80% B and 20% C) of *n*-hexane (A) EtOAc (B) and MeOH (C), to obtain semipurified fractions **B1-23** (recovery yield 82.5%). Fraction **B5** (332 mg) was subjected to additional flash chromatography purification column (Chromabond, 11.6 cm × 21.2 mm) eluting (flow rate: 15 mL/min) with a gradient program (0-30 min, 100% A; 30-45.5 min, 50% B; 45.5-50 min, 52.2% B; 50-60 min, 61.2% B; 60-67.9 min, 86.8% B; 67.9-72.9 min, 100% B) of *n*-hexane (A) and EtOAc (B), to obtain fractions **B24a-c** (recovery yield 50%). Gel permeation chromatography purification of fraction **B24b** (90 mg), using a Sephadex-LH20 (GE, Healthcare) column (60 × 1.5 cm) and eluting with a mixture of *n*-hexane/chloroform/MeOH (40:20:20, v/v) yielded fractions **B25a-h** (recovery yield 90%). Finally, fractions **B25g** and **h** were combined (18 mg) and subjected to silica gel (E.M. Merck, 70-230 mesh) open column (30 × 1 cm) chromatography purification, eluting with 95:5 (v/v) *n*-hexane/EtOAc, to produce fraction

**B27a** (14 mg) (recovery yield 90%), identified as trapezifolixanthone. Similarly, purification of the **B11** fraction (246 mg) by flash column (60 cm × 1.5 cm) chromatography eluting (flow rate: ca. 15 mL/min) with mixtures of *n*-hexane/EtOAc/MeOH of increasing polarity to obtain semipurified fractions **B28a-i** (recovery yield 59%). Fractions **B28b-d** were combined (**B29**, 92 mg) and purified by gel (Sephadex-LH20, GE, Healthcare) permeation column (60 × 1.5 cm) chromatography, eluting with a mixture of *n*-hexane/chloroform/MeOH (40:20:20, v/v) to yield fractions **B30a-c** (recovery yield 60%). Re-purification of fraction **B30c** (28 mg) by gel permeation, eluting with MeOH, produced fractions **B31a-e** (recovery yield 23%). Finally, preparative TLC of fraction **B31c**, eluting with a mixture of chloroform/MeOH (95:5, v/v), yielded fractions **B32c/d** (4 mg) having a single component, identified as paralycolin A (**1**).

**Trapezifolixanthone**:  $R_f$  0.50 (80:20 *n*-hexane/EtOAc); UV (PDA, H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pH 5)  $\lambda_{max}$  232.1, 290.3 and 710.0 nm; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR: see Table 1. GC-MS:  $t_R$  19.99 min;  $m/z$  378.4.

**Paralycolin A (1)**:  $R_f$  0.4 (95:5 chloroform/MeOH); <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR: see Table 2.

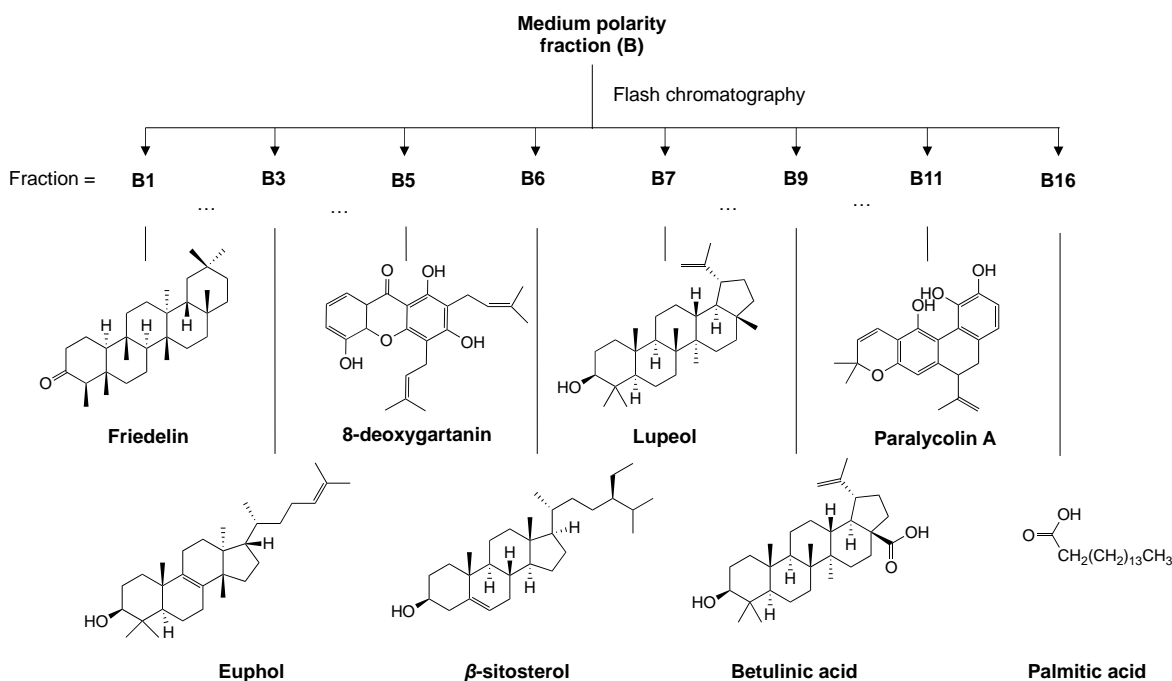
For dereplication results, NMR spectra and GC-MS data see supporting information (Annex 2).

### 3.3. RESULTS AND DISCUSSION

Initial fractionation of the crude bark extract, using a liquid-liquid partition procedure with hexane, ethyl acetate, and butanol, yielded the corresponding low (**A**), medium (**B**) and high polarity (**C**) fractions. Flash column chromatography purification of fraction **B** produced twenty three semipurified fractions (**B1-23**) which were subjected to a <sup>13</sup>C-NMR dereplication process, using a database containing predicted <sup>13</sup>C-NMR chemical shift ( $\delta_C$ ) values of NPs previously isolated from *Clusia* spp. (C/DB) (Bruguière *et al.*, 2018). The dereplication software MixONat (Bruguière *et al.*, 2020) was used to compare the experimental <sup>13</sup>C-NMR chemical shift values from the semipurified fractions **B1-23** with those contained in the C/DB database, using the tolerance value of ± 1.3 ppm recommended for algorithms used to predict NPs in complex samples (Bruguière *et al.*, 2018).

On the basis of the score calculated from the matching  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift values (experimental vs theoretical), the  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication process predicted triterpenes in the first 25 results, of these euphol (30/30 matching carbons, score 1.0) and  $\beta$ -sitosterol (29/29 matching carbons, score 1.0) (Nyigo *et al.*, 2016; Jan-Michael y Ragasa, 2004), were confirmed in fractions **B3** and **B6**, respectively, by comparing their  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift data with those reported in the literature (Table 6.3, S1, annex 2). Similarly, friedelin (26/30 matching carbons, score 0.87), betulinic acid (22/30 matching carbons, score 0.73), and palmitic acid (14/16 matching carbons, score 0.87) were identified in fractions **B1**, **B9**, **B16**, respectively (Figure 3.1) (Tesemma *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2012; Pohjala *et al.*, 2009).

When the predicted composition of a given fraction, *e.g.*, fraction **B7**, did not coincide with the  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift values reported in the literature for the predicted component(s), a second dereplication analysis using additional databases (*e.g.*, a general NPs database, NpDB) could be used to improve prediction. This strategy allowed the identification of lupeol (27/30 matching carbons in NpDB, score 0.90) in fraction **B7** (Figure 3.1) (Silva *et al.*, 2018). These dereplication results were further confirmed when lupeol and betulinic acid were isolated in pure form from the corresponding fractions (see Supplementary Information for purification details) (Annex 2).

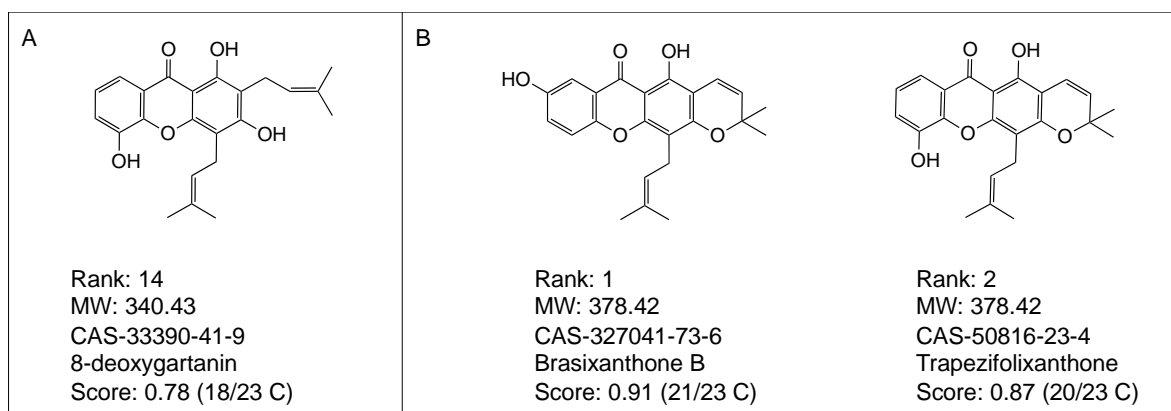


**Figure 3.1**  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication results obtained after the first analysis using C/DB database. Natural products predicted in fractions obtained from purification of the medium polarity fraction (B) of the bark extract of *C. flava*.

A similar dereplication analysis of fraction **B5** predicted the presence of alkanes (rank 1-3), fatty acids (rank 4-8 and 12-13), triterpenes (rank 9-11) and the xanthone 8-deoxygartanin (rank 14), when using the C/DB database (Figure 3.2A) (Table 6.4 S2, Annex 2). However, the experimental  $^{13}\text{C}$ -NMR data did not fully coincide with those reported in the literature for 8-deoxygartanin, isolated from *Garcinia mangostana* L. (Clusiaceae) (Table 3.1) (Groveiss *et al.*, 2000; Govindachari *et al.*, 1971). A second  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication analysis of fraction **B5**, using a *Calophyllum* spp. database (CaDB) containing  $\delta_{\text{C}}$  values for a larger number of xanthenes, predicted the presence of brasixanthone B (ranked 1, score 0.91) and its isomer trapezifolixanthone (TPX, ranked 2, score 0.87) in fraction **B5** (Figure 3.2B). However, comparing the experimental  $\delta_{\text{C}}$  values of both NPs with those reported in the literature (Table 3.1) (Tanjung *et al.*, 2018; Qing-fei *et al.*, 2012) allowed the identification of TPX as the xanthone present in fraction **B5**. These results were confirmed when the purification of fraction **B5** led to isolation of a bright yellow product whose NMR data showed the characteristic signals of a pyrano-prenylated xanthone (Daud *et al.*, 2016; Ai-Jun *et al.*, 2001), including a fully substituted aromatic A ring and a 1,2,3-trisubstituted

aromatic B ring. A detailed analysis of the spectroscopic data of the purified metabolite allowed its identification as TPX (Figure 3.4), a xanthone first reported from *Calophyllum trapezifolium* Thw. (Somanathan y Sultanbawa, 1974) and also isolated from other *Calophyllum* spp. (Gómez-Verjan *et al.*, 2017; Dharmaratne y Wanigasekera, 1996; Dharmaratne *et al.*, 1986) in addition to *Tovomita brevistaminea* Engl. (Seo *et al.*, 1999), *Mesua hexapetala* (Hook. f.) P.S. Ashton (Karunakaran *et al.*, 2016) and *Cratoxylum sumatranum* ssp. *neriifolium* (Kurz) Gogelein (Tantapakul *et al.*, 2016).

To date, only six xanthones have been isolated from *Clusia* spp., including clusone from *C. insignis* Mart. (Ishiguro *et al.*, 1998), veratrilogenin from *C. parvicola* G. Mariz (Delle Monache *et al.*, 2002), 8-deoxygartanin from *C. nemorosa* G. Mey. (De Oliveira *et al.*, 1999), clusioxanthone from *C. pernambucensis* G. Mariz (Silva *et al.*, 2013), and 6-deoxyisojacareubin and padiaxanthone from *C. burle-marxii* Bittrich (Ribeiro *et al.*, 2019). This is the first report of the isolation of TPX in the *Clusia* genus.



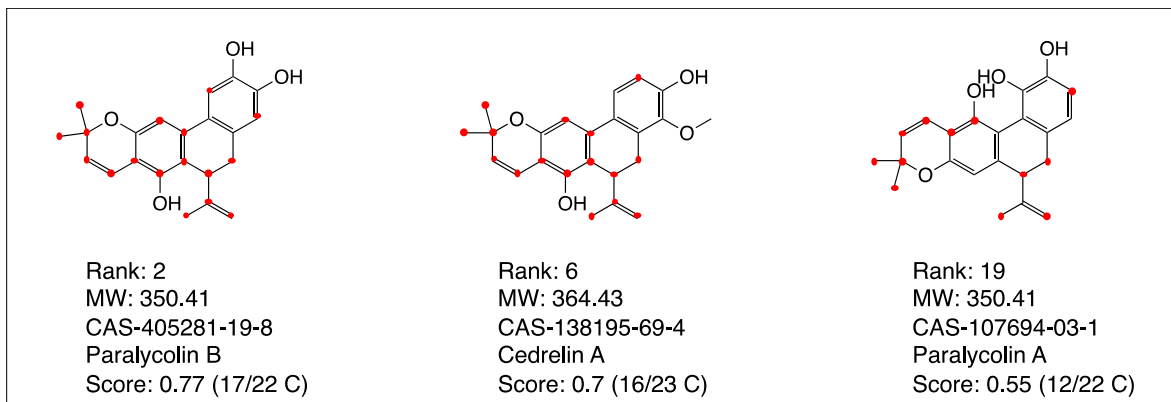
**Figure 3.2** Results for the  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication analysis of fraction **B5** when using *C*DB (A) and *Ca*DB (B), respectively. Matching carbons indicated by red dots.

**Table 3.1**  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) data comparing experimental results of fraction **B5** (150 MHz), reported data for 8-deoxygartanin (125 MHz), brasixanthone B (125 MHz) and trapezifolixanthone (100 MHz).

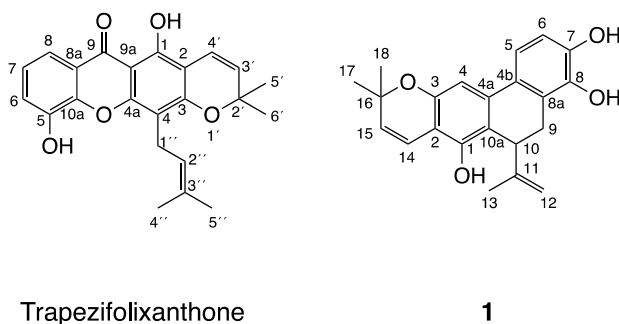
	Experimental	8-deoxygartanin (Groveiss <i>et al.</i> , 2000)	brasixanthone B (Qing-fei <i>et al.</i> , 2012)	trapezifolixanthone (Tanjung <i>et al.</i> , 2018)
Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	156.0	158.7	155.0	156.1
<b>2</b>	104.7	109.1	104.0	104.9
<b>3</b>	158.2	160.9	158.2	158.4
<b>4</b>	107.0	105.4	107.3	107.2
<b>5</b>	144.4	144.2	118.8	144.6
<b>6</b>	119.7	119.7	124.4	119.9
<b>7</b>	123.9	123.8	153.4	124.1
<b>8</b>	116.8	116.9	108.1	116.9
<b>9</b>	181.0	181.1	181.2	181.1
<b>4a</b>	153.7	152.4	154.5	153.0
<b>8a</b>	120.9	120.9	120.5	121.0
<b>9a</b>	103.3	103.3	103.1	103.4

<b>10a</b>	144.2	144.3	150.0	144.3
<b>2'</b>	78.3	136.3	78.0	78.45
<b>3'</b>	127.5	121.2	127.4	127.0
<b>4'</b>	115.7	22.1	114.5	115.8
<b>5'</b>	28.3	18.0	28.2	28.4
<b>6'</b>	28.3	25.7	28.2	28.1
<b>1''</b>	21.7	21.6	21.3	21.8
<b>2''</b>	122.7	122.2	122.0	122.8
<b>3''</b>	131.6	133.5	131.4	131.7
<b>4''</b>	25.6	25.9	25.6	25.8
<b>5''</b>	17.9	18.0	17.8	18.1

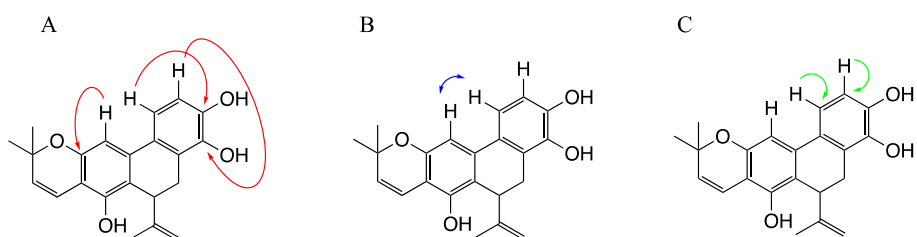
Finally, the dereplication analysis of fraction **B11** using the *CDB* predicted the presence of the biphenyl derivatives paralycolin B (rank 2, score 0.77), cedrelin A (rank 6, score 0.7), and paralycolin A (rank 19, score 0.55) (Figure 3.3) (Table 6.5 S3, Annex 2). However, the experimental  $\delta_c$  values did not fully coincide with those reported for the different metabolites in the literature (Table 3.2) (Delle Monache *et al.*, 2002; Ezaki *et al.*, 1991; Delle Monache, 1987). Purification of fraction **B11** yielded a pure product which, after analysis of its spectroscopic data, was identified as 2H-pyran[2,3:5,6]-1,7,8-trihydroxy-9,10-dihydrophenanthrene, a metabolite previously isolated from *C. paralicola* and designated with the common name paralycolin A (**1**) (Delle Monache *et al.*, 1987). Since the original, incorrect, structure of paralycolin A was recently revised without providing adequate spectroscopic evidence (Delle Monache *et al.*, 2002), a detailed analysis of the HMBC and NOESY experiments of **1** (Figure 3.5) allowed to correctly establish the orientation of the pyran ring and the syn-periplanar-arrangement between the aromatic protons at positions 4 and 5 in the correct final structure of **1** (Figure 3.4). It is important to comment that even though the originally proposed structure of paralycolin A was revised, its CAS registry number (CAS-107694-03-1), together with its  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ -NMR chemical shift values, remain unchanged; since the *CDB* database was prepared using the incorrect structure of paralycolin A, it is not surprising that the dereplication analyses did not result in a perfect match. This is the first report of paralycolin A (**1**) as a metabolite from *C. flava* and the first listing of its correct NMR data (Table 3.2).



**Figure 3.3** Results for the  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication analysis of fraction **B11** using C/DB. Matching carbons are indicated by red dots.



**Figure 3.4** Chemical structures of trapezifolixanthone and paralycolin A (**1**).



**Figure 3.5** Key HMBC (A), NOESY (B) and HSQC (C) correlations observed for paralycolin A (**1**).



**Table 3.2** Experimental (400 MHz for  $^1\text{H}$ ; 100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) and reported (60 MHz for  $^1\text{H}$ ; 25.2 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for paralycolin A (**1**).

Position	Paralycolin A (Delle Monache <i>et al.</i> , 1987)		Paralycolin A ( <b>1</b> )			
	$\delta_{\text{C}}$ , type	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , type	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	HMBC	NOESY
1	104.5, C	6.90 (s)	149.2, C			
2	152.1, C		109.1, C			
3	109.1, C		152.7, C			
4	148.8, C		104.6, CH	6.85, s	2	5
5	141.2, C		116.3, CH	7.13, d (8.3)	7	4, 6
6	146.6, C		113.2, CH	6.73, d (8.4)	8	5
7	113.2, CH	7.13 (d, 8.5)	142.5, C			
8	116.3, CH	6.70, d (8.5)	141.3, C			
9	25.4, $\text{CH}_2$	3.37, dd (16, 2) 2.75, dd (16, 6.5)	25.6, $\text{CH}_2$	3.35, dd (15.8, 2.2) 2.81, dd (16.2, 7)		
10	38.4, CH	3.70, dd (6.5, 2)	38.8, CH	3.70, dd (7, 2)		
11	142.9, C		146.9, C			
12	112.4, $\text{CH}_2$	4.70, s	112.6, $\text{CH}_2$	4.63, s		

		4.60, s		4.73, s		
13	20.4, CH <sub>3</sub>	1.60, s	20.5, CH <sub>3</sub>	1.42, s		
14	129.1, CH	6.70, d	116.7, CH	6.65, d (9.8)		
15	116.6, CH	5.60, d	129.2, CH	5.61, d (9.9)		
16	76.1, C		75.9, C			
17	27.4, CH <sub>3</sub>	1.43, s	28.2, CH <sub>3</sub>	1.48, s		
18	27.4, CH <sub>3</sub>	1.34, s	27.7, CH <sub>3</sub>	1.65, s		
4a	116.0, C		135.4, C			
4b	121.8, C		127.4, C			
8a	127.8, C		128.3, C			
10a	135.4, C		121.6, C			

While the isolation of trapezifolixanthone and paralycolin A (**1**) contribute to the phytochemical knowledge for *C. flava* and establishes the basis for future bioprospecting studies of *Clusia* spp. in the Yucatán peninsula, the results obtained demonstrate that the <sup>13</sup>C-NMR dereplication assisted isolation using the MixONat analytical software represents an important strategy to identify natural products present in complex samples, with a high level of reliability.

### 3.4. CONCLUSIONS

The results obtained demonstrate that the <sup>13</sup>C-NMR dereplication assisted isolation of bioactive metabolites using the MixONat analytical software represents an important strategy to quickly identify natural products present in complex samples, with a high level of reliability. Additionally, the isolation of trapezifolixanthone and paralycolin A (**1**) contributes to the phytochemical knowledge for *C. flava* and establishes the basis for future bioprospecting studies of *Clusia* spp. in the Yucatán peninsula.

## CAPÍTULO IV

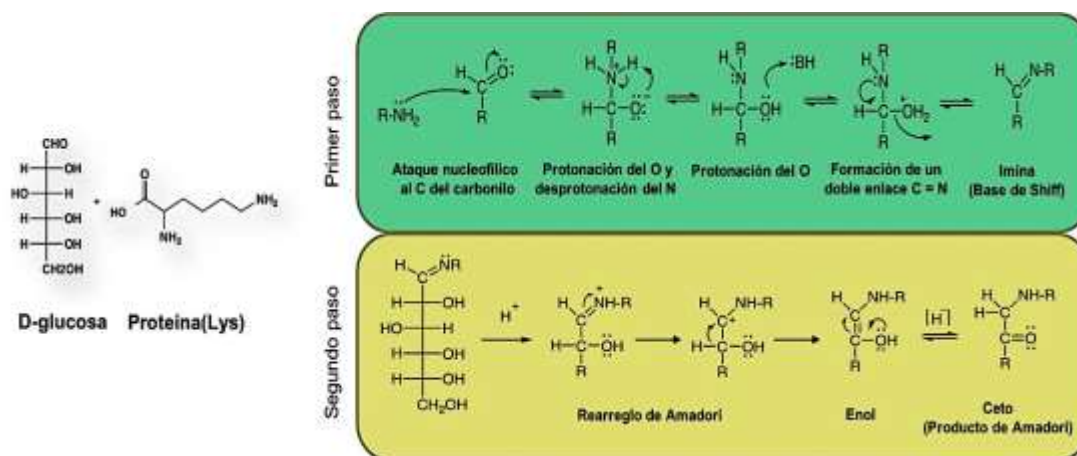
### ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *Clusia flava* Jacq.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las actividades biológicas de los MS de *Clusia* spp. son principalmente de tipo citotóxica, bactericida, antiinflamatoria, antioxidante y anti-AGEs (Khangholi *et al.*, 2015; Derbré *et al.*, 2010). Actualmente las actividades anti-AGEs y antioxidante son de gran interés, tomando en cuenta el número de enfermedades relacionadas con los procesos de glicación avanzada (AGEs) y el estrés oxidativo.

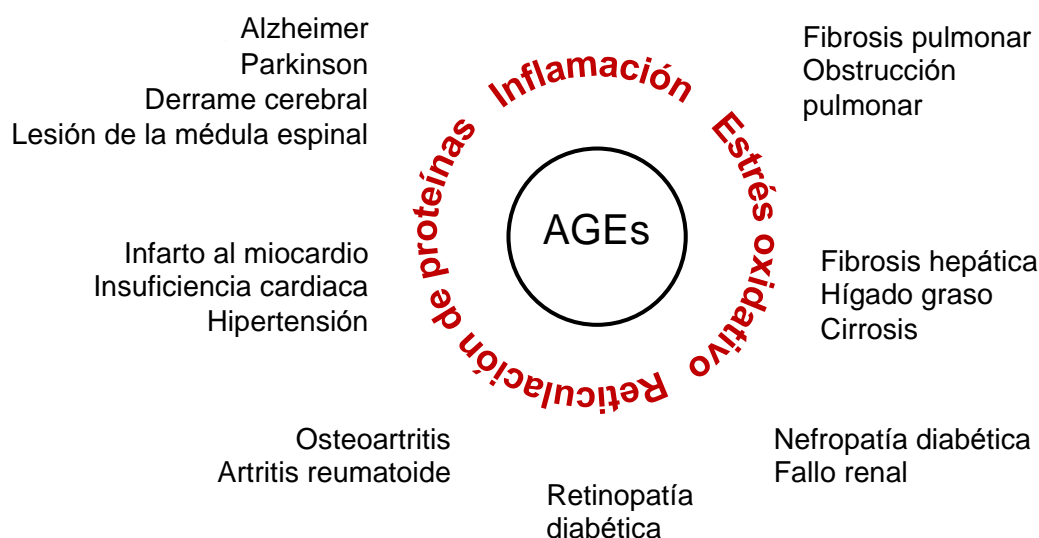
La glicación, también llamada reacción de Maillard, es una reacción no enzimática donde interviene el grupo carbonilo de un monosacárido (cetosa o aldosa) y un grupo amino libre, como el de los aminoácidos arginina o lisina, proteínas, enzimas o ácidos nucleicos (Byun *et al.*, 2017). La reacción de Maillard puede dividirse en tres etapas: (1) la formación de una base de Schiff, (2) el reordenamiento de Amadori sobre la base de Schiff y (3) la formación de aductos entre el producto de Amadori y otras moléculas (Figura 4.1); esta unión forma moléculas incoloras, coloridas o fluorescentes mediante reacciones de oxidación, deshidratación y/o condensación (Ansari y Dash, 2013; Séro *et al.*, 2013; Reddy y Beyaz, 2006; Isbell y Frush, 1958).

Los resultados descritos en este capítulo forman parte del objetivo 2.



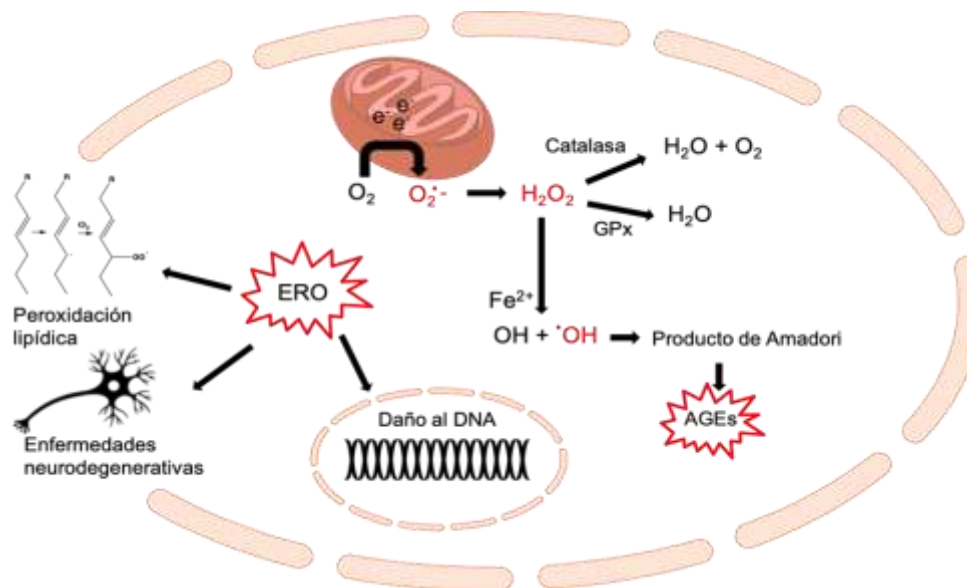
**Figura 0.1** Mecanismo inicial en la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs).

Los AGEs están involucrados en la inactivación de proteínas, daño cerebral, cáncer, trastornos cardiovasculares e inflamatorios, esclerosis lateral amiotrófica y estrés oxidativo, etc. (Byun *et al.*, 2017; Ferchichi *et al.*, 2012; Abe *et al.*, 2004; Takeuchi y Yamagishi, 2004) (Figura 4.2). Entre los compuestos que se han investigado con capacidad de inhibir los AGEs, están la aminoguanidina, piridoxamina, alagebrium (ALT-711), tenilsetam, etc. Sin embargo, se han reportado efectos secundarios, principalmente en pacientes diabéticos, debido al secuestro de piridoxal, que a su vez produce deficiencia de vitamina B6 (Nagai *et al.*, 2012; Reddy y Beyaz, 2006).



**Figura 0.2** Trastornos relacionados con la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs). Imagen adaptada de Byun *et al.*, (2017).

Por otro lado, el estrés oxidativo es un trastorno metabólico que ocurre cuando existe un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el sistema antioxidante celular (Othman y Yabe, 2015) (Figura 4.3). Las ERO se generan durante la respiración celular y el metabolismo o por efecto de factores abióticos; las ERO se pueden dividir en radicales libres y en no radicales u oxidantes. Tanto los radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), y los ERO oxidantes como oxígeno singlete y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) participan en procesos fisiológicos, *e.g.*, en la defensa ante patógenos y la traducción de señales. Sin embargo, cuando las concentraciones de ERO se producen en gran cantidad contribuyen a la generación de patologías como el desarrollo de cáncer, desórdenes neurodegenerativos, fibrosis pulmonar, asma, diabetes, reticulación de proteínas, generación de AGEs, inflamación, daño a tejidos, lipoperoxidación, muerte celular programada, entre otros (Dasgupta y Klein, 2014a; Betteridge, 2000). La concentración de ERO es regulada por antioxidantes endógenos de tipo enzimáticos como la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peróxidasa (GPx) y por antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) y otros metabolitos secundarios como carotenoides, y/o flavonoides que se adquieren a través de la dieta y/o de nutraceuticos elaborados a partir de distintas plantas (Dasgupta y Klein, 2014b; Birben *et al.*, 2012; Lobo *et al.*, 2010).



**Figura 0.3** Generación de ERO y su implicación en diferentes enfermedades. Imagen adaptada de Othman y Yabe (2015).

Como se mencionó en capítulos previos, *Clusia* L. es una fuente de metabolitos secundarios con actividad antioxidante y anti-AGEs, sin embargo, aunque este género es uno de los más importantes en México en cuanto a número de especies se refiere (Villaseñor, 2004); la información fitoquímica y la actividad biológica de las especies *C. flava*, *C. rosea*, *C. lundellii* y *C. suborbicularis*, presentes en la península de Yucatán es limitada. De acuerdo con esto, en este capítulo se aborda la determinación de las actividades anti-AGEs y antioxidante, en extractos y metabolitos secundarios obtenidos de *C. flava*, tomando en cuenta la importancia actual que representan los procesos de glicación avanzada (AGEs) y el estrés oxidativo en la generación de enfermedades.

## 4.2. MATERIALES y MÉTODOS

### 4.2.1. Evaluación de la Actividad Antioxidante por Reducción del Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

**Método cualitativo:** Los perfiles cromatográficos de los extractos y de las fracciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada (CCD). Se utilizaron placas cromatográficas de gel de sílice (60 F<sub>254</sub>, 0.2 mm, E.M. Merck) y una fase móvil compuesta por hexano y acetato de etilo: *n*-Hex/AcOEt (80:20). Los extractos y fracciones

fueron aplicados a una concentración de 1%. Como control positivo se utilizó ácido ascórbico al 0.1%. Para observar la actividad antioxidante, las placas cromatográficas se rociaron con una disolución de DPPH en metanol (MeOH) a una concentración de 0.2% (Sánchez-Medina *et al.*, 2001).

**Método cuantitativo:** Se realizó siguiendo el método reportado por Hernández-Bolio *et al.* (2018). Tanto los extractos como las diferentes fracciones se resuspendieron en MeOH (1 mg/mL) y se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mg/mL. La cuantificación se llevó a cabo en microplacas de ELISA de 96 pozos, colocando 200  $\mu$ L de cada dilución y 180  $\mu$ L de disolución de DPPH en MeOH (25  $\mu$ M). Como controles positivos se utilizaron ácido ascórbico y un extracto etanólico de *Acmella pilosa* R.K. Jansen (Zapata-Estrella *et al.*, 2014) y como control negativo se utilizó MeOH. El ensayo se realizó a temperatura ambiente protegido de la luz, durante 30 min.

Posteriormente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de ELISA a una longitud de onda de 517 nm. Para la obtención de la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ), se determinó el porcentaje de decoloración para cada una de las concentraciones ensayadas (Fórmula 1). Los datos obtenidos fueron analizados mediante una regresión lineal, utilizando la ecuación de la recta (Fórmula 2).

$$\% \text{ decoloracion} = \frac{(1 - (\text{absorbancia de la muestra}))}{\text{absorbancia del blanco}} \times 100 \quad (1)$$

$$EC_{50} = y = mx + b \quad (2)$$

La actividad antioxidante se reportó como moderada ( $CE_{50} \leq$  de 90  $\mu$ g/mL), baja ( $CE_{50} \leq$  150  $\mu$ g/mL) y nula ( $CE_{50} >$  150  $\mu$ g/mL), de acuerdo con el control positivo de ácido ascórbico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Prisma 7.0a (GraphPad). Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar (S.E.). Se realizó un análisis ANOVA, seguido por las pruebas estadísticas de Dunnett y/o Tukey. Se consideró como una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de  $p$  fue inferior a 0.05.

#### 4.2.2. Determinación de la Actividad Anti-AGEs

La actividad anti-AGEs se evaluó en el Laboratorio SONAS de la Universidad de Angers en Francia, siguiendo el procedimiento reportado por Derbré (2010). Tanto los extractos como las fracciones a ensayar fueron resuspendidos en DMSO (10 mg/mL) y diluidos para obtener concentraciones de 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 y 0.01 mg/mL usando una estación de trabajo automatizada Freedom Evo 100 Liquid (Tecan-Lyon). Previamente se preparó una disolución A compuesta por suero fetal bovino (BSA) (10 mg/mL) y D-ribosa (0.5 M) en buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) y una disolución B compuesta por BSA en buffer de fosfatos. El ensayo se realizó en microplacas de ELISA de 96 pozos con fondo negro y cubiertas (Corning Costar, Fisher Scientific). Para cada muestra y concentración a ensayar la mezcla de reacción consistió de 10  $\mu$ L de la muestra y 90  $\mu$ L de la disolución A, así como un duplicado que contenía la muestra y la disolución B. Adicionalmente, se colocó un control para la formación de AGEs (disolución A) y un blanco de reacción (disolución B); así como un control positivo para la inhibición de AGEs (aminoguanidina). El ensayo se llevó a cabo tras 24 h de incubación a 37 °C, posteriormente se midió la fluorescencia (*if*) de tipo vesperlisina ( $\lambda_{exc}$  370 nm;  $\lambda_{em}$  440 nm) y pentosidina ( $\lambda_{exc}$  335 nm;  $\lambda_{em}$  385 nm) usando un espectrofluorómetro Infinite M200 (Tecan-Lyon) y el software Magellan (Tecan).

El porcentaje de inhibición de los AGEs se determinó utilizando la fórmula 3.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{[if(\text{BSA}+\text{glucosa}+\text{muestra})-if(\text{BSA}+\text{muestra})]}{[if(\text{BSA}+\text{glucosa})-if(\text{BSA})]} \times 100 \quad (3)$$

Las curvas de dosis y efecto resultantes de la medición de la fluorescencia de tipo vesperlisina y pentosidina se ajustaron con una ecuación de dosis-respuesta sigmoideal utilizando el software Sigma Plot 12.0 que permitió el cálculo de los valores de  $CI_{50}$  (Séro *et al.*, 2013). Valores de  $CI_{50} \geq 1$  mg/mL fueron considerados como inactivos, mientras que valores  $CI_{50} \leq 0.13$  mg/mL para el caso de extractos y de  $\leq 1.5$  mM para moléculas puras fueron considerados como activos y moderadamente activos, respectivamente; de acuerdo con el control positivo aminoguanidina.



### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Actividad Biológica de Extractos, Fracciones y Metabolitos Secundarios Obtenidos de la Corteza de *C. flava*

Los extractos de hoja y corteza, fracciones y metabolitos puros obtenidos de la corteza de *C. flava* (capítulo III), fueron evaluados para determinar su actividad anti-AGEs y antioxidante.

El extracto, tanto de hoja como de corteza del individuo PL-1, colectado en Punta Laguna Quintana Roo., mostró una concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) antioxidante, equiparable al control positivo (ácido ascórbico) de acuerdo con la prueba estadística de Dunnett (Tabla 4.1). El resto de los extractos mostraron valores por debajo de la  $EC_{50}$  obtenida para el extracto de *A. pilosa*, que fue utilizado como un segundo control positivo debido a su actividad antioxidante relacionada con la presencia de ácido rosmarínico (Tabla 4.1).

**Tabla 0.1** Concentración efectiva media correspondiente a la actividad antioxidante de los extractos de hoja y corteza de *C. flava*. Material colectado en PL: Punta Laguna; TX: Tixcacalcupul; XN: Xocén.

Extracto	* $EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) de hoja	* $EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) de corteza
PL-1	91 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	79 $\pm$ 9.5 <sup>b</sup>
PL-2	223 $\pm$ 6.0 <sup>a</sup>	290 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>
PL-3	132 $\pm$ 23.8 <sup>a</sup>	118 $\pm$ 12.8 <sup>a</sup>
PL-4	235 $\pm$ 10.0 <sup>a</sup>	141 $\pm$ 11.6 <sup>a</sup>
TX-5	157 $\pm$ 12.0 <sup>a</sup>	229 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>
TX-6	154 $\pm$ 17.3 <sup>a</sup>	655 $\pm$ 22.0 <sup>a</sup>
XN-7	156 $\pm$ 20.2 <sup>a</sup>	321 $\pm$ 15.9 <sup>a</sup>
XN-8	112 $\pm$ 10.1 <sup>a</sup>	189 $\pm$ 14.7 <sup>a</sup>
<i>Acmella pilosa</i>	287 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	287 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
Ácido ascórbico	54 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>	48 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>

\*Los valores de  $EC_{50}$  con letra diferente representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Dunnett con una  $p < 0.05$ .

Los extractos PL-1, PL-3 y PL-4 se agruparon, y el extracto resultante se fraccionó mediante una partición líquido-líquido (capítulo III). La correspondiente fracción de mediana polaridad, obtenida con acetato de etilo (**B**) presentó una alta actividad antioxidante ( $EC_{50}$  de 61  $\mu\text{g/mL}$ ) y una alta actividad anti-AGEs ( $IC_{50}$  0.25 mg/mL) en comparación con las fracciones obtenidas con los disolventes hexano y butanol.

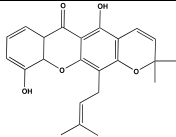
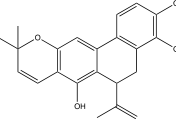
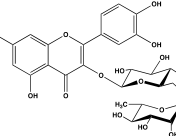
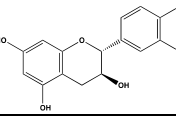
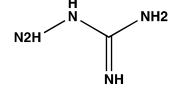
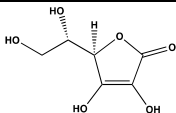
De manera similar, se evaluó la actividad biológica de las fracciones obtenidas a partir de la fracción **B** (capítulo III). Cinco fracciones (**B7**, **B11**, **B17**, **B19**, **B22**) presentaron una marcada actividad anti-AGEs con una concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) similar al control positivo aminoguanidina y una actividad antioxidante, en equivalentes trolox (TE/g), superior al control positivo del extracto de *Rosmarinus officinalis* L., previamente reportado con actividad antioxidante (Tabla 4.2) (Bozin *et al.*, 2007).

En este trabajo, se reporta por primera vez, la actividad anti-AGEs y antioxidante de trapezifolixantona (TPX) y paralycolina A, MS aislados y purificados de las fracciones **B5** y **B7**, respectivamente (capítulo III). El potencial anti-AGEs de TPX es moderado, en comparación con otras moléculas puras como rutina y catequina (Tabla 4.3). No obstante, TPX presentó una  $IC_{50}$  por debajo de la  $IC_{50}$  de aminoguanidina, una molécula usada de referencia en análisis anti-AGEs (Séro *et al.*, 2013). La actividad antioxidante de TPX y paralycolina A se consideró como no activa por presentar una  $EC_{50}$  superior a 1 mg/mL y 171.1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabla 4.1).

**Tabla 0.2** Actividad anti-AGEs y antioxidante correspondiente a las fracciones obtenidas a partir de la fracción de mediana polaridad (B).

Fracciones (B)	anti-AGEs IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Antioxidante μmol TE/g
1	> 1	N/A
2		N/A
3		N/A
4		N/A
5		N/A
6		N/A
7	0.5	932 ± 67
8	> 1	575 ± 36
9		N/A
10	0.8	434 ± 3
11	0.13	799 ± 50
12	0.22	533 ± 43
13	> 1	918 ± 115
14		604 ± 24
15	0.18	666 ± 48
16	0.15	473 ± 25
17	0.17	1047 ± 66
18	> 1	930 ± 35
19	0.13	1656 ± 65
20	0.20	2081 ± 73
21	0.21	1422 ± 32
22	0.17	1670 ± 50
23	0.22	1834 ± 81
24	0.24	1307 ± 34
Aminoguanidina	0.13	N/A
Ácido clorogénico	N/A	2989 ± 107
<i>Rosmarinus officinalis</i> extracto etanólico	N/A	655 ± 30

**Tabla 0.3** Actividad anti-AGEs y antioxidante de los metabolitos secundarios aislados de la corteza de *C. flava*.

Molécula	Estructura	anti-AGEs IC <sub>50</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	Antioxidante EC <sub>50</sub> (µg/mL)
Trapezifolixantona		1.3 mM	N/A
Paralycolina A		> 3 mM	171.1 ± 9.6*
Rutina		74 µM	151.1 ± 11.6*
Catequina		180 µM	68.5 ± 8.3*
Aminoguanidina		1.5 mM	N/E
Ácido ascórbico		N/E	62.7 ± 2.5*

N/E: No evaluado, N/A: No activo. \* $P \leq 0.05$  (ANOVA).

#### 4.4. DISCUSIÓN

Durante la determinación de la actividad antioxidante se observó que la EC<sub>50</sub> de los extractos de *C. flava* son superiores a los que reporta Ferreira *et al.* (2014) en hojas de *C. lanceolata* (50 µg/mL). De acuerdo con esto, y tomando en cuenta que no existe una medida estandarizada para definir una buena actividad antioxidante, para fines de este trabajo se propone como medidas de referencia valores de EC<sub>50</sub> ≤ de 90 µg/mL para una actividad antioxidante moderada, valores ≤ 150 µg/mL para actividad baja, y > 150 µg/mL para actividad nula, de acuerdo con el control positivo usado (Tabla 4.3).

Por su parte, diferentes autores han relacionado la actividad anti-AGEs con la presencia de metabolitos de tipo polifenólico con actividad antioxidante, capaces de evitar la oxidación de los azúcares o el producto de Amadori involucrados en la reacción de glicación, mediante la reducción de radicales libres y/o mediante la quelación de metales en la vía de reacción de Fenton (Khangholi *et al.*, 2015; Boisard *et al.*, 2014; Houda *et al.*, 2014; Ferchichi *et al.*, 2012; Povichit *et al.*, 2010). De acuerdo con esto, y debido a que TPX no presentó actividad antioxidante observable con DPPH (Tabla 4.3), la actividad anti-AGEs de TPX (Tabla 4.3) puede estar relacionada con la actividad antioxidante, sin embargo, las moléculas con múltiples grupos fenólicos o con cadenas laterales unidas a los anillos, como TPX, limitan la reacción debido a un impedimento estérico, ya que durante la transferencia de átomos de hidrógeno se requiere la formación de un complejo entre el antioxidante y el DPPH. Por tal motivo, para determinar la posible actividad antioxidante de TPX pueden ser utilizados métodos como blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno, poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) o capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Schaich *et al.*, 2015; Xie y Schaich, 2015; Salamone *et al.*, 2012; Salamone *et al.*, 2011). Sin embargo, no se descarta un mecanismo anti-AGEs diferente, que resultará importante investigar.

Por otro lado, considerando que la fracción **B7** presentó una alta actividad anti-AGEs en comparación con el control positivo aminoguanidina (Tabla 4.2), pero no así paralycolina A, que fue aislada de esta misma fracción, la actividad de la fracción **B7** puede deberse a un metabolito diferente o a algún tipo de sinergismo.

#### **4.5. CONCLUSIÓN**

La actividad biológica observada en trapezifolixantona y paralycolina A, aislados a partir de *C. flava*, establecen la base para la búsqueda de metabolitos secundarios similares en otras *Clusia* spp. presentes en la península de Yucatán. La actividad de estas moléculas confirma la hipótesis planteada para este trabajo de investigación, respecto a la actividad biológica que presentan otras especies del género *Clusia* L. y la familia Clusiaceae.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1. DISCUSIÓN GENERAL

Los sitios de colecta del material vegetal, necesarios para esta investigación, fueron elegidos tomando en cuenta la abundancia de las poblaciones de *Clusia* spp. considerada en una base de datos del herbario del CICY (datos no mostrados). Sin embargo, en algunos casos las poblaciones fueron escasas o no se encontraron en campo, posiblemente por el cambio de uso de suelo. Particularmente, se observó que las poblaciones de *C. rosea* son escasas, aun cuando no se encuentra en la lista de especies amenazadas. La reducción en el número de poblaciones de esta especie se puede considerar como una pérdida de biodiversidad importante para la península de Yucatán, debido principalmente al crecimiento poblacional, la deforestación y la fragmentación de hábitats en la península, propiciados por un incremento en la demanda de recursos y la pérdida de cobertura vegetal durante los últimos 25 años (Andrade-Hernández, 2010).

Posterior a la colecta del material vegetal de *Clusia* spp. la identificación de los especímenes se llevó a cabo utilizando caracteres morfológicos que incluyeron las marcas de resina presente en las hojas (capítulo II). De esta manera se lograron identificar cuatro especies, correspondientes a *C. flava*, *C. rosea*, *C. lundellii* (Sin. *C. chanekiana*) y *C. suborbicularis* (capítulo II). A pesar de que *C. suborbicularis* se incluye como un registro para la península de Yucatán en el Herbario Nacional de México (MEXU) y en el *Missouri Botanical Garden* (MO), hasta antes de este trabajo de investigación, *C. suborbicularis* no se encontraba registrada en el herbario del CICY. Su ausencia en el herbario de CICY se puede relacionar con la sinonimia que suele reportarse en la literatura entre *C. suborbicularis* y *C. flava*, a pesar de que existen reportes morfológicos que indican que pertenecen a taxones diferentes (Ulloa *et al.*, 2017; Villaseñor, 2004; Maguirre, 1979; Hammel, 1986).

De acuerdo con lo anterior, y con el fin de apoyar los datos morfológicos que indican que *C. suborbicularis* es una especie diferente a *C. flava*, durante esta investigación se emplearon métodos quimiométricos y marcadores moleculares para determinar la

consppecificidad de ambas especies. El análisis por métodos quimiométricos de los perfiles cromatográficos de HPLC de corteza de las diferentes *Clusia* spp. que fueron colectadas en la península, permitió establecer que *C. suborbicularis* y *C. flava* pertenecen a taxones diferentes (Figura 2.2A). Por otra parte, a pesar de que *C. suborbicularis* y *C. flava* son especies diferentes, el análisis de HCA mostró una relación quimiotaxonómica más próxima entre sí que con *C. lundellii* y *C. rosea*. De manera similar, los análisis quimiométricos permitieron la identificación de posibles quimiotipos en individuos de la misma especie incluso colectados en la misma población a poca distancia una de otra, como es el caso de *C. flava* colectados en Punta Laguna, Quintana Roo (Figura 2.3), lo que concuerda con la alta plasticidad de adaptación reportada para el género (Lüttge, 2007).

Por otra parte, el uso del marcador molecular *Internal Transcribed Spaced* (ITS) confirmó de manera contundente los resultados basados en los análisis morfológicos y quimiométricos, estableciendo que *C. suborbicularis* no es un sinónimo de *C. flava*. De la misma manera, durante la realización de este trabajo se exploró el uso del marcador molecular *Elongation Factor* (EF-1 $\alpha$ ) de *Clusia* spp. y las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del GenBank con número de acceso MT407472, MT407473, MT407474. EF-1 $\alpha$  resultó un potencial marcador molecular para determinar las especies de *Clusia* presentes en la península (no mostrado). Sin embargo, en comparación con el marcador ITS, no existen suficientes secuencias EF-1 $\alpha$  reportadas para este género, por lo que no fue posible construir una relación filogenética, entre otras *Clusia* spp., similar a lo que ocurre con otros marcadores moleculares poco explorados para este mismo género (Luján, 2009). La extracción de ADN de *C. flava* y *C. suborbicularis* se presenta en la Figura 6.15 (Anexo 3).

Por otro lado, el establecimiento de un protocolo para el fraccionamiento asistido por desreplicación de  $^{13}\text{C}$ -RMN (capítulo III), permitió la identificación de los componentes mayoritarios de fracciones cromatográficas complejas, obtenidas de la corteza de *C. flava*. El uso de desreplicación de  $^{13}\text{C}$ -RMN mediante el software MixONat (Bruguière *et al.*, 2020; Bruguière *et al.*, 2018) permitió la identificación de metabolitos secundarios de tipo polifenólico que resultaron de interés para este trabajo de investigación, derivando en el aislamiento de una xanthona, descrita previamente como trapezifolixanthona (TPX)

(Somanathan y Sultanbawa, 1974) y un fenantrenopirano descrito anteriormente como paralycolina A (Delle Monache *et al.*, 1987). De acuerdo con los resultados obtenidos, la desreplicación de  $^{13}\text{C}$ -RMN resulta un método rápido y eficaz, incluso sobre otros métodos donde se emplean técnicas como CG-EM. Sin embargo, resulta particularmente importante que las bases de datos de desplazamiento químicos de RMN correspondientes a metabolitos secundarios que son utilizadas durante el análisis, sean lo suficientemente robustas y estén correctamente elaboradas para permitir mejores resultados, tal como se mencionó en el capítulo III.

Finalmente, el aislamiento de la xantona TPX en *C. flava* apoya el uso de este tipo de metabolitos secundarios como un marcador quimiotaxonómico para el género *Clusia* L. (Ribeiro *et al.*, 2019; Rezende y Gottlieb, 1973). Además, el aislamiento de ácido betulínico y su alta concentración, que se observó mediante un detector de dispersión de luz evaporativa a baja temperatura (HPLC-ELSD) (Figura 6.16, anexo 3), parece representar el componente más abundante en la corteza de *C. flava*, tal como lo reporta Texeira *et al.*, (2006) en el tronco de *C. melchiorii*.



## 5.2. CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos lograron dar alcance al objetivo 1 planteado para el presente trabajo, de esta manera se hace evidente que el uso de herramientas quimiométricas puede resultar un buen método para el establecimiento de relaciones entre especies taxonómicamente complejas. De este modo, a través del uso de la quimiotaxonomía y la integración de análisis morfológicos y marcadores moleculares de *Clusia* spp., colectadas en la península, se logró concluir que *C. suborbicularis* no es sinónimo de *C. flava*. Por lo tanto, el establecimiento de *C. suborbicularis* como un taxón único y endémico de la península de Yucatán hace posible plantear las bases para el establecimiento e implementación de estrategias de conservación, y la correcta identificación de los recursos vegetales puede evitar la pérdida excesiva de biodiversidad. De manera similar, se observaron dos relaciones quimiotaxonómicas aparentes, por un lado entre las especies *C. flava* y *C. suborbicularis*, y por otro lado, entre *C. lundellii* y *C. rosea* (Capítulo II, figura 2.3). La identificación de potenciales quimiotipos de *C. flava* y *C. suborbicularis* (Capítulo II, figura 2.3) establece las bases para la búsqueda de metabolitos secundarios estructuralmente similares con potencial actividad biológica.

Por otro lado, el objetivo 2 se alcanzó mediante el desarrollo y aplicación en *C. flava*, del aislamiento asistido por dereplicación de  $^{13}\text{C}$ -RMN, usando el software analítico MixONat, lo que resultó ser una buena estrategia con alto nivel de confiabilidad, como un primer enfoque en la búsqueda de metabolitos secundarios de interés presentes en muestras complejas. Esto es posible, siempre y cuando las bases de datos que se usen para comparar los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN sean lo suficientemente robustas y se encuentren correctamente verificadas.

Finalmente, la actividad biológica observada en trapezifolixantona y paralycolina A, demuestra que las *Clusia* spp. son una fuente de metabolitos secundarios bioactivos. La presente investigación establece las bases para la bioprospección de metabolitos secundarios en especies que han sido poco estudiadas, como es el caso de *C. lundellii* y *C. suborbicularis*.

### 5.3. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos durante este trabajo de investigación, las perspectivas que se plantean pueden dividirse en tres enfoques. Uno de ellos relacionado con la continuidad en la determinación de la actividad biológica de TPX y paralycolina A utilizando métodos como el blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno, FRAP u ORAC para reevaluar la actividad antioxidante.

El segundo enfoque está relacionado con el establecimiento de un protocolo de quimiometría para usar TPX u otros metabolitos secundarios como marcadores quimiotaxonómicos entre poblaciones de *Clusia* spp. con la finalidad de determinar la presencia de quimiotipos sobreproductores de metabolitos secundarios de interés y/o continuar con la bioprospección de *Clusia* spp. de la península de Yucatán.

Finalmente, el tercer enfoque se relaciona con la aplicación del protocolo de fraccionamiento y aislamiento, descrito y establecido durante la realización de este trabajo de investigación, utilizando como modelo de estudio a *C. suborbicularis*, así como la purificación y determinación de la posible actividad biológica de metabolitos secundarios de tipo polifenólico.



**BIBLIOGRAFÍA**

- Abe, R., Shimizu, T., Sugawara, H., Watanabe, H., Nakamura, H., Choei, H., Sasaki, N., Yamagishi, S. I., Takeuchi, M., Shimizu, H. (2004). Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions. *Journal of Investigative Dermatology*, 122, 461-467.
- Ai-Jun, H., Fukai, T., Shimazaki, M., Sakagami, H., Han-Dong, S., Nomura, T. (2001). Benzophenones and xanthenes with isoprenoid groups from *Cudrania cochinchinensis*. *Journal of Natural Products*, 64, 65-70.
- Alvarez-Zapata, R., Sánchez-Medina, A., Chan-Bacab, M., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., García-Rodríguez, R.V., Peña-Rodríguez, L.M. (2015). Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography-ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically unknown plants. *Journal of Chromatography A.*, 1422, 213-221.
- Andrade-Hernández, M. (2010). Transformación de los sistemas naturales por actividades antropogénicas, en biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán, Durán R., Méndez M. (Eds.). CICY-PPD-FMAM-CONABIO-SEDUMA, pp. 316–319.
- Anholeti, M.C., De Paiva, S.R., Figueiredo, M.R., Kaplan, M.A.C. (2015). Chemosystematic aspects of polyisoprenylated benzophenones from the genus *Clusia*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 87, 289-301.
- Ansari, N.A., Dash, D. (2013). Amadori glycated proteins: role in production of autoantibodies in diabetes mellitus and effect of inhibitors on non-enzymatic glycation. *Aging and disease*, 4, 50-56.
- Arieira, J., Padovani, C.R., Schuchmann, K.L., Landeiro, V.L., Santos, S.A. (2018). Modeling climatic and hydrological suitability for an encroaching tree species in a neotropical flooded savanna. *Forest Ecology and Management*, 429, 244-255.

- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J.C., Sordo, M., Villacís, J., Silva, R., Celi, L., Martínez-Vázquez, M., Ostrosky-Wegman, P. (2016). Phytochemical study and evaluation of cytotoxic and genotoxic properties of extracts from *Clusia latipes* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26, 44-49.
- Baker, D.D., Chu, M., Oza, U., Rajgarhia, V. (2007). The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, 24, 1225-1244.
- Balick, M., Atha, D., Nee, M. (2000). Checklist of the vascular plants of Belize with common names and uses, en: memoirs of the New York Botanical Garden, The New York Botanical Garden Press (Ed.). Bronx, New York, USA, pp. 246.
- Barbosa, W.L.R., Pinto, L.N. (2003). Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu - sudeste do Pará. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 47-49.
- Baureithel, K.H., Büter, K.B., Engesser, A., Burkard, W., Schaffner, W. (1997). Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72, 153-157.
- Beaumont, L.J., Hughes, L., Poulsen, M. (2005). Predicting species distributions: Use of climatic parameters in BIOCLIM and its Impact on predictions of species current and future distributions. *Ecological Modelling*, 186, 251-270.
- Betteridge, J. (2000). What Is Oxidative Stress? *Metabolism*, 42, 3-8.
- Beutler, J.A., Alvarado, A.B., Schaufelberger, D.E., Andrews, P., McCloud, T.G. (1990). Dereplication of phorbol bioactives: *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*. *Journal of Natural Products*, 53, 867-874.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization*, 5, 9-19.

- Boisard S., Anne-Marie Le Ray, Gatto J., Marie-Christine A., Blanchard P., Derbré S., Flurin C., Richomme Pascal. (2014). Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 1344-1351.
- Bradshaw, J., Butina, D., Dunn, A.J., Green, R.H., Hajek, M., Jones, M.M., Lindon, J.C., Sidebottom, P.J. (2001). A rapid and facile method for the dereplication of purified natural products. *Journal of Natural Products*, 64, 1541-1544.
- Bruguière, A., Derbré, S., Coste, C., Le Bot, M., Siegler, B., Leong, S.T., Sulaiman, S.N., Awang, K., Richomme, P. (2018).  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication of *Garcinia* extracts: predicted chemical shifts as reliable databases. *Fitoterapia*, 131, 59-64.
- Bruguière, A., Derbré, S., Dietsch, J., Leguy, J., Rahier, V., Pottier, Q., Bréard, D., Suor-Cherer, S., Viault, G., Le Ray, A.M., Saubion, F., Richomme, P. (2020). MixONat, a software for the dereplication of mixtures based on  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 92, 8793-8801.
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., y Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218-228.
- Byun, K., Yoo, Y. C., Son, M., Lee, J., Goo-Bo, J., Park, Y. M., Salekdeh, G. H., y Lee, B. (2017). Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 177, 44-55.
- Camargo, M.S., Oliveira, M.T., Santoni, M.M., Resende, F.A., Oliveira-Höhne, A.P., Espanha, L.G., Nogueira, C.H., Cuesta-Rubio, O., Vilegas, W., Varanda, E.A. (2015). Effects of nemorosone, isolated from the plant *Clusia rosea*, on the cell cycle and gene expression in MCF-7 BUS breast cancer cell lines. *Phytomedicine*, 22, 153-157.

- Carnevale Neto, F., Pilon, A. C., Selegato, D. M., Freire, R. T., Gu, H., Raftery, D., Lopes, N. P., y Castro-Gamboa, I. (2016). Dereplication of natural products using GC-TOF Mass Spectrometry: Improved metabolite identification by spectral deconvolution ratio analysis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3, 1-13.
- Cassiano, D.S.A., Reis, I.M.A., Estrela, I. de O., de Freitas, H.F., Pita, S.S. da R., David, J. M., Branco, A. (2019). Acetylcholinesterase inhibitory activities and bioguided fractionation of the *Ocotea percoriacea* extracts: HPLC-DAD-MS/MS characterization and molecular modeling of their alkaloids in the active fraction. *Computational Biology and Chemistry*, 83, 107-129.
- Cerrini, S., Delle, M.F., Moura, P.R. (1993). Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1.0]-decane-7-hydroxy-2,9-dione from *Clusia nemerosa*. *Phytochemistry*, 32, 1023-1028.
- Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J.P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., Rodríguez-Landa, J.F. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*, 15, 123-136.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L. (2005). Chemistry and biological activity of polyisoprenylated benzophenone derivatives. *Studies in Natural Products Chemistry*, 32, 671-720.
- Cuesta-Rubio, O., Velez-Castro, H., Frontana-Uribe, B.A., Cárdenas, J. (2001). Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Phytochemistry*, 57, 279-283.
- Da Cunha, M.G., Franchin, M., De Paula-Eduardo, L.F., Freires, I.A., Beutler, J.A., De Alencar, S.M., Ikegaki, M., Tabchoury, C.P.M., Cunha, T.M., Rosalen, P.L. (2016). Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of ent-nemorosone from Brazilian geopropolis. *Journal of Functional Foods*, 26, 27-35.

- Dasgupta, A., y Klein, K. (2014a). Introduction to Free Radicals and the Body's Antioxidant Defense BT - Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements, en: Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements. A. Dasgupta & K. Klein (eds). ELSEVIER. pp. 1-18.
- Dasgupta, A., y Klein, K. (2014b). Chapter 12 - Fruits, Vegetables, and Nuts: Good Sources of Antioxidants, en: Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements. A. Dasgupta & K. Klein (eds). ELSEVIER. pp. 209-235.
- Daud, S., Bin, E.E., G.C.L., Malek, E.A., Ahmad, Z., Hashim, N.M., See, I., Teh, S.S., Ismail, A.A.F. (2016). A new pyranoxanthone from the stem bark of *Calophyllum buxifolium*. Chemistry of Natural Compounds, 52, 807-809.
- De Andrade, M.R., Almeida, E.X., Conserva, L.M. (1998). Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. Phytochemistry, 47, 1431-1433.
- De Queiroz K. (2007). Species concepts and species delimitation. Systematic. Biologi, 56, 879-876.
- De Oliveira, C.M.A.A., Porto, A.L.M.M., Bittrich, V., Marsaioli, A.J. (1999). Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. Phytochemistry, 50, 1073-1079.
- Delle Monache, F., Delle Monache, G., Gács-Baitz, E. (1991). Two polyisoprenylated ketones from *Clusia nemorosa*. Phytochemistry, 30, 703-705.
- Delle Monache F., Delle Monache G., Gacs-Baitz, E. (1991). Prenylated benzophenones from *Clusia sandiense*. Phytochemistry, 30, 2003-2005.
- Delle Monache, F., Delle Monache, G., Cavalcanti, J., Pinheiro, R. (1987). An unexpected dihydrophenanthrene from *Clusia paralycola*. Tetrahedron Letters, 28, 563-566.



- Delle Monache, F., Delle Monache, G., Botta, B., y Gacs-Baitz, E. (2002). A biphenyl, a dihydrophenanthrene and a xanthone from *Clusia paralycola*. *Heterocycles*, 56, 589-597.
- Derbré, S., Gatto, J., Pelleray, A., Coulon, L., Séraphin, D., Richomme, P. (2010). Automating a 96-well microtiter plate assay for identification of AGEs inhibitors or inducers: Application to the screening of a small natural compounds library. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 1747-1758.
- Dewick, P.M. (2009). *Medicinal natural products: A biosynthetic approach* (J.W. & S. Ltd (Ed.). New York, USA, pp. 507.
- Dharmaratne, H.R.W., Wanigasekera, W.M.A.P. (1996). Xanthones from root bark of *Calophyllum thwaitesii*. *Phytochemistry*, 42, 249-250.
- Dharmaratne, H. Ranjith W., Sotheeswaran, S., Balasubramaniam, S., Reisch, J. (1986). Xanthones from roots of three *Calophyllum* species. *Phytochemistry*, 25, 1957-1959.
- Díaz-Carballo, D., Gustmann, S., Acikelli, A.H., Bardenheuer, W., Buehler, H., Jastrow, H., Ergun, S., Strumberg, D. (2012). 7-epi-nemorosone from *Clusia rosea* induces apoptosis, androgen receptor down-regulation and dysregulation of PSA levels in LNCaP prostate carcinoma cells. *Phytomedicine*, 19, 1298-1306.
- Dreyer, D.L. (1974). Xanthochymol from *Clusia rosea* (Guttiferae). *Phytochemistry*, 13, 2883-2884.
- Duprat, R.C., Anholeti, M.C., De Sousa, B.P., Pacheco, J.P.F., Figueiredo, M.R., Kaplan, M.A.C., Santos, M.G., Gonzalez, M.S., Ratcliffe, N.A., Mello, C.B., Paiva, S.R., Feder, D. (2017). Laboratory evaluation of *Clusia fluminensis* extracts and their isolated compounds against *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 59-66.

- El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B.M., Cech, N.B., Pearce, C.J., Oberlies, N.H. (2013). High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *Journal of Natural Products*, 76, 1709-1716.
- Ezaki, K., Satake, M., Kusumi, T., Kakisawa, H. (1991). New dihydrophenanthropyranes from *Cedrelinga catenaeformis*. *Tetrahedron Letters*, 32, 2793-2796.
- Ferchichi, L., Derbré, S., Mahmood, K., Touré, K., Guilet, D., Litaudon, M., Awang, K., Hadi, A.H.A., Le Ray, A.M., Richomme, P. (2012). Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry*, 78, 98-106.
- Ferreira, R.O., De Carvalho Junior, A.R., Da Silva, T.M.G., Castro, R.N., Da Silva, T.M.S., y De Carvalho, M.G. (2014). Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 24, 617-625.
- Ferreira, R.O., De Carvalho Junior, A.R., Riger, C.J., Castro, R.N., Da Silva, T.M.S., De Carvalho, M.G. (2016). Constituintes químicos e atividade antioxidante in vivo de flavonoides isolados de *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). *Quimica Nova*, 39, 1093-1097.
- Fouotsa, H., Lannang, A.M., Mbazoa, C.D., Rasheed, S., Marasini, B.P., Ali, Z., Devkota, K. P., Kengfack, A.E., Shaheen, F., Choudhary, M.I., Sewald, N. (2012). Xanthonic inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase and glycation from *Garcinia nobilis*. *Phytochemistry Letters*, 5, 236-239.
- Gaudêncio, S.P., Pereira, F. (2015). Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. *Natural Product Reports*, 32, 779-810.
- Gehrig, H.H., Aranda, J., Cushman, M.A., Virgo, A., Cushman, J.C., Hammel, B.E., Winter, K. (2003). Cladogram of panamanian *Clusia* based on nuclear DNA: Implications for the origins of Crassulacean acid metabolism. *Plant Biology*, 5, 59-70.

- Godoy, B.S., Camargos, L.M., Lodi, S. (2018). When phylogeny and ecology meet: Modeling the occurrence of *Trichoptera* with environmental and phylogenetic data. *Ecology and Evolution*, 8, 5313–5322.
- Gómez-Verjan, J.C., Rodríguez-Hernández, K.D., Reyes-Chilpa, R. (2017). Bioactive coumarins and xanthenes from *Calophyllum* genus and analysis of their druglikeness and toxicological properties. *Studies in Natural Products Chemistry*, 53, 277-307.
- González, G.J., Martínez, O.E., Delle Monache, F. (1995). Citrans and cyclols from *Clusia multiflora*. *Phytochemistry*, 38, 485-489.
- González, G.J., Cuellar, V., Betancourt, A., Pinzon, M.I. (1983). A benzophenone from the fruits of *Clusia ellipticifolia*. *Phytochemistry*, 22, 2088-2090.
- Govindachari, T.R., Kalyanaraman, P.S., Muthukumaraswamy, N., Pai, B.R. (1971). Xanthenes of *Garcinia mangostana* Linn. *Tetrahedron*, 27, 3919-3926.
- Groweiss, A., Cardellina, J.H., Boyd, M.R. (2000). HIV-Inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*. *Journal of Natural Products*, 63, 1537-1539.
- Guimarães, A.L. De A., Bizarri, C.H.B., Barbosa, L.S., Nakamura, M.J., De Souza Ramos, M. freiman, De Macêdo Vieira, A.C. (2013). Characterisation of the effects of leaf galls of *Clusiamyia nitida* (Cecidomyiidae) on *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae): Anatomical aspects and chemical analysis of essential oil. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 208, 165-173.
- Gustafsson, M.H.G.G., Bittrich, V. (2002). Evolution of morphological diversity and resin secretion in flowers of *Clusia* (Clusiaceae): Insights from ITS sequence variation. *Nordic Journal of Botany*, 22, 183-203.

- Gustafsson, M.H.G., Winter, K., & Bittrich, V. 2007. Diversity, phylogeni and Classification of *Clusia*, en: *Clusia: A woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity*. U. Lüttge (ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. pp. 95-104.
- Hammel, B. (1986). New species of Clusiaceae from central America with notes on *Clusia* and synonymy in the tribe Clusieae. *Selbyana*, 9, 112-120.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., y Williamson, E. M. (2012). Natural product chemistry, en: *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*, Heinrich M. (ed). ELSEVIER. China, pp. 61-105.
- Hemshkhar, M., Sunitha, K., Santhosh, M.S., Devaraja, S., Kemparaju, K., Vishwanath, B. S., Niranjana, S.R., Girish, K.S. (2011). An overview on genus *Garcinia*: Phytochemical and therapeutical aspects. *Phytochemistry Reviews*, 10, 325-351.
- Henry, G.E., Jacobs, H., Carrington, C.M.S., McLean, S., Reynolds, W.F. (1999). Prenylated benzophenone derivatives from caribbean *Clusia* species (Guttiferae). *Plukenetiones B-G and xerophenone A*. *Tetrahedron*, 55, 1581-1596.
- Hernández-Bolio, G.I., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., Castañeda-Ramírez, G.S., Sauri-Duch, E., Torres-Acosta, J.F.J., Peña-rodríguez, L.M. (2017). Effects of polyphenol removal methods on the in vitro exsheathment inhibitory activity of *Lysiloma latisiliquum* extracts against *Haemonchus contortus* larvae. *Natural Product Research*, 32, 508-513.
- Houda M., Derbré S., Jedy A., Tlili N., Legault J, Richomme P., Limam F., Saidani-Tounsi M. (2014). Combined anti-AGEs and antioxidant activities of different solvent extracts of *Solanum elaeagnifolium* Cav (Solanaceae) fruits during ripening and related to their phytochemical compositions. *EXCLI J*, 13, 1029-1042.

- 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  $^{13}\text{C}$  NMR. *Analytical Chemistry*, 86, 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, 55-95.
- Isbell, H. S., Frush, H.L. (1958). Mutarotation, hydrolysis, and rearrangement reactions of glycosylamines. *Journal of Organic Chemistry*, 23, 1309-1319.
- Ishiguro, K., Chaudhuri, S.K., Kubo, I. (1998). A xanthone from *Clusia insignis*. *Phytochemistry*, 49, 2531-2532.
- Jan-Michael, C.C., Ragasa, C.Y. (2004). Structure elucidation of stigmasterol and B-sitosterol from *Sesbania grandiflora* Linn Pers. and B-carotene from *Heliotropium indicum* Linn. by NMR spectroscopy. *Kimika*, 20, 5-12.
- Jetter, R., Riederer, M. (2016). Localization of the transpiration barrier in the epi- and intracuticular waxes of eight plant species: Water transport resistances are associated with fatty acyl rather than alicyclic components. *Plant Physiology*, 170, 921-934.
- Jobes, D.V., Thien, L.B. (1997). A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15, 326-334.
- Karunakaran, T., Ee, G.C.L., Teh, S.S., Daud, S., Mah, S.H., Lim, C.K., Jong, V.Y.M., Awang, K. (2016). A new coumarin from stem bark of *Mesua hexapetala*. *Natural Product Research*, 30, 1591-1597.

- Khangholi, S., Majid, F.A.A., Berwary, N.J.A., Ahmad, F., Aziz, R.B.A. (2015). The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through polyphenols in hyperglycemic condition. *Planta Medica*, 82, 32-45.
- Kildgaard, S., Subko, K., Phillips, E., Goidts, V., De La Cruz, M., Díaz, C., Gottfredsen, C. H., Andersen, B., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., y Larsen, T. O. (2017). A dereplication and bioguided discovery approach to reveal new compounds from a marine-derived fungus *Stilbella fimetaria*. *Marine Drugs*, 15, 1-19.
- Kim, H.P., Park, H., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2008). Biochemical pharmacology of biflavonoids: Implications for anti-inflammatory action. *Archives of Pharmacal Research*, 31, 265-273.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Lang, G., Mayhudin, N.A., Mitova, M.I., Sun, L., Van Der Sar, S., Blunt, J.W., Cole, A.L.J., Ellis, G., Laatsch, H., Munro, M.H.G. (2008). Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. *Journal of Natural Products*, 71, 1595-1599.
- Li, Y., Kui-Shan, W., Xiao, R., Ying-Xian, Z., Feng, W., Qiang, W. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23, 762.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118.
- Lokvam, J., Braddock, J.F., Reichardt, P.B., Clausen, T.P. (2000). Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Phytochemistry*, 55, 29-34.

- Luján, M. (2019). Playing the taxonomic cupid: Matching pistillate and staminate conspecifics in dioecious *Clusia* (Clusiaceae). *Systematic Botany*, 44, 548-559.
- Lundell, C.L. (1937). *Clusia suborbicularis*. *Phytologia*, 1, 218.
- Lüttge, U. (1999). One morphotype, three physiotypes: Sympatric species of *Clusia* with obligate C3 photosynthesis, obligate CAM and C3-CAM intermediate behaviour. *Plant Biology*, 1, 138-148.
- Lüttge, U. (2007). Physiological ecology, en *Clusia. A Woody Neotropical Genus of Remarkable Plasticity and Diversity*. U. Lüttge (ed.). Springer Berlin Heidelberg. pp. 187-229.
- Luzzi, R., Guimarães, C.L., Verdi, L.G., Simionatto, E.L., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Floriani, A.E.O., Cechinel-Filho, V. (1997). Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. *Phytomedicine*, 4, 141-144.
- Maguirre, B. (1979). On the genus *Clusia* (Clusiaceae) in Mexico. *Taxon*, 28, 13-18.
- Martínez, O.E., Gonzáles, G.J., Delle Monache F. (1994). Benzophenones from *Clusia ellipticifolia*. *Phytochemistry*, 36, 473-475.
- Martínez y Perez, J.L., Castillo-Campos, G., Nicolde Morejón, F. (2015). Clusiaceae. *Flora de Veracruz*, 165, 1-48.
- Mathur, S. (1972). Triterpenoid constituents of *Clusia rosea*. *Phytochemistry*, 40, 1513-1514.
- Medina, E., Aguiar, G., Gómez, M., Aranda, J., Medina, J. D., y Winter, K. (2006). Taxonomic significance of the epicuticular wax composition in species of the genus *Clusia* from Panama. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 319-326.

- Nagai, R., Murray, D.B., Metz, T.O., Baynes, J.W. (2012). Chelation: A fundamental mechanism of action of AGE Inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. *Diabetes*, 61, 549-559.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005). *Lehninger. Principios de bioquímica*. OMEGA (ed). Barcelona, España, pp. 1304.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.
- Nogueira, P.P.C., Bittrich, V., Shepherd, G.J., Lopes, A.V., Marsaioli, A.J. (2001). The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). *Phytochemistry*, 56, 443-452.
- Nyigo, V.A., Peter, X., Mabiki, F., Malebo, H.M., Mdegela, R.H., Erda Fouche, G., Abiki, F. M., Alebo, M.H.M., Degela, R.H., Fouche, G. (2016). Isolation and identification of euphol and  $\beta$ -sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens*. *The Journal of Phytopharmacology*, 5, 100-104.
- Oldoni, T.L.C., Merlin, N., Karling, M., Carpes, S.T., Alencar, S.M., Morales, R.G.F., Silva, E. A., Pilau, E.J. (2019). Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. *Food Research International*, 125, 108-647.
- Oliveira, R.F., Camara, C.A., Agra, M.D.F., Sarmiento Silva, T.M. (2012). Biflavonoids from the unripe fruits of *Clusia paralicola* and their antioxidant activity. *Natural Product Communications*, 7, 1597-1600.
- Othman, S. Ben, Yabe, T. (2015). Use of hydrogen peroxide and peroxy radicals to induce oxidative stress in neuronal cells. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 40-45.



- Palleros, D.R. (1995). Liquid-liquid extraction: Are  $n$  extractions with  $V/n$  mL of solvent really more effective than one extraction with  $V$  mL? *Journal of Chemical Education*, 72, 319.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Phillipson, J.D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, 68, 2960-2972.
- Pohjala, L., Alakurtti, S., Ahola, T., Yli-Kauhaluoma, J., Tammela, P. (2009). Betulin-derived compounds as inhibitors of alphavirus replication. *Journal of Natural Products*, 72, 1917-1926.
- Porto, A.L.M., Machado, S.M.F., De Oliveira, C.M.A., Bittrich, V., Amaral, M.D.C.E., Marsaioli, A.J. (2000). Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry*, 55, 755-768.
- Povichit N., Phrutivorapongkul A., Suttajit M., Chaiyasut C., Leelapornpisid P. (2010). Phenolic content and in vitro inhibitory effects on oxidation and protein glycation of some thai medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23, 403-408.
- POWO. 2019. "Plants of the World Online". Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> [Acceso 20 julio 2020].
- Qing-fei, F., Zhi, N., Hua-bin, H., You-kai, X., Ting, T. (2012). Chemical constituents from *Garcinia bracteata* and ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry guided isolation of tautomers. *Natural Product Research and Development*, 23, 1055-1059.

- Reddy, P.V, Beyaz, A. (2006). Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today*, 11, 646–654.
- Rezende, C.M., Gottlieb, O. (1973). Xanthones as systematic markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1, 111-118.
- Ribeiro, P.R., Ferraz, C.G., Cruz, F.G. (2019). New steroid and other compounds from non-polar extracts of *Clusia burle-marxii* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 82, 31–34.
- Ribeiro, P.R., Ferraz, C.G., Guedes, M.L.S., Martins, D., Cruz, F.G. (2011). A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*. *Fitoterapia*, 82, 1237–1240.
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Borge-Argáez, R., García-Mendez, Z., Méndez-González, M. (2009). Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 417-422.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Salamone, M., Dilabio, G.A., Bietti, M. (2011). Hydrogen atom abstraction reactions from tertiary amines by benzyloxyl and cumyloxyl radicals: influence of structure on the rate-determining formation of a hydrogen-bonded prereaction complex. *Journal of Organic Chemistry*, 76, 6264–6270.
- Salamone, M., Martella, R., Bietti, M. (2012). Hydrogen abstraction from cyclic amines by the cumyloxyl and benzyloxyl radicals. the role of stereoelectronic effects and of substrate/radical hydrogen bonding. *Journal of Organic Chemistry*, 77, 8556-8561.

- Sánchez-Medina, A., García-Sosa, K., May-Pat, F., Peña-Rodríguez, L.M. (2021). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and  $\beta$ -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 8, 144-151.
- Sanz-Biset, J., Cañigüeral, S. (2011). Plant use in the medicinal practices known as “strict diets” in Chazuta valley (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 271-288.
- Schaich, K.M., Tian, X., Xie, J. (2015). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods*, 18, 782–796.
- Schwikkard, S. L., y Mulholland, D. A. (2014). Useful methods for targeted plant selection in the discovery of potential new drug candidates. *Planta Medica*, 80, 1154-1160. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368549>
- Seo, E.K., Wall, M.E., Wani, M.C., Navarro, H., Mukherjee, R., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D. (1999). Cytotoxic constituents from the roots of *Tovomita brevistaminea*. *Phytochemistry*, 52, 669-674.
- Séro, L., Sanguinet, L., Blanchard, P., Dang, B.T., Morel, S., Richomme, P., Séraphin, D., Derbré, S. (2013). Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules*, 18, 14320-14339.
- Serra-Varela, M.J., Grivet, D., Vincenot, L., Broennimann, O., Gonzalo-Jiménez, J., Zimmermann, N.E. (2015). Does phylogeographical structure relate to climatic niche divergence? A test using maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Global Ecology and Biogeography*, 24, 1302-1313.
- Sharma, A., Amin, D., Sankaranarayanan, A., Arora, R., Mathur, A.K. (2020). Present

status of *Catharanthus roseus* monoterpenoid indole alkaloids engineering in homo- and hetero-logous systems. *Biotechnology Letters*, 42, 11-23.

Sientzoff, P., Hubert, J., Janin, C., Voutquenne-Nazabadioko, L., Renault, J.H., Nuzillard, J.M., Harakat, D., Magid, A.A. (2015). Fast identification of radical scavengers from *Securigera varia* by combining  $^{13}\text{C}$ -NMR-based dereplication to bioactivity-guided fractionation. *Molecules*, 20, 14970-14984.

Silva, A.T.M.E, Magalhães, C.G., Duarte, L.P., Mussel, W.N., Ruiz, A.L.T.G., Shiozawa, L., Carvalho, J.E.I.C., Vieira Filho, S.A. (2018). Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and in vitro evaluation of cancer cell growth. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53, 1-10.

Silva, E., Araújo, R., Freire-Filha, L., Silveira, E., Lopes, N.P., De Paula, J.E., Braz-Filho, R., Espindola, L.S. (2013). Clusiaxanthone and tocotrienol series from *Clusia pernambucensis* and their antileishmanial activity. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 24, 1-8.

Somanathan, R., Sultanbawa, M.U.S. (1974). Chemical investigation of ceylonese plants. Part VIII. Trapezifolixanthone, a new di-isoprenylated xanthone from the bark of *Calophyllum trapezifolium* Thw. (Guttiferae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2515-2517.

Sousa, G.F., Duarte, L.P., Alcântara, A.F.C., Silva, G.D.F., Vieira-Filho, S.A., Silva, R.R., Oliveira, D.M., Takahashi, J.A. (2012). New triterpenes from *Maytenus robusta*: Structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. *Molecules*, 17, 13439-13456.

Takeuchi, M., Yamagishi, S. (2004). TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. *Medical Hypotheses*, 63, 449-452.

Tanjung, M., Rachmadiarti, F., Prameswari, A., Wustha Agyani, U.V., Dewi Saputri, R., Srie Tjahjandarie, T., Maolana Syah, Y. (2018). *Airlanggins A-B*, two new

---

isoprenylated benzofuran-3-ones from the stem bark of *Calophyllum soulattri*. *Natural Product Research*, 32, 1493-1498.

Tantapakul, C., Maneerat, W., Sripisut, T., Ritthiwigrom, T., Andersen, R.J., Cheng, P., Cheenpracha, S., Raksat, A., Laphookhieo, S. (2016). New benzophenones and xanthenes from *Cratoxylum sumatranum* ssp. *neriifolium* and their antibacterial and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8755-8762.

Teixeira, J.S.A.R., Cruz, F.G. (2005). Polyisoprenylated benzophenone derivatives from *Clusia obdeltifolia*. *Tetrahedron Letters*, 46, 2813-2816.

Teixeira, J.S.R., Moreira, L.D.M., Guedes, M.L.S., Cruz, F.G. (2006). A new biphenyl from *Clusia melchiorii* and a new tocotrienol from *C. obdeltifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 812-815.

Tesemma, M., Adane, L., Tariku, Y., Muleta, D., Demise, S. (2013). Isolation of compounds from acetone extract of root wood of *Moringa stenopetala* and evaluation of their antibacterial activities. *Research Journal of Medicinal Plant*, 7, 32-47.

The Plant List. (2013). A working list of all plant species. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2728629> [Acceso 26 mayo 2021].

Ulloa Ulloa, C., Acevedo-Rodríguez, P., Beck, S., Belgrano, M.J., Bernal, R., Berry, P. E., Brako, L., Celis, M., Davidse, G., Forzza, R.C., Gradstein, S.R., Hokche, O., León, B., León-Yáñez, S., Magill, R.E., Neill, D.A., Nee, M., Raven, P.H., Stimmel, H., Strong, M.T., Villaseñor, J.L., Zarucchi, J.L., Zuloaga, F.O., Jørgensen, P.M. (2017). An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science*. 358: 1614-1617.

Vaasen, A., Rubio, S.F., Hampp, R. (2002). Population biology of different *Clusia* species in the state of Rio de Janeiro, en: *Clusia: a woody neotropical genus of*

remarkable plasticity and diversity, U. Lüttge (ed.). Springer Berlin Heidelberg. pp. 117-126.

Vaasen, Anja, Begerow, D., Lüttge, U., Hampp, R. (2002). The genus *Clusia* L.: Molecular evidence for independent evolution of photosynthetic flexibility. *Plant Biology*, 4, 86-93.

Villaseñor, J.L. (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 135, 105-135.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, en: *PCR protocols: A guide to methods and application*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White T.J.B.T. (eds.). Academic Press, San Diego, EUA, pp. 315-322.

Wink, M. (2010a). Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites, en: *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Wink, M. (ed.). Blackwell Publishing Ltd. pp. 1-19.

Wink, M. (2010b). Secondary metabolites: Deterring herbivores. *eLS*, 1-10.

Xiao-Hui, S., Man-Li, Z., Li-Geng, L., Chang-Hong, H., Yu-Cheng, G., Qing-Wen, S. (2008). Chemical constituents of the plants of the genus *Calophyllum*. *Chemistry and Biodiversity*, 5, 2579-2608.

Xie, J., Schaich, K.M. (2015). Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 104, 1069-1074.

Ya-Ching, S., Li-Tang, W., Khalil, A.T., Chiang, L.C., Pei-Wen, C. (2005). Bioactive pyranoxanthones from the roots of *Calophyllum blancoi*. *Chemical and*

Pharmaceutical Bulletin, 53, 244-247.

Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. (2000). Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. Journal of agricultural and food chemistry, 48, 180-185.

Yu Tang, Na Li, Yike Zou, Yanran Ai, Guang-Lei Ma, Ezzat E.A. Osman, Juan Xiong, Junmin Li, Ze-Xin Jin, Jin-Feng Hu,. (2019). LC-MS guided isolation and dereplication of *Lycopodium* alkaloids from *Lycopodium cernuum* var. sikkimense of different geographical origins. Phytochemistry, 160, 25-30.

Yulianto, W., Andarwulan, N., Giriwono, P.E., Pamungkas, J. (2016). HPLC-based metabolomics to identify cytotoxic compounds from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng against human breast cancer MCF-7 cells. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1039, 28-34.

Zapata-Estrella, H. E., Sánchez-Pardenilla, A.D.M., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., Campos-Buzzi, F., Meira-Quintão, N.L., Cechinel-Filho, V., Peña-Rodríguez, L.M. (2014). bioactive metabolites from *Cnidoscopus souzae* and *Acmella pilosa*. Natural Product Communications, 9, 1319-1321.

Zhao, Y., Yan-Yan, Z., Du, Y., Kang, J.S. (2019). Characterization and classification of three common *Bambusoideae* species in Korea by an HPLC-based analytical platform coupled with multivariate statistical analysis. Industrial Crops and Products, 130, 389-397.

## ANEXOS

### 6.1. ANEXO 1

Los datos descritos en el anexo 1 forman parte del *Supporting Information* del manuscrito “*Clusia suborbicularis* is not a synonym of *Clusia flava*. Molecular and metabolomic evidence.” Sometido a TAXON. Autores: Luis Alfredo Herbert-Doctor, Gabriel Dzib, Barry Edward Hammel, Bartolomé Humberto Chí-Manzanero, Blondy Beatriz Canto-Canché, Karlina García-Sosa, Pascal Richomme, Séverine Derbré, Luis Manuel Peña-Rodríguez; correspondiente al Capítulo II.

**Table 0.1** S1. Principal differences in the morphological characters of *C. flava* and *C. suborbicularis* (Lundell, 1937; Martínez *et al.*, 2015).

Character	<i>C. flava</i>	<i>C. suborbicularis</i>
Leaf	Lamina obovate, apex obtuse, lateral veins parallel in each side.	Lamina suborbicular, apex rounded, lateral veins fused on a submarginal vein.
Resin marks in the leaves	Dark lines or dashes, almost parallel to the lateral veins, often visible on both surfaces.	Scarcely visible below, observed as intermittent, branched and curved lines that appear a web or maze.
Flowers	Yellow. Strong banana fragrance (isoamyl acetate).	Inflorescence terminal, 2-3 flowers.
Fruits	Globose-flattened capsules.	Obovoid-elongated.



**Table 0.2** S2. Data of collected plant material.

<b>Specie</b>	<b>Code</b>	<b>Population</b>	<b>Voucher specimens</b>
<i>C. flava</i>	PL	Punta laguna, Quintana Roo, Méx.	69393, 69394, 69395, 69396
	TX	Tixcacalcupul, Yucatán, Méx.	69397, 69399
	XN	Xocén, Yucatán, Méx.	69398, 69400
<i>C. suborbicularis</i>	SK	Sian Ka'an, Quintana Roo, Méx.	70169, 70170, 70171, 70172, 70173, 70174, 70175
<i>C. rosea</i>	MR	Mérida, Yucatán, Méx.	70182, 72344
	CK	Calakmul, Campeche, Méx.	70903, 70908
<i>C. lundellii</i>	CK	Calakmul, Campeche, Méx.	70907, 70909



**Figure 0.1** S3. Herbarium specimen of *C. flava*. Leaf green, glabrous, coriaceous 6-10 cm long, 3-5 cm wide. Petioles 0.5-1 cm long. Lamina obovate, apex obtuse, base cuneate, lateral veins parallel 16-20 each side. The resin marks in the leaves observed as rather obscure to more obvious dark lines or dashes, almost parallel to the lateral veins, often visible on both surfaces.



**Figure 0.2** S4. Herbarium specimen of *C. suborbicularis*. Leaf green, glabrous, coriaceous 12-15 cm long, 8-10 cm wide. Petioles 1.5-2.2 cm long. Lamina suborbicular, apex rounded, base cuneate, lateral veins parallel 20-25 each side, fused on a submarginal vein. The resin marks are scarcely visible below (with hand lens) as intermittent, often branched and curved lines that may appear to form a web or maze.

**6.1.1. Bibliografía anexo 1**

Lundell, C.L. (1937) *Clusia suborbicularis*. Phytologia, 1, 218.

Martínez y Perez, J.L., Castillo-Campos, G., Nicolde Morejón, F. (2015). Clusiaceae. Flora de Veracruz, 165, 1-48.

## 6.2. ANEXO 2

Los datos descritos en el anexo 2 forman parte del *Supplementary Material* del manuscrito “<sup>13</sup>C-NMR dereplication assisted isolation of natural products: A two case study in *Clusia flava* Jacq.”, sometido a Journal of Natural Products. Autores: Luis A. Herbert-Doctor, Antoine Bruguière, Séverine Derbré, Pascal Richomme, and Luis M. Peña-Rodríguez; correspondiente al Capítulo III.

**Table 0.3** S1. Experimental and reported <sup>13</sup>C-NMR chemical shift ( $\delta_c$ ) values of NPs predicted in dereplication analyses results of fractions **B1, B3, B6, B9, B16**.

Position	euphol		$\beta$ -sitosterol		friedelin		betulinic acid		palmitic acid		lupeol	
	Exp.	Rep. <sup>a</sup>	Exp.	Rep. <sup>b</sup>	Exp.	Rep. <sup>c</sup>	Exp.	Rep. <sup>d</sup>	Exp.	Rep. <sup>e</sup>	Exp.	Rep. <sup>f</sup>
1	35.5	35.4	37.2	37.2	22.4	22.3	177.0	177.3	180.0	179.8	38.4	38.0
2	27.7	27.9	31.7	31.6	41.6	41.5	150.0	150.3	34.9	34.6	27.3	27.4
3	79.3	79.2	71.9	71.8	213.4	213.2	109.4	109.7	23.7	24.6	79.2	79.0
4	37.0	37.5	42.3	42.2	58.3	58.2	76.5	76.8	30.7	29.3	38.8	38.7
5	51.0	51.2	140.8	140.7	42.2	42.2	55.1	55.4	30.6	29.4	55.4	55.3
6	19.4	19.1	121.8	121.7	41.3	41.3	54.7	54.9	30.5	29.6	18.1	18.3
7	28.1	28.1	32.2	31.9	18.3	18.3	49.7	50.0	30.5	29.6	34.2	34.3
8	134.1	134.3	32.0	31.9	53.2	53.1	48.3	48.6	30.4	29.2	40.8	40.8
9	133.6	133.8	50.2	50.1	37.5	37.5	46.3	46.6	30.3	29.7	50.6	50.4
10	39.0	39.2	36.6	36.5	59.5	59.5	41.7	42.0	30.2	29.7	37.2	37.2
11	21.6	21.7	21.1	21.0	35.7	35.6	40.0	40.3	28.6	29.7	20.9	20.9
12	28.3	28.3	39.8	39.8	30.6	30.5	38.2	38.5	28.6	29.7	25.9	25.1
13	44.2	44.4	42.1	42.1	38.3	38.3	38.0	38.3	28.2	29.0	38.9	38.8
14	50.2	50.3	56.8	56.7	39.7	39.7	37.3	37.6	31.6	31.9	42.5	42.8
15	31.2	31.1	24.4	24.3	32.5	32.4	36.5	36.7	22.0	22.7	27.4	27.4
16	29.9	29.9	28.3	28.2	36.1	36.0	36.1	36.4	14.4	14.1	35.6	35.6
17	49.7	49.9	56.1	56.0	30.1	30.0	33.7	34.0			42.6	43.0
18	15.7	15.7	12.1	11.9	42.8	42.8	31.4	31.7			49.3	48.3
19	20.2	20.3	19.4	19.4	35.4	35.4	29.8	30.1			47.5	48.0
20	36.0	36.0	36.2	36.1	29.8	28.2	29.0	29.2			150.5	150.9
21	19.0	19.1	18.9	18.8	32.8	32.8	27.8	28.1			29.8	29.8
22	35.6	35.6	34.0	33.9	39.3	39.3	26.9	27.2			40.7	40.0
23	24.8	24.7	26.1	26.0	6.97	6.8	24.8	25.1			28.1	28.0
24	125.3	125.4	45.9	45.8	14.7	14.7	20.2	20.5			15.5	15.3
25	131.0	131.0	29.2	29.1	18.0	18.0	18.6	19.0			16.1	16.1
26	17.8	17.8	19.1	19.0	20.3	20.3	17.7	18.0			16.1	16.0
27	25.9	25.9	19.9	19.8	18.8	18.7	15.7	16.0			14.2	14.5
28	24.6	24.6	23.1	23.0	32.0	32.1	15.5	15.8			18.0	18.0
29	28.2	28.2	11.9	11.8	35.1	35.0	15.8	15.7			109.8	109.3
30	15.8	15.8			31.9	31.8	14.1	14.4			19.8	19.3

Exp.: Experimental; Rep.: Reported

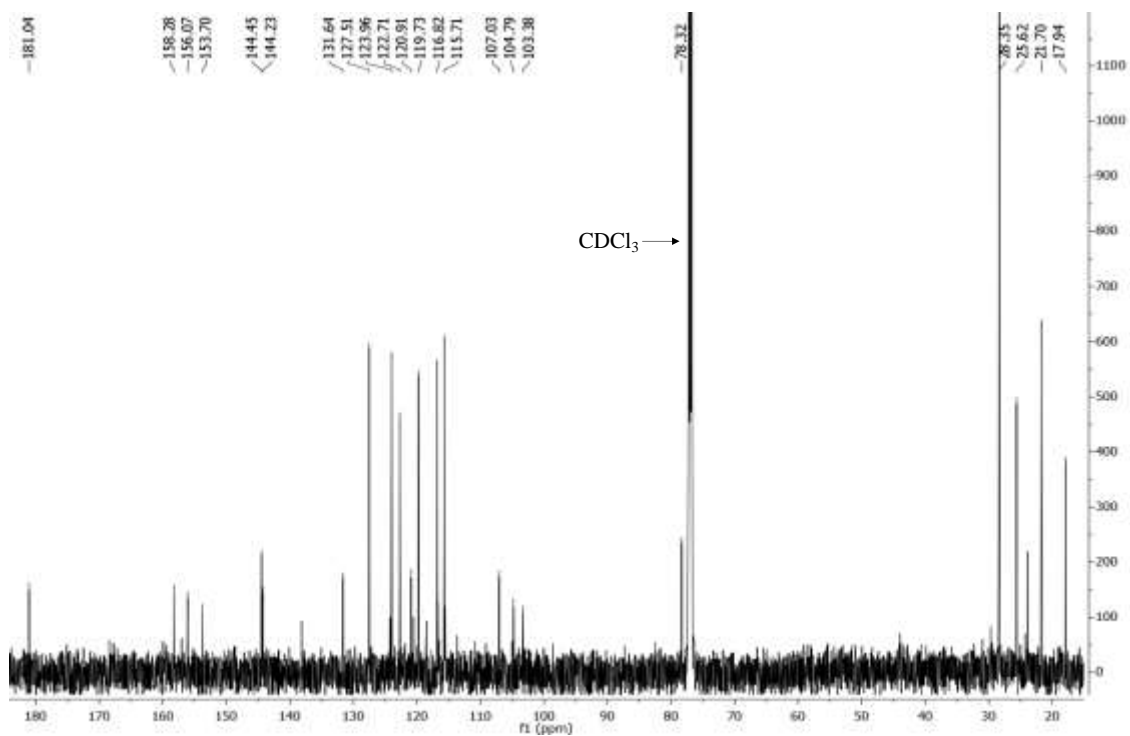
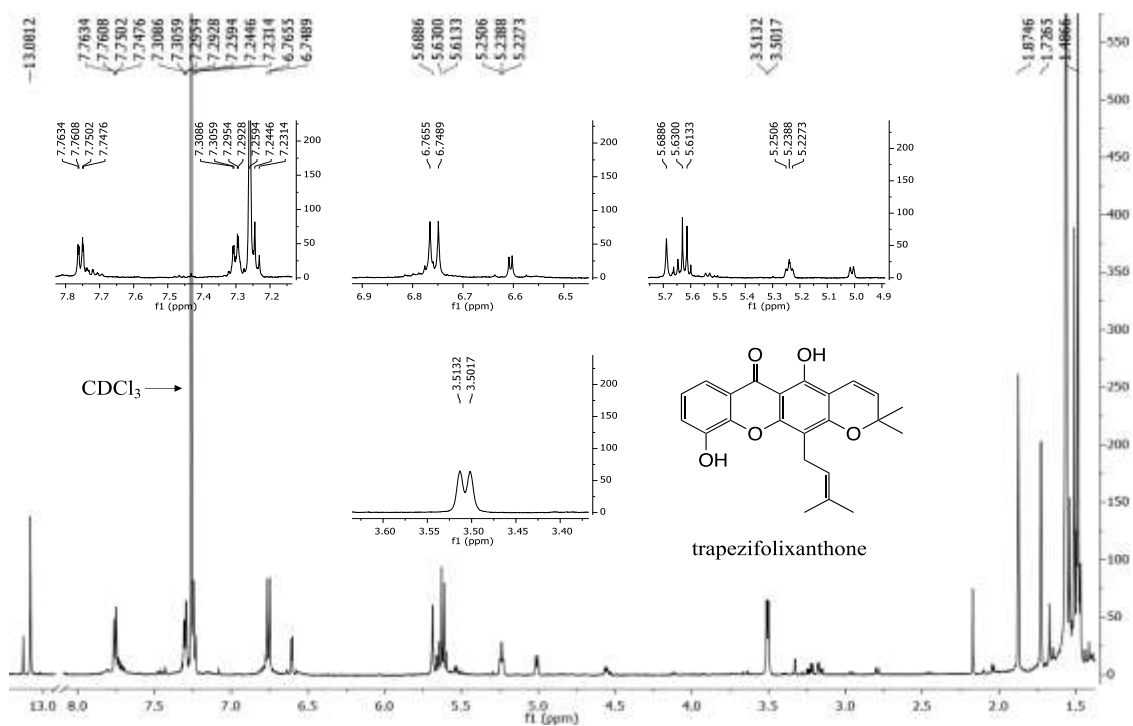
<sup>f</sup>Silva *et al.*, 2018; <sup>a</sup>Nyigo *et al.*, 2016; <sup>e</sup>Tesemma *et al.*, 2013; <sup>c</sup>Sousa *et al.*, 2012; <sup>d</sup>Pohjala *et al.*, 2009; <sup>b</sup>Jan-Michael y Ragasa, 2004.

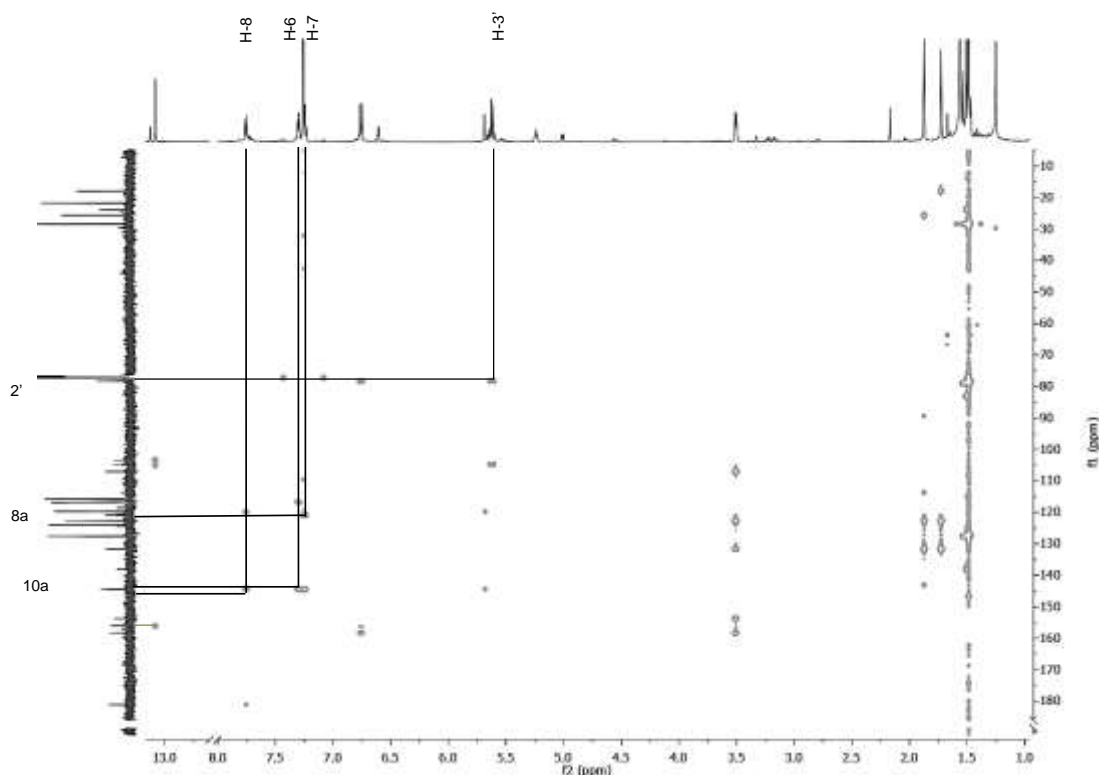
**Table 0.4** S2. First 20 predicted NPs from the  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication analysis results (CDB) of fraction **B5**.

Rank	Name	Score (carbon match)
1	n-eicosane	1.0 (20/20)
2	Pentacosane	1.0 (25/25)
3	Hexacosane	1.0 (26/26)
4	Myristic acid	1.0 (14/14)
5	Stearic acid	1.0 (18/18)
6	Palmitic acid	0.94 (15/16)
7	Oleic acid	0.89 (16/18)
8	Palmitoleic acid	0.88 (14/16)
9	Betulinal	0.87 (26/30)
10	Betulonic acid	0.87 (26/30)
11	Betulonic acid	0.83 (25/30)
12	Arachidic acid	0.8 (16/20)
13	Linoleic acid	0.78 (14/18)
14	8-deoxygartanin	0.78 (18/23)
15	Allobetulinlactone-3-acetate	0.75 (24/32)
16	Erythrinasinat-B	0.74 (28/38)
17	Isostearic acid	0.72 (13/18)
18	5,7-dihydroxy-2-(heptaecosanyl)chromone	0.72 (26/36)
19	Lanost-8-ene-3,24,25-triol	0.67 (20/30)
20	Glutinol	0.67 (20/30)

**Table 0.5** S3. First 20 predicted NPs from the  $^{13}\text{C}$ -NMR dereplication analysis results (CDB) of fraction **B11**.

Ranked out of 25	Name	Score (carbon match)
1	Palmitoleic acid	0.81 (13/16)
2	Paralycolin B	0.77 (17/22)
3	Betulinal	0.77 (23/30)
4	Betulonic acid	0.77 (23/30)
5	Stearic acid	0.72 (13/18)
6	Cedrelin A	0.7 (16/23)
7	Betulonic acid	0.7 (21/30)
8	Allobetulinlactone-3-acetate	0.66 (21/32)
9	10H-Phenanthro[3,2-b]pyran-7-ol,	0.63 (15/24)
10	Lanost-8-ene-3,24,25-triol	0.63 (19/30)
11	Lanosterol	0.63 (19/30)
12	Oleic acid	0.61 (11/18)
13	Euphol	0.6 (18/30)
14	(20R,23E)-Eupha-8,23-dien-3fl,25-diol	0.6 (18/30)
15	Cedrelin B	0.58 (14/24)
16	Lanosta-8,25-diene-3,24-diol,	0.57 (17/30)
17	Linoleic acid	0.56 (10/18)
18	Tri-O-methylparalycolin B	0.56 (14/25)
19	Paralycolin A	0.55 (12/22)





**Figure 0.5 S6.** HMBC experiment of trapezifolixanthone (TPX).



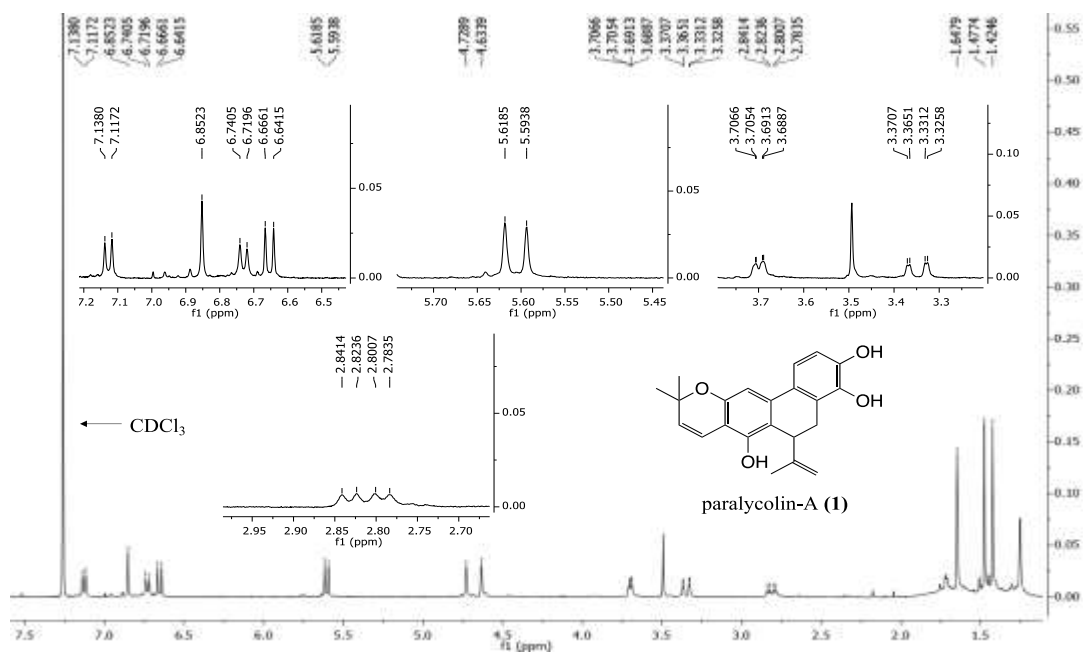


Figure 0.6 S7. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectrum of paralycolin A (1).

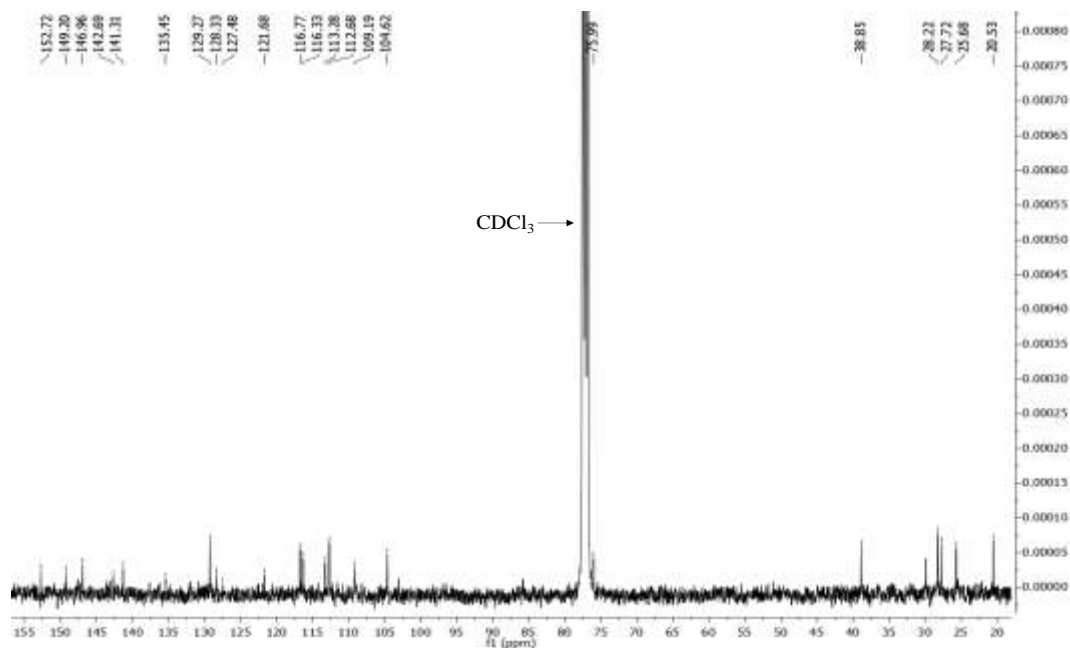


Figure 0.7 S8. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectrum of paralycolin A (1).

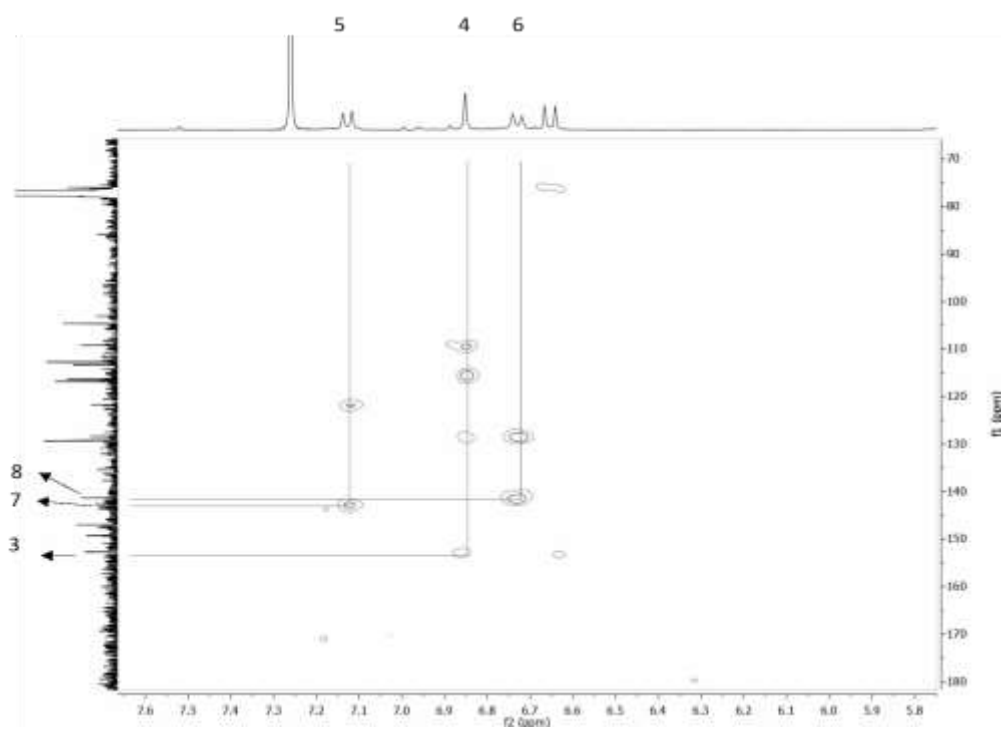


Figure 0.8 S9. Gradient-enhanced-HMBC experiment of paralycolin A (1).

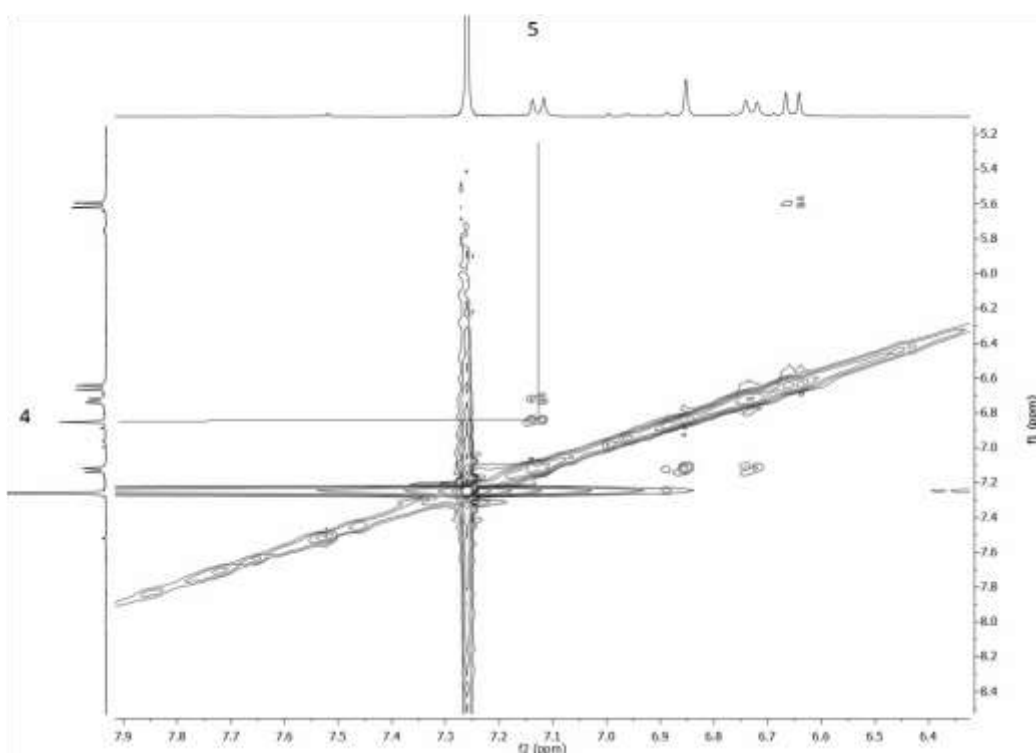
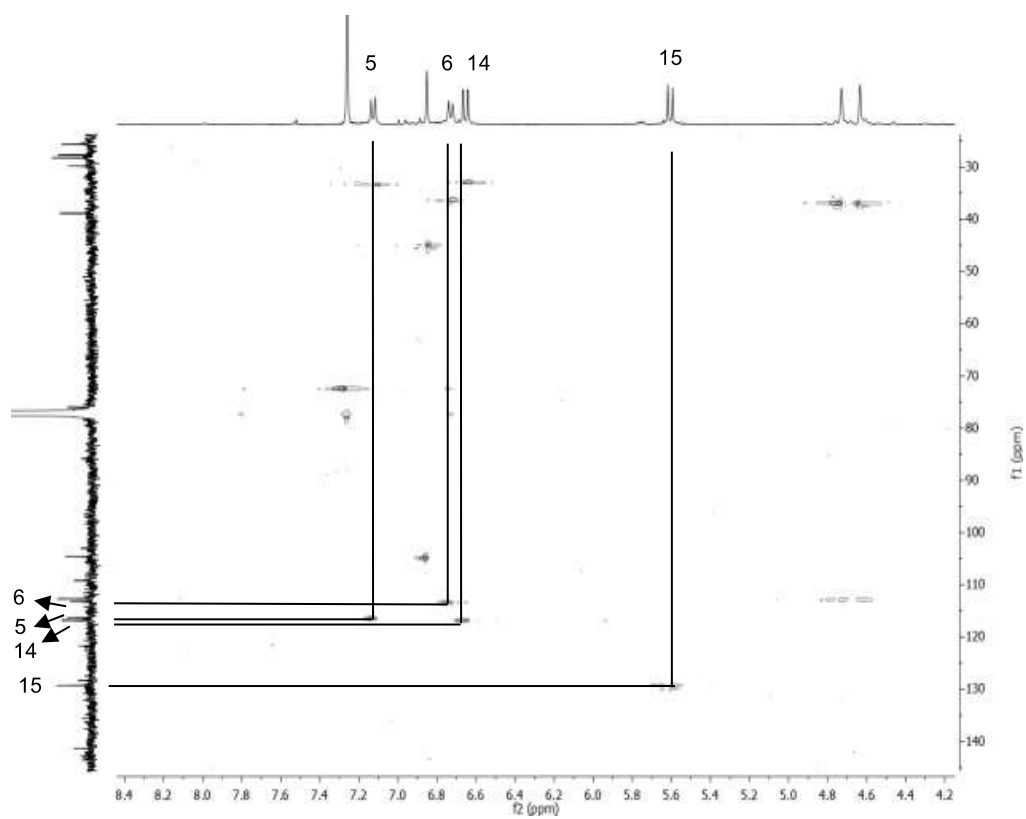


Figure 0.9 S10. NOESY experiment of paralycolin A (1).



**Figure 0.10 S11.** HSQC experiment of paralycolin A (1).

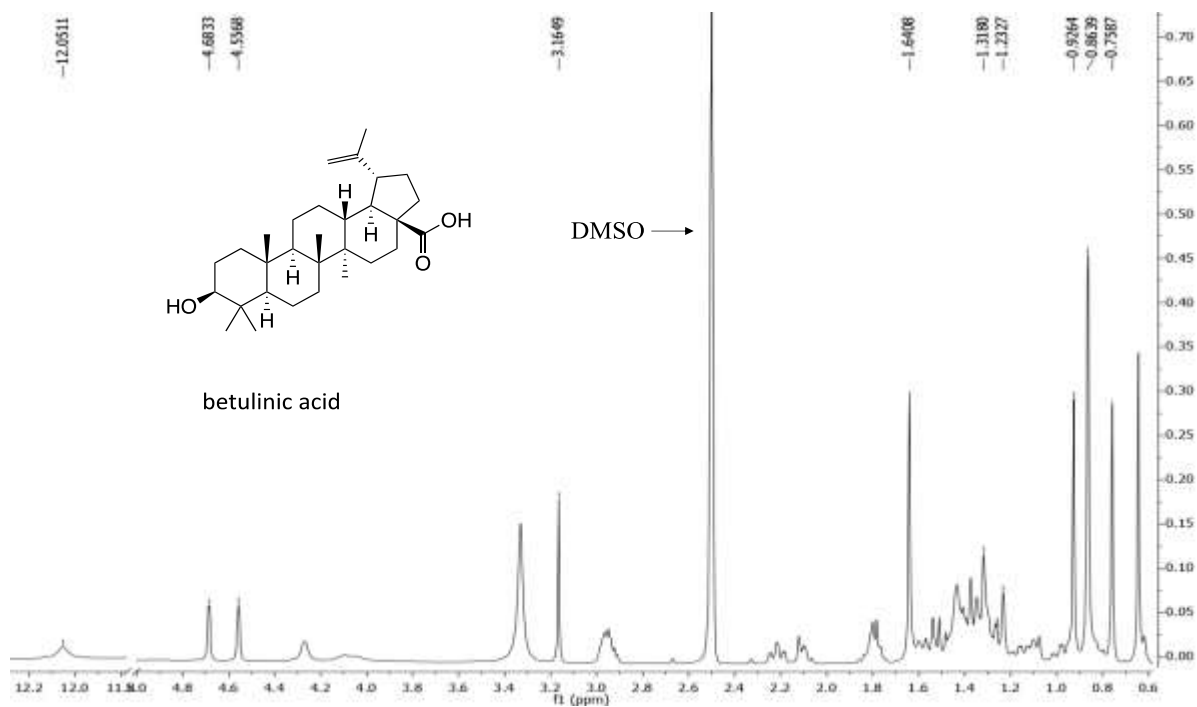


Figure 0.11 S12.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, DMSO) spectrum of betulinic acid.

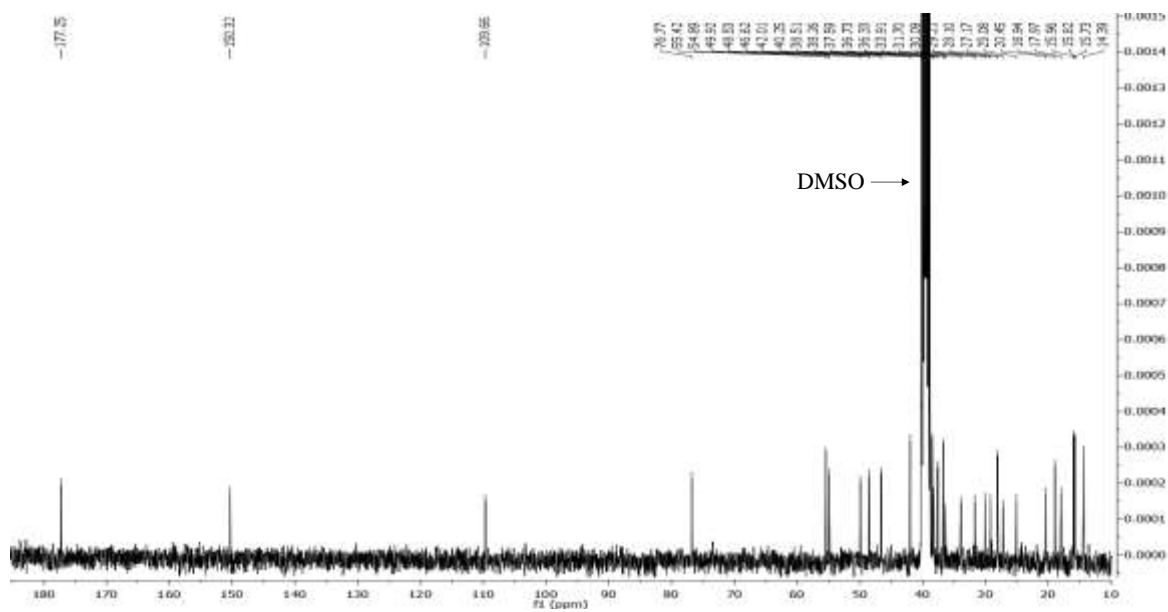


Figure 0.12 S13.  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, DMSO) spectrum of betulinic acid.

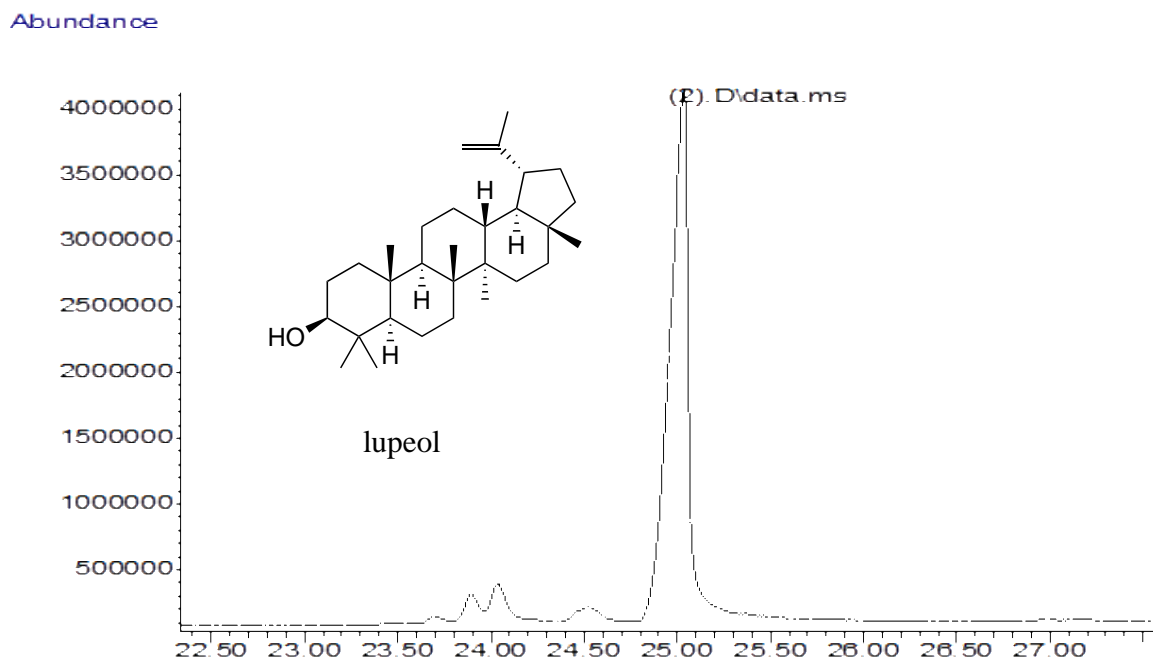


Figure 0.13 S14. GC-MS chromatographic profile of lupeol.

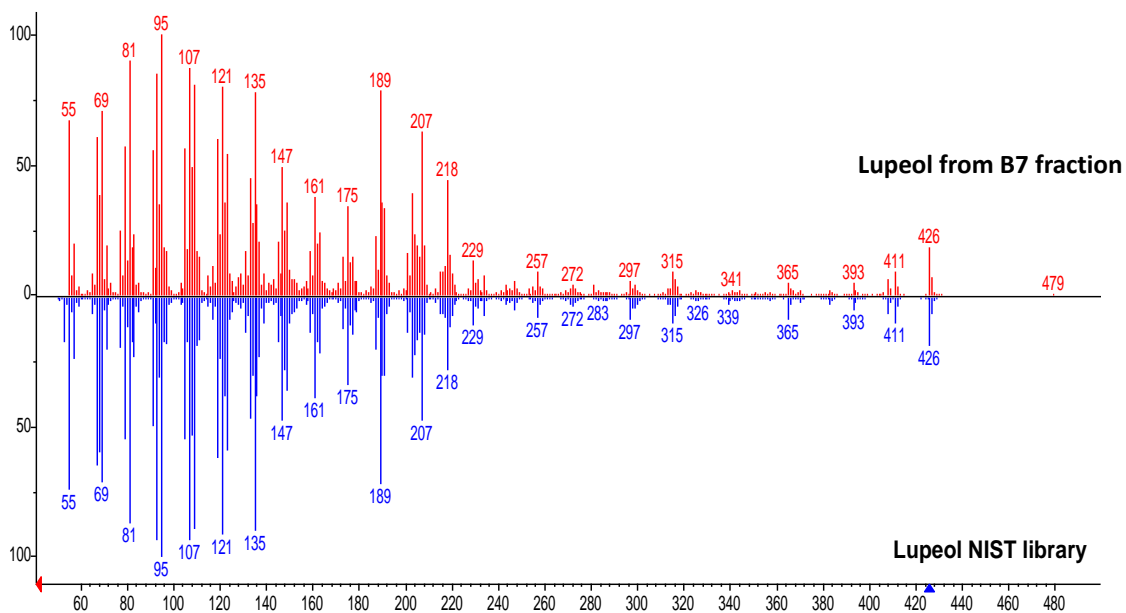


Figure 0.14 S15. Fragmentation pattern of lupeol.

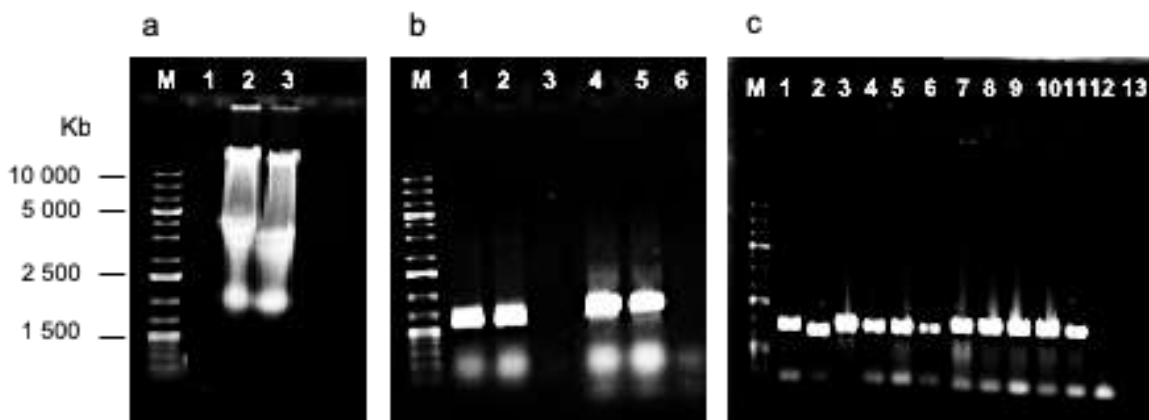
### 6.2.1. PURIFICATION DETAILS OF LUPEOL AND BETULINIC ACID

The lupeol and betulinic acid were isolated in pure form from fractions **B7** and **B9**, respectively. Fraction **B7** was purified by gel permeation chromatography (Sephadex-LH20, GE, Healthcare; 60 × 1.5 cm column), eluting with a mixture of *n*-hexane/chloroform/MeOH (40:20:20, v/v) to yield **B33a-i** fractions. Fraction **B33c** was subjected to silica gel (E.M. Merck, 70-230 mesh) open column (30 × 1 cm) chromatography purification, eluting with mixtures of increasing polarity of *n*-hexane/EtOAc/MeOH to produce six chromatographic fractions. The single component in fraction **B34a** was identified by GC-MS as lupeol. Similarly, flash column (60 cm × 1.5 cm) chromatography purification of fraction **B9**, eluting with mixtures of *n*-hexane/EtOAc/MeOH of increasing polarity, produced nine semipurified fractions. The main component in fraction **B35a** was identified as betulinic acid by comparing it with an authentic sample.

## 6.2.2. BIBLIOGRAFÍA ANEXO 2

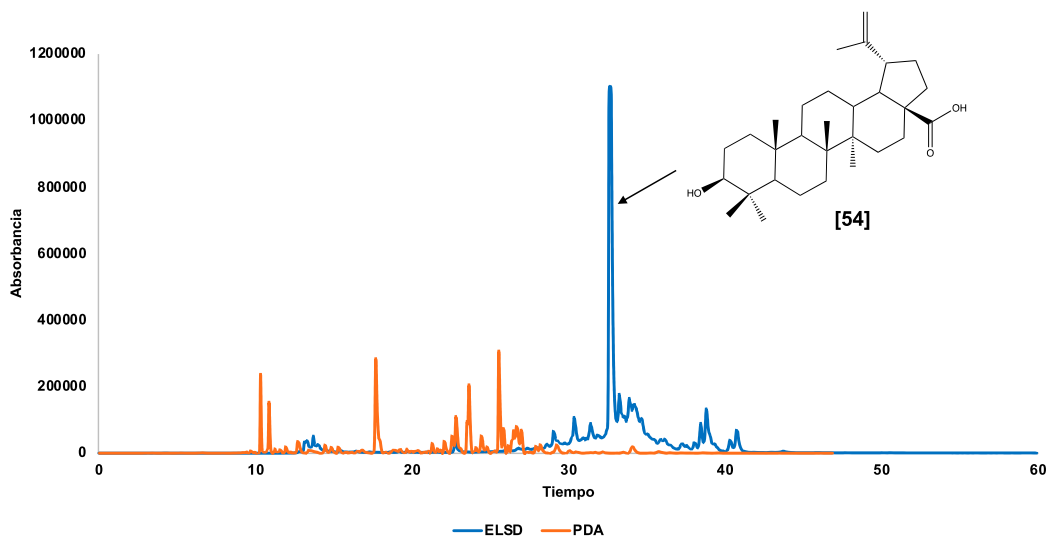
- Jan-Michael, C.C., Ragasa, C.Y. (2004) Structure elucidation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from *Sesbania grandiflora* Linn Pers. and  $\beta$ -carotene from *Heliotropium Indicum* Linn. by NMR Spectroscopy. *Kimika*, 20, 5-12.
- Nyigo, V.A., Peter, X., Mabiki, F., Malebo, H.M., Mdegela, R.H., erda Fouche, G., abiki, F. M., M alebo, H. M., M degela, R. H., Fouche, G. (2016). Isolation and Identification of Euphol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens*. *J. Phytopharmacol*, 5, 100-104.
- Sousa, G.F., Duarte, L.P., Alcântara, A.F.C., Silva, G.D.F., Vieira-Filho, S.A., Silva, R.R., Oliveira, D.M., Takahashi, J.A. (2012). New triterpenes from *Maytenus robusta*: Structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. *Molecules*, 17, 13439-13456..
- Pohjala, L., Alakurtti, S., Ahola, T., Yli-Kauhaluoma, J., Tammela, P., Betulin-Derived. (2009). Compounds as inhibitors of alphavirus replication. *Journal of Natural Products*, 72, 1917-1926.
- Tesemma, M., Adane, L., Tariku, Y., Muleta, D., Demise, S. (2013). Isolation of compounds from acetone extract of root wood of *Moringa stenopetala* and evaluation of their antibacterial activities. *Journal of Medicinal Plants*, 7, 32-47.
- Silva, A.T.M.E., Magalhães, C.G., Duarte, L.P., Mussel, W.N., Ruiz, A.L.T.G., Shiozawa, L., Carvalho, J.E., Trindade, I.C., Vieira Filho, S.A. (2018). Lupeol and Its esters: NMR, powder xrd data and in vitro evaluation of cancer cell growth. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53, 1-10.

## 6.3. Anexo 3



**Figura 0.15** Extracción de ADN de *C. flava* y *C. suborbicularis*. ADN genómico (a), marcador molecular (M), blanco (1), PL1 (2), SK1 (3). PCR de EF-1 $\alpha$  e ITS (b), amplicon EF-1 $\alpha$  de PL1 (1) y SK1 (2), blanco (3), amplicon-ITS de PL1 (4) y SK1 (5), blanco (6).

Las secuencias correspondientes al factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ) se depositaron en el GenBank con número de accesión MT407472, MT407473, MT407474.



**Figura 0.16** Perfil cromatográfico mediante HPLC-PDA y HPLC-ELSD. Se muestra la fracción de mediana polaridad **B** donde se aprecia al ácido betulínico como el componente mayoritario. La identificación de ácido betulínico se realizó mediante comparación con los tiempos de retención del metabolito puro.