



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

”Identificación de metabolitos secundarios producidos por
Garcinia intermedia (Pittier) Hammel y *Calophyllum*
brasiliense Cambess”

Tesis que presenta

Mar Anabel Pérez Povedano

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Mar Anabel Pérez Povedano** titulado **Identificación de metabolitos bioactivos producidos por *Calophyllum brasiliense* Cambess y *Garcinia intermedia* (Pittier) Hammel**, fue realizado en la **Unidad de Biotecnología, en la Línea de Productos Naturales del laboratorio de Química Orgánica** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región al demostrar el potencial de la flora de la península como fuente de productos naturales bioactivos.

Atentamente




Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de febrero de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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.

Firma:  _____

Nombre: Mar Anabel Pérez Povedano

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

AGRADECIMIENTOS

Una tesis no es trabajo de una sola persona, por ello, me gustaría expresar mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra manera influyeron, participaron y/o ayudaron a que esto llegara a buen término...

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de esta investigación (Beca de maestría, número de CVU: 766387).

Al CICY y al laboratorio de Química Orgánica por el uso de instalaciones, materiales, equipos y demás.

A los miembros de mi comité tutorial y/o revisión de tesis, los doctores Luz María Calvo, Séverine Derbré, Gumersindo Mirón López y Sergio Peraza Sánchez, por haberse hecho un espacio entre sus deberes para revisar y evaluar mis avances, por sus consejos para mejorar mi presentación y escrito y por su valioso tiempo.

Al doctor Luis Manuel Peña Rodríguez por haberme dado un espacio en su grupo de trabajo, por sus consejos y orientación que contribuyeron a mi trabajo.

A la técnica, QBB. Karlina García por su apoyo en el laboratorio.

Al técnico Gabriel Dzib por su gran ayuda, profesionalismo, conocimientos y amabilidad durante la colecta en Calakmul.

Al laboratorio SONAS de la Universidad de Angers, Francia y, especialmente, a la doctora Derbré por el apoyo para la realización de los análisis de RMN.

A la maestra Juana María Gonzáles Colunga, responsable de la biblioteca del CIDETEQ y a Sergio de Jesús Pérez, responsable de la biblioteca del CICY por su apoyo para poder tener acceso a la base de datos SciFinder.

Al Pbro. Óscar Viñas Olvera y al personal de la iglesia Templo Expiatorio de la Consolación Monjas (iglesia de Monjas) por el permiso para la colecta de *C. brasiliense* (Mérida).

A los amigos del Club de Peggy por las horas de comida, café y convivencia dentro y fuera del laboratorio que hicieron ameno y divertido mi paso por el posgrado. En especial quiero agradecer a Stephy y Maricarmen por su apoyo para analizar mis muestras durante sus respectivas estancias y a Lina Fernanda por su orientación para usar el MixONat.

A mis queridas amigas Nahomi y Silvia por su increíble apoyo y soporte durante el caos de las asignaturas. Fue tan valioso conocerlas, con todo mi cariño... ¡Mil gracias!

A los amigos, tíos, sobrinos, familia política, conocidos y demás por su apoyo, por las porras, los ánimos y, sobre todo, el cariño.

Thank you Alexandra :)

Gracias a Dios por estar aquí y por poner en mi camino a personas extraordinarias.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a los pilares de mi vida, porque sin ustedes, sin su apoyo y su amor la vida no sería tan bonita...

A Yabi y Arturito, gracias por estar siempre para mí, por la vida tan amorosa que me regalaron. Yabi, gracias por ser siempre mi animadora número uno, por ser una gran mujer, fuerte y cariñosa, que me enseñó con el ejemplo. Arturito gracias por el esfuerzo que siempre pusiste para asegurarme una educación, por enseñarme que podía ser más que el rol tradicional que se esperaba. Mamá, papá, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanitos, Cora y Dany, y a mis sobrinos, Cho y Cass. Su compañía significa mucho para mí, los quiero a montones. Mis amiguitos Dany, Cho y Cass, ustedes son la luz de mi vida, pedacitos de mi corazón y siempre estaré para ustedes.

A mi súper amiguito, mi compañero de vida, nunca podría expresar lo suficiente toda mi gratitud por tus valiosos consejos profesionales, eres un gran ejemplo y una inspiración, gracias eternas por centrarme y orientarme cuando se me dispersaban las ideas y la motivación, pero sobre todo gracias por estar ahí, por tu amor, por prestar oídos, por festejar mis logros y por el maravilloso tiempo juntos...gracias por seguir pintando mi vida de colores después de tantos años.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 FAMILIA CLUSIACEAE.....	3
1.1.1 Fitoquímica del género <i>Garcinia</i>	3
1.1.1.1 Metabolitos secundarios bioactivos aislados de <i>Garcinia intermedia</i>	6
1.1.2 Fitoquímica del género <i>Calophyllum</i>	7
1.1.2.1 Metabolitos secundarios bioactivos aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i>	8
1.1.2.2 Quimiotipos de <i>Calophyllum brasiliense</i>	11
1.2 ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS	14
1.2.1 Análisis de desduplicación	15
JUSTIFICACIÓN.....	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
CAPÍTULO II.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES	19
2.2 ANÁLISIS DE DESDUPLICACIÓN	20
2.3 MATERIAL VEGETAL.....	21
2.3.2 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	22
2.3.3 Partición líquido-líquido	23
CAPITULO III.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25

3.1 METABOLITOS IDENTIFICADOS EN LAS FRACCIONES SEMIPURIFICADAS DE <i>G. intermedia</i>	25
3.2. METABOLITOS IDENTIFICADOS EN LAS FRACCIONES SEMIPURIFICADAS DE <i>C. brasiliense</i> COLECTADO EN CALAKMUL	32
3.3 DETERMINACIÓN DE QUIMIOTIPOS EN <i>C. brasiliense</i>	37
3.3.1 Comparación de los perfiles cromatográficos de extractos y fracciones obtenidos de individuos de <i>C. brasiliense</i> (primera colecta).....	37
3.3.2 Comparación de los extractos y fracciones de corteza y extractos foliares de <i>C. brasiliense</i> (segunda colecta).....	43
CAPÍTULO IV	49
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	49
4.1 CONCLUSIONES	49
4.2 PERSPECTIVAS.....	50
REFERENCIAS	51

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.1 MS aislados de <i>G. daedalanthera</i> con actividad quimioprotectiva y quimioterapéutica	4
Figura 1.2. Xantonas aisladas del pericarpio de frutos de <i>G. mangostana</i>	5
Figura 1.3. Ácido hidroxycítrico (HCA) aislado de los frutos de <i>G. gummi-gutta</i>	6
Figura 1.4. MS bioactivos de <i>G. intermedia</i>	7
Figura 1.5. MS aislados de diferentes estructuras de la planta <i>C. brasiliense</i>	9
Figura 1.6. Xantonas aisladas de la corteza de <i>C. brasiliense</i>	10
Figura 1.7. Xantonas identificadas en la corteza de <i>C. brasiliense</i> colectada en Yucatán.....	11
Figura 1.8. Cumarinas aisladas de <i>C. brasiliense</i> CT1 con actividad inhibitoria del crecimiento de tumores cancerígenos	12
Figura 1.9. Cumarinas con actividad inhibitoria de la VIH-1 RT aisladas de las hojas de <i>C. brasiliense</i> CT2	13
Figura 1.10. Perfiles cromatográficos (TLC; Hx:An, 80:20; a/b visualizados con reactivo de ácido fosfomolibdico, c/d visualizados con DPPH) de fracciones semipurificadas de dos individuos de <i>C. brasiliense</i> colectados en dos localidades: Mérida (CBM) y Calakmul (CBC) (tomado de Silva-Castro, 2020).....	14
Figura 3.1. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción GFACVC.....	25
Figura 3.2. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción GFACVD.....	26
Figura 3.3. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción GFACVB.....	27
Figura 3.4. Resultados del análisis de desduplicación para la fracción GFHCVF	28
Figura 3.5. Parte de los resultados del análisis de desduplicación de la fracción GFHCVC	31
Figura 3.6. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción FAcCCVD	33
Figura 3.7. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción FAcCCVK	34

Figura 3.8. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción FHCCVJ empleando tres bases de datos diferentes.....	36
Figura 3.9. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción FAcCCVF.....	36
Figura 3.10. Perfil cromatográfico de los extractos crudos y fracciones de baja (FHC) y mediana (FAc) polaridad de <i>C. brasiliense</i> . M: Mérida, CC: Co-cromatografía, C: Calakmul	37
Figura 3.11. Perfiles cromatográficos (HPLC) del extracto crudo de corteza (a) y de las fracciones de baja (b) y mediana (c) polaridad del individuo de <i>C. brasiliense</i> colectado en Mérida.....	38
Figura 3.12. Perfiles cromatográficos (HPLC) del extracto de corteza (a) y de las fracciones de baja (b) y mediana (c) polaridad del individuo de <i>C. brasiliense</i> colectado en Calakmul.....	39
Figura 3.13. Comparación de los perfiles cromatográficos de los extractos crudos de <i>C. brasiliense</i> de Mérida y Calakmul.....	41
Figura 3.14. Comparación de los perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC, de los extractos crudos de la muestra de Mérida (en negro) y la de Calakmul (en azul)	42
Figura 3.15. Perfil cromatográfico extractos y fracciones obtenidos a partir de la corteza de individuos de <i>C. brasiliense</i> colectados en el segundo muestreo. CC: Co cromatografía, M: Mérida, C: Calakmul.....	44
Figura 3.16. Comparación de los perfiles cromatográficos extractos de corteza de <i>C. brasiliense</i> colectada en el primer (1) y en el segundo (2) muestreo. CC: Co cromatografía.....	44
Figura 3.17. Perfiles cromatográficos de extractos de hojas de <i>C. brasiliense</i> colectados en Mérida (M) y Calakmul (C). CC: Co cromatografía	46
Figura 3.18. Comparación entre los perfiles cromatográficos de los extractos de baja polaridad de las hojas de <i>C. brasiliense</i> colectadas en Mérida (M) y en Calakmul (C) y el estándar de macluraxantona (S), empleando dos sistemas de elución diferentes y revelados con ácido fosfomolibdico (a) y DPPH (b y c).....	46
Tabla 3.1 Datos espectroscópicos experimentales (400 MHz, CDCl ₃) y reportados de ¹³ C-RMN de la mezcla de aristofenonas A y B.....	29

Tabla 3.2. Datos espectroscópicos experimentales (400 MHz, CDCl₃) y reportados de ¹³C-RMN para calanólido E y ácido isoapetálico35

RESUMEN

La familia Clusiaceae es un grupo taxonómico del cual se ha aislado una gran variedad de metabolitos secundarios con actividades biológicas importantes, particularmente de los géneros *Calophyllum* y *Garcinia*, en los que se ha reportado la presencia de metabolitos con potencial farmacéutico y agrícola. En la flora de la Península de Yucatán se reporta la existencia de seis especies vegetales pertenecientes a la familia Clusiaceae, incluyendo *C. brasiliense* Cambess y *G. intermedia* (Pittier) Hammel, las cuales no han sido suficientemente estudiadas en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos. Recientemente, como parte de un proyecto dirigido al estudio de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae como fuente de nuevos productos con aplicación en las áreas de farmacia o agricultura, un estudio fitoquímico preliminar de *G. intermedia* detectó la presencia de componentes con actividad antioxidante en fracciones semipurificadas del extracto de corteza. Por otra parte, y aun cuando el estudio fitoquímico inicial de *C. brasiliense* asistido por desduplicación resultó en la identificación de diferentes xantonas, se observaron diferencias significativas en los perfiles cromatográficos de las fracciones semipurificadas obtenidas de extractos de corteza de individuos pertenecientes a dos localidades diferentes (Mérida y Calakmul), sugiriendo la existencia de dos quimiotipos de *C. brasiliense* en la península de Yucatán. Con base en lo anterior, en este trabajo se utilizó la desduplicación por ^{13}C -NMR como herramienta para identificar MS presentes en las fracciones semipurificadas de *G. intermedia* y de *C. brasiliense* y se analizaron los perfiles cromatográficos (TLC y HPLC) de extractos foliares de dos individuos de *C. brasiliense* con el fin de establecer la relación quimiotaxonómica entre los individuos. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de aristofenonas, escualeno y fitoesteroles como β -sitosterol y estigmasterol, además de la identificación de fracciones ricas en metabolitos de tipo xantona y PPAPS en *G. intermedia*. De la misma forma, los estudios de desduplicación por ^{13}C -RMN de fracciones semipurificadas del individuo de *C. brasiliense* colectado en Calakmul permitieron detectar la presencia de calanólido E, ácido isoapetálico, α -amirina, y los fitoesteroles previamente mencionados. Por último, los resultados de los análisis cromatográficos de extractos y fracciones semipurificadas de individuos de *C. brasiliense* colectados en las dos poblaciones existentes en Yucatán no mostraron diferencias significativas entre los perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones semipurificadas de corteza de las dos localidades, pero sí en los perfiles de los extractos foliares.

ABSTRACT

The Clusiaceae family is a taxonomic group from which a wide variety of bioactive secondary metabolites have been isolated, particularly from the *Calophyllum* and *Garcinia* genera, the presence of metabolites with pharmaceutical and agricultural potential has been reported. In the flora of the Yucatan Peninsula there are six species belonging to the Clusiaceae family, including *C. brasiliense* Cambess and *G. intermedia* (Pittier) Hammel, which have not been sufficiently studied in terms of their production of bioactive metabolites. Recently, as part of a project aimed at studying species belonging to the Clusiaceae family as a source of new products with application in pharmacy or agriculture, a preliminary phytochemical study of *G. intermedia* detected the presence of components with antioxidant activity in semi-purified fractions from the bark extract. On the other hand, and even when the initial phytochemical study of *C. brasiliense* assisted by dereplication resulted in the identification of different xanthenes, significant differences were observed in the chromatographic profiles of the semi-purified fractions obtained from bark extracts from individuals belonging to two different localities, Mérida and Calakmul, suggesting the existence of two chemotypes of *C. brasiliense* in the Yucatan peninsula. In this investigation, ¹³C-NMR dereplication was used to identify SM present in the semi-purified fractions of *G. intermedia* and *C. brasiliense*; additionally, chromatographic profiles (TLC and HPLC) of foliar extracts of two individuals of *C. brasiliense* were compared to determine the chemotaxonomic relationship between the individuals. The results obtained showed the presence of aristophenones, together with the terpenoids squalene, β -sitosterol and stigmasterol, as well as several fractions rich in novel xanthone-type metabolites and PPAPS, in *G. intermedia*. Similarly, ¹³C-NMR dereplication of the semi-purified fractions of *C. brasiliense* collected in Calakmul allowed to detect the presence of calanolide E, isoapetalic acid, α -amyrin, and the previously mentioned phytosterols. Finally, the results of the chromatographic analyses of extracts and semi-purified fractions of individuals of *C. brasiliense* collected in the two existing populations in Yucatan did not show significant differences between the chromatographic profiles of the bark extracts and semi-purified bark fractions from the two collection sites, the profiles of the foliar extracts did show some differences.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos, el ser humano se ha valido de los recursos naturales para satisfacer sus necesidades de alimentación, refugio y salud. Las plantas, al ser el recurso más disponible, han jugado un papel fundamental en el desarrollo de la civilización, ya que desde el momento mismo en el que aparecieron los primeros problemas de salud, surgió la necesidad de buscar soluciones (Karpuz *et al.*, 2020), dando lugar al desarrollo y el establecimiento de la medicina tradicional.

Se ha demostrado que la efectividad de la mayoría de los remedios tradicionales basados en el uso de plantas se debe a la presencia de pequeñas moléculas orgánicas, responsables de la actividad biológica, conocidas actualmente como metabolitos secundarios (MS); los MS no están implicados en las funciones vitales del organismo, como la reproducción y el crecimiento, pero sí son reconocidos por su importante contribución a la supervivencia de las plantas, ya que participan en los procesos de adaptación del organismo a su ambiente, promueven el establecimiento de relaciones simbióticas beneficiosas, actúan como atrayentes de polinizadores y dispersores de frutos y semillas y juegan un papel clave en los mecanismos de defensa de las plantas contra depredadores y los rayos UV (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

El interés por el estudio de los MS deriva, en parte, del hecho de que la mayoría de estos productos poseen algún tipo de actividad biológica, siendo las más atractivas la actividad antibacteriana, la antiviral, la antifúngica, la antiparasitaria, la antioxidante y la anticancerígena, entre otras (Newman y Cragg, 2016; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Adicionalmente, el estudio de los MS es de particular interés debido a que se han observado patrones de distribución dentro de grupos taxonómicos cercanos, lo que ha dado lugar al desarrollo de investigaciones en biología evolutiva para encontrar relaciones entre los diferentes organismos que sintetizan estos productos y entre los organismos y su ambiente, con la finalidad de entender el equilibrio ecológico de un ecosistema y las relaciones evolutivas entre los organismos y su producción de MS (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006).

El potencial de los productos naturales de origen vegetal en las industrias alimenticia, cosmética, agrícola y farmacéutica está ampliamente documentado en la literatura, reportándose que, en un periodo de cuatro años, se desarrollaron 26 nuevos fármacos que son usados para el tratamiento de diversas enfermedades y padecimientos (Lam, 2007). Los MS deben su efectividad como fármacos al hecho de que son creados y desarrollados en un sistema biológico por lo cual son

afines a proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, siendo este uno de los requisitos fundamentales para cualquier medicamento, además de tener las dimensiones moleculares adecuadas para sortear las barreras biológicas y llegar a las células y órganos donde van a actuar (Jiménez, 2013). Estas características le confieren a los MS una ventaja al ser usados como cabeza de serie o punto de partida para el desarrollo de nuevos medicamentos que permitan mejorar la calidad de vida de la población.

Los MS también han demostrado su utilidad en la industria agrícola, al ser una alternativa prometedora a los pesticidas convencionales usados para el control de agentes fitopatógenos. En el mundo hay más de mil pesticidas con efectos toxicológicos variados que causan daños importantes en el medio ambiente y a las personas (WHO, 2018). Frente a estos problemas, los biopesticidas o los pesticidas verdes, preparados a base de microorganismos vivos o de MS, representan una alternativa importante al reducir significativamente los efectos adversos en los ecosistemas y en la salud (Chandler *et al.*, 2011; Gupta y Dikshit, 2010).

Actualmente, una de las familias de mayor interés comercial y farmacológico es la familia Clusiaceae, de la que se ha reportado un importante número de MS con diferentes tipos de actividad biológica (Gunter *et al.*, 2020; Resende *et al.*, 2018). Así, los frutos de *Garcinia gummi-gutta* constituyen una importante fuente de ácido hidroxícítrico (HCA), un MS muy popular en los productos comerciales para la pérdida de peso (Guillén-Enríquez *et al.*, 2018). Asimismo, recientemente esta familia ha llamado la atención de la industria farmacéutica debido a que algunas especies de sus géneros son productoras de calanólidos, inophyllums y cordatólidos, reconocidos por su actividad inhibitoria del VIH Tipo 1 (García-Zebadúa *et al.*, 2011).

En este trabajo se describe el uso de la desduplicación por ^{13}C -RMN para la identificación de metabolitos bioactivos en fracciones semipurificadas de la corteza de *G. intermedia* Pittier (Hammel) y para el establecimiento de la relación quimiotaxonómica entre individuos de poblaciones de *C. brasiliense* Cambess existentes en dos regiones diferentes de la península de Yucatán.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 FAMILIA CLUSIACEAE

La familia Clusiaceae, también conocida como Guttiferae (Almeida-Lima y Teixeira, 2017), comprende un vasto grupo de árboles tropicales, arbustos y plantas herbáceas. Está compuesta por cerca de 50 géneros y 1,200 especies (De Melo *et al.*, 2014); los estudios fitoquímicos realizados en especies que pertenecen a esta familia han reportado, con mayor frecuencia, la presencia de xantonas, cumarinas, biflavonoides y benzofenonas, ya que forman parte del arsenal de defensa químico de estas plantas (Acuña *et al.*, 2009).

La familia Clusiaceae tiene un amplio rango de distribución geográfica en las zonas tropicales del mundo. En México se han registrado ocho géneros y 24 especies (Martínez y Pérez *et al.*, 2015); en la Península de Yucatán se encuentran registradas siete especies, incluyendo cuatro del género *Clusia* (*C. lundellii*, *C. flava*, *C. rosea* y *C. suborbicularis*), una del género *Calophyllum* (*C. brasiliense*), una del género *Garcinia* (*G. intermedia*) y una del género *Mammea* (*M. americana*) (Herbert-Doctor *et al.*, 2021; Trejo-Torres y Rodríguez, 2014). Algunas de estas especies son usadas en la medicina tradicional para tratar diferentes padecimientos, por ejemplo, *C. flava* se emplea para aliviar el dolor de cabeza, como medicamento carminativo y para tratar heridas y la sífilis (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007); por su parte, *M. americana* es empleada en la medicina tradicional como insecticida y para eliminar ácaros, piojos y pulgas, también es utilizada para suprimir la tos y para el tratamiento de reumatismo, úlceras e indigestión (Lemus *et al.*, 2021).

1.1.1 Fitoquímica del género *Garcinia*

El género *Garcinia*, con más de 200 especies, es considerado uno de los grupos más grandes y diversos de la familia Clusiaceae (Najib *et al.*, 2017; Jamila *et al.*, 2014); incluye plantas de alto valor farmacéutico con actividades biológicas variadas, siendo las xantonas, flavonoides, terpenos y benzofenonas los MS a los que se les atribuye el potencial terapéutico de este género (Angami *et al.*, 2021; Kuete *et al.*, 2007). En varias regiones del mundo se utilizan las flores, hojas, corteza, frutos y cáscara de *Garcinia* spp. para la elaboración de remedios tradicionales

empleados en el tratamiento de diferentes padecimientos como inflamación, estrés oxidativo, infecciones microbianas, cáncer y obesidad (Hemshekhar *et al.*, 2011).

El conocimiento fitoquímico de varias especies del género *Garcinia* incluye MS bioactivos de interés farmacéutico como algunas xantonas y benzofenonas preniladas que han mostrado una potente actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares en pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* (Kumar *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha reportado que los extractos de *G. daedalanthera* poseen actividad inhibitoria de la α -glucosidasa y actividad antioxidante y su análisis fitoquímico describe la presencia de flavonoides, saponinas, taninos, esteroides y fenoles (Najib *et al.*, 2017). Asimismo, los metabolitos 2,5-dimetil nonadecano y ácido heptadecanoico (Figura 1.1), aislados del extracto de hojas, mostraron actividad quimiopreventiva significativa y de uso prometedor en quimioterapia (Forestrania *et al.*, 2020).

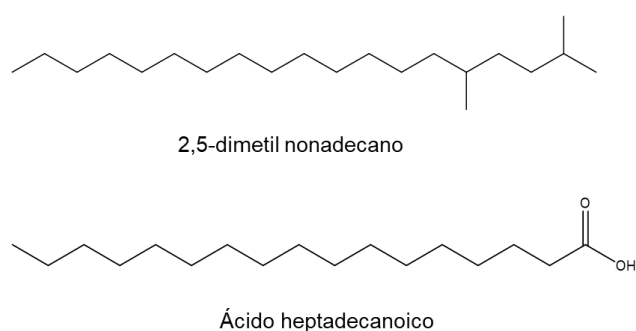


Figura 1.1. MS aislados de *G. daedalanthera* con actividad quimioprotectiva y quimioterapéutica.

La especie más conocida del género *Garcinia* es probablemente *G. mangostana*, comúnmente llamada mangostán. Esta especie es ampliamente utilizada en la medicina tradicional de países del sureste asiático como tratamiento para el dolor abdominal, diarrea, disentería, heridas infectadas y úlceras crónicas; su efectividad se debe a que esta especie es una fuente de taninos, flavonoides y, sobretodo, de xantonas (Krisanti *et al.*, 2021), entre las que destacan α -mangostina, β -mangostina, γ -mangostina, garcinona E, 8-desoxigartanina y gartanina (Figura 1.2), que han mostrado actividad antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria, antialérgica, antibacteriana, antiviral y antifúngica (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008). La actividad biológica de α -mangostina es de particular interés dado que ha mostrado ser un potente antimicótico, con una eficacia similar a la de los tratamientos convencionales contra *Colletotrichum gloeosporioides*,

uno de los hongos fitopatógenos que causan más estragos en los cultivos comerciales alrededor de todo el mundo (Ye *et al.*, 2020).

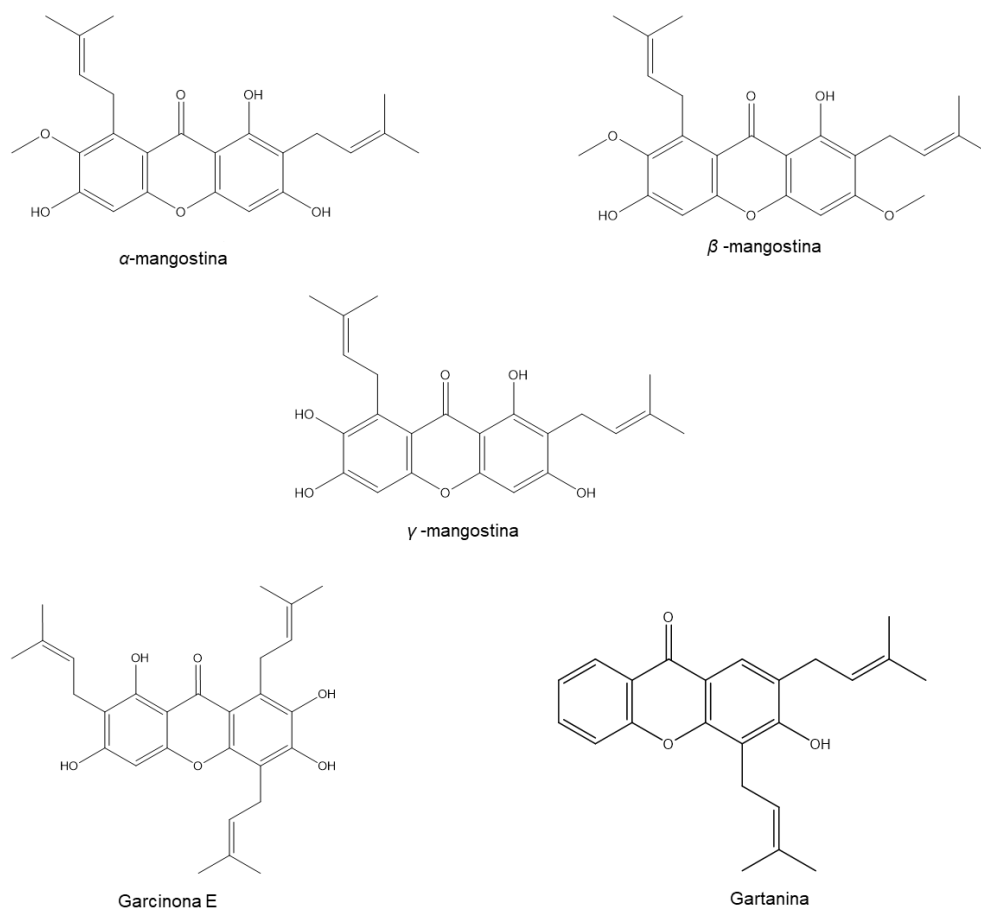


Figura 1.2. Xantonas aisladas del pericarpio de frutos de *G. mangostana*.

Otra especie muy conocida del género *Garcinia* es *G. gummi-gutta*, una planta muy apreciada en el ámbito comercial, aunque es mayormente reconocida por su sinónimo, *G. cambogia*. Esta especie es de las más populares pues sus frutos se usan en una amplia variedad de suplementos alimenticios para la pérdida de peso, siendo el HCA (Figura 1.3), aislado de los extractos de la cáscara del fruto, el producto responsable de esta propiedad (Semwal *et al.*, 2015).

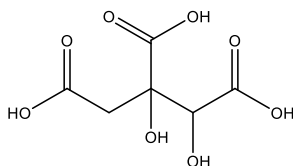


Figura 1.3. Ácido hidroxicátrico (HCA) aislado de los frutos de *G. gummi-gutta*.

Actualmente se ha reportado que los extractos de la corteza de *G. vieillardii* y *G. virgate* poseen actividad antifúngica, atribuida a su inhibición de la UPR (Unfolded Protein Response), un mecanismo de respuesta a proteínas desplegadas necesario para mantener la virulencia de los hongos fitopatógenos (Silva-Castro, 2020; Bruguière *et al.*, 2016; Guillemette *et al.*, 2014). Otras especies menos conocidas del género *Garcinia*, pero de importancia internacional por ser recursos comestibles o maderables, son *G. forbesii*, *G. prainiana* y *G. intermedia* (Patil y Appaiah, 2015).

1.1.1.1 Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Garcinia intermedia*

Garcinia intermedia es un árbol perennifolio que puede alcanzar entre 10 y 12 metros de altura; sus frutos son comestibles, de color naranja cuando están maduros y con un sabor ácido. Se distribuye en climas húmedos y muy húmedos y es nativa de México, América Central, Ecuador y Colombia (Pittier, 1989).

Hasta ahora existen pocos estudios sobre esta especie; sin embargo, se han reportado actividades biológicas de interés farmacéutico en extractos crudos de sus hojas y frutos. Los extractos de *G. intermedia* han mostrado una potente actividad antioxidante; sus frutos contienen carotenoides, principalmente zeaxantina, además de α - y β -carotenoides, luteína y ésteres de luteína (Murillo *et al.*, 2013). De esta especie también se han reportado benzofenonas como las guttiferonas A y E, isoxantoquimol, xantoquimol, aristofenona y maclurina y biflavonoides como la volkensiflavona, amentoflavona y fukugentina (Muñoz-Acuña *et al.*, 2012; Muñoz-Acuña, 2011). Asimismo, de los extractos de las hojas se han aislado dos productos identificados como 8-desoxigartanina y guttiferona A (Figura 1.4); a esta última se le atribuye actividad antiparasitaria frente a *Trypanosoma cruzi* y antiviral contra el VIH (Abe *et al.*, 2004; Gustafson *et al.*, 1992). La presencia de benzofenonas con actividad biológica también se ha reportado en diferentes partes de la planta. De la corteza y las semillas se aisló la benzofenona 32-hidroxi-*ent*-guttiferona M,

con potente actividad antioxidante (Muñoz-Acuña *et al.*, 2010), en tanto que en extractos del tejido foliar se detectó la posible presencia de MS con actividad inhibitoria del crecimiento de células de cáncer de colon (Einbond *et al.*, 2013). De la misma manera, el análisis y la evaluación reciente de fracciones semipurificadas obtenidas a partir de extractos de corteza de *G. intermedia* colectada en Yucatán, mostró una presencia importante de metabolitos con actividad antioxidante (Silva-Castro, 2020).

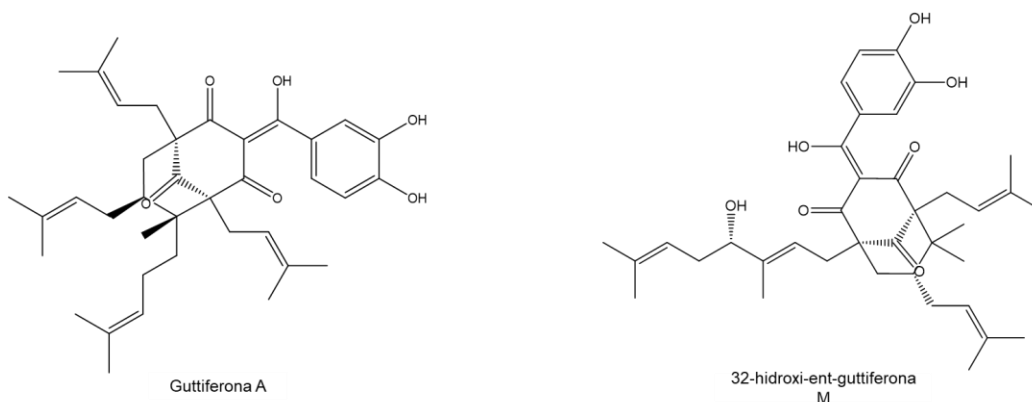


Figura 1.4. MS bioactivos de *G. intermedia*.

1.1.2 Fitoquímica del género *Calophyllum*

El género *Calophyllum* incluye 187 especies de árboles distribuidas en las regiones tropicales del mundo, de las cuales ocho están presentes en el continente americano. La clasificación taxonómica de las especies de este género es compleja y ha sufrido una serie de variaciones desde que fue descrita por primera vez. Actualmente su pertenencia a la familia Clusiaceae no es del todo uniforme y en la literatura se le puede encontrar clasificada tanto como miembro de la familia Clusiaceae (WFO, 2021) como de la familia Calophyllaceae (POWO, 2021).

Una gran variedad de especies pertenecientes al género *Calophyllum* se emplea en la medicina popular para el tratamiento de diversas enfermedades, para lo cual se aprovechan casi todas las partes de la planta, desde semillas, hasta hojas, frutos, raíces, látex y corteza (Gupta y Gupta, 2020). De las especies pertenecientes a este género se han aislado frecuentemente xantonas, cumarinas, biflavonoides, chalconas, benzofuranos y triterpenos (Alkhamaiseh *et al.*, 2011). De

C. inophyllum se han aislado, entre otros MS, los inophyllums A, C, D y E, que fueron evaluados, junto con otras cumarinas, en cuanto a su capacidad como agentes quimiopreventivos. Los mejores resultados de las pruebas en modelos *in vitro* se observaron con la calocumarina A (Itoigawa *et al.*, 2001). Asimismo, de *C. caledonicum* se han reportado las caledonixantonas E y F, dos MS tipo xantona, con actividad antifúngica frente a *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (Morel *et al.*, 2002). En los últimos años este género ha sido objeto de interés científico y farmacológico debido a que se han aislado, de individuos de *C. brasiliense* colectados en Asia, MS bioactivos capaces de inhibir la replicación del virus del VIH (García-Zebadúa *et al.*, 2014).

1.1.2.1 Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Calophyllum brasiliense*

Calophyllum brasiliense es una especie que crece en bosques lluviosos tropicales; puede llegar a medir hasta 40 m de alto y alcanzar de 1 a 3 m de diámetro (Gómez-Verjan *et al.*, 2015). Esta especie es la única del género que se distribuye ampliamente en América (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004; Pennington y Sarukhán, 1998; Stevens, 1980). Es empleada en la medicina tradicional para el tratamiento del reumatismo, hemorroides, úlceras crónicas, diarrea, diabetes y parásitos (Mesía-Vela *et al.*, 2001); la infusión de la corteza es consumida por mujeres para limpiar la matriz después del parto y el látex exudado de la corteza se aplica de manera tópica en el ombligo de los recién nacidos (Reyes-Chilpa *et al.*, 2008). Su valor farmacéutico deriva del aislamiento de triterpenos, xantonas, biflavonoides, cromononas y cumarinas con actividades biológicas importantes como antibacteriana, antifúngica, antiespasmódica, analgésica, antiulcerosa, antineoplásica y antiviral (García-Zebadúa *et al.*, 2014).

Una de las razones por las cuales *C. brasiliense* ha ido tomando relevancia en las investigaciones científicas se debe a que en los extractos de sus hojas se encontraron presentes MS de tipo calanólidos que han mostrado una actividad inhibitoria significativa contra la replicación del virus del VIH-1 (García-Zebadúa *et al.*, 2014; Huerta-Reyes *et al.*, 2004). Los estudios fitoquímicos de esta especie demuestran que posee diferentes perfiles químicos, según la parte de la planta que sea analizada (Figura 1.5) (Filho *et al.*, 2009). Así, mientras que de las raíces se han aislado 1,5-dihidroxixantona, friedelina y ácido betulínico, en las flores y en los frutos los MS mayoritarios son el ácido protocatéquico y el ácido gálico y la epicatequina y el ácido protocatéquico, respectivamente (Isaias *et al.*, 2004). Algunos de estos MS mostraron una potente actividad antinociceptiva al evaluarse en pruebas de contorsión en ratones (Silva *et al.*, 2001). Por otra parte, de la resina del tallo se han reportado los ácidos brasilésico e isobrasilésico y de la

corteza se han obtenido diferentes tipos de xantonas con patrones variados de sustitución (Figura 1.6) (Filho *et al.*, 2009).

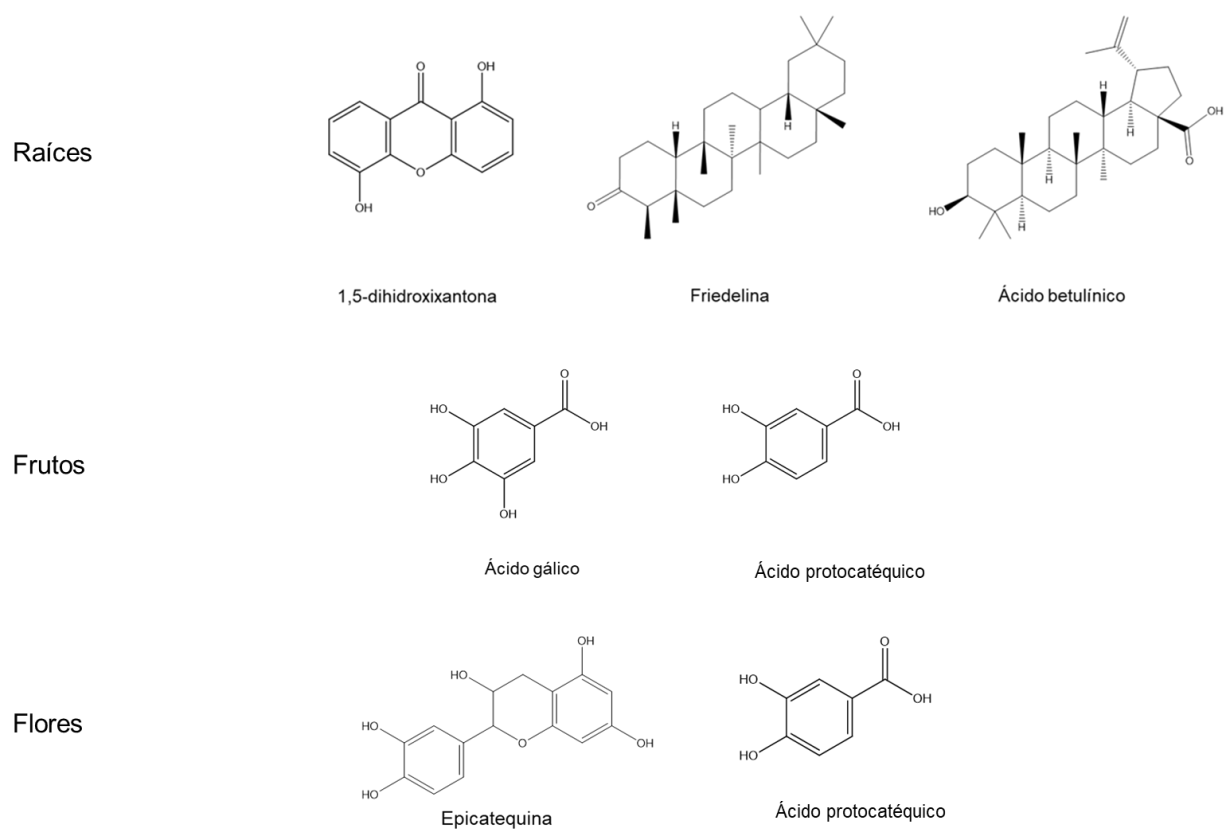


Figura 1.5. MS aislados de diferentes estructuras de la planta *C. brasiliense*.

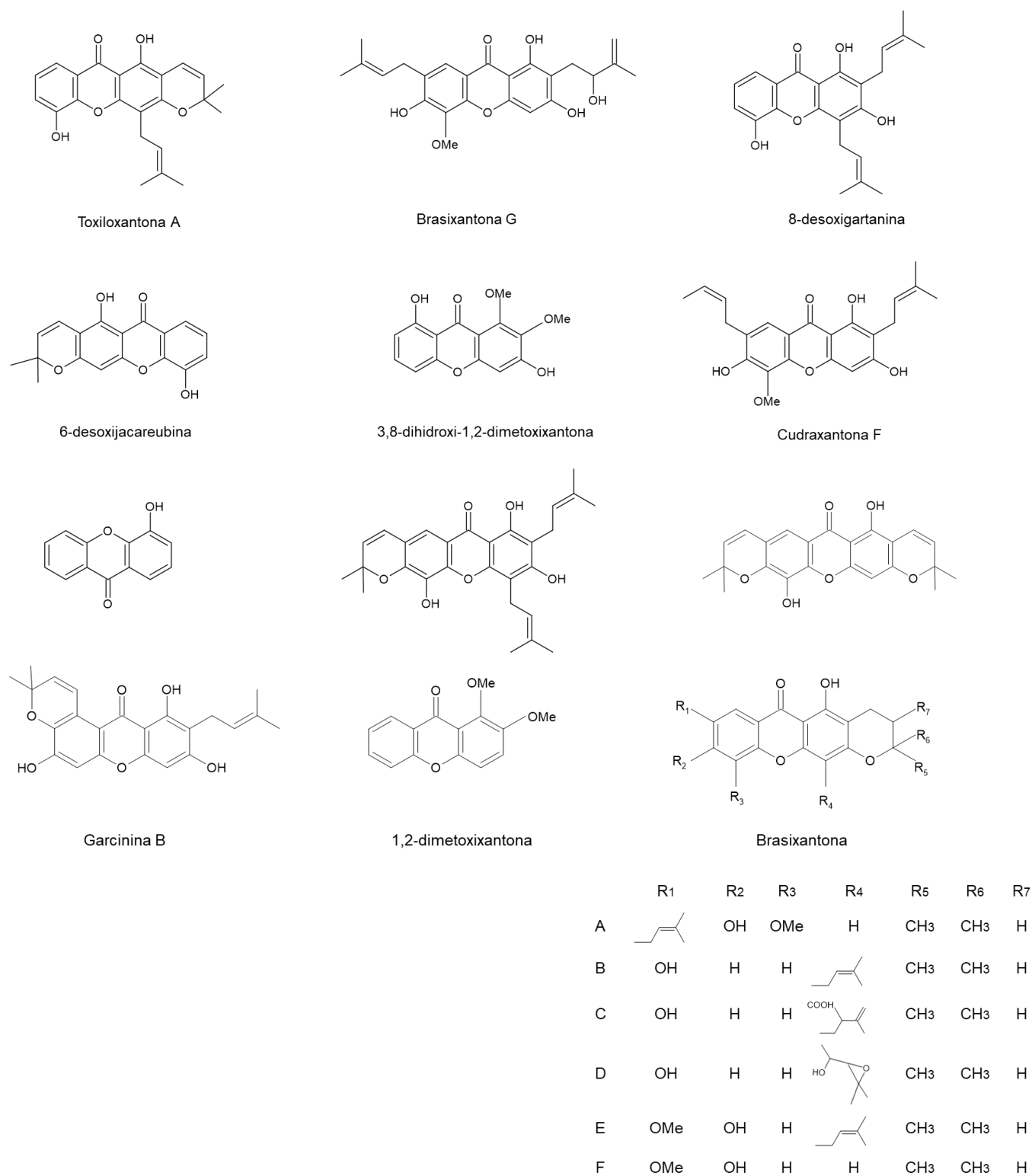


Figura 1.6. Xantonas aisladas de la corteza de *C. brasiliense*.

En un estudio realizado recientemente en individuos de la Península de Yucatán, se aislaron de la corteza metabolitos secundarios tipo xantona (Figura 1.7). El componente mayoritario fue identificado como macluraxantona, lo cual constituye el primer reporte de la presencia de este metabolito en *C. brasiliense* (Silva-Castro, 2020). La identificación de este compuesto fue confirmada mediante un análisis de desduplicación que, además, permitió la identificación de otras xantonas mono y polihidroxiadas, cromanonas y terpenoides.

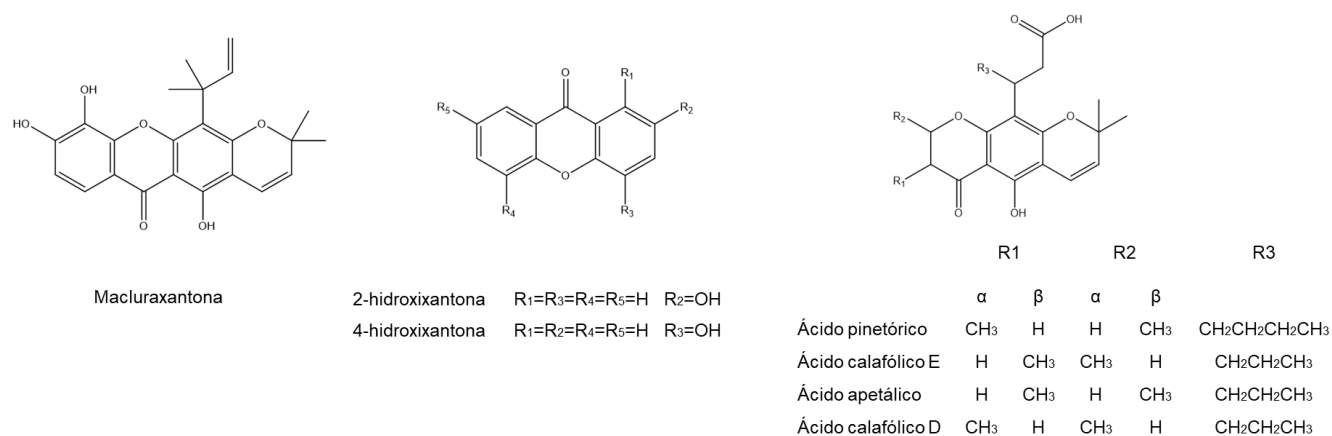


Figura 1.7. Xantonas identificadas en la corteza de *C. brasiliense* colectada en Yucatán.

1.1.2.2 Quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*

Cuando se habla de quimiotipos se hace referencia a individuos de la misma especie que muestran diferentes fenotipos químicos, es decir, la producción de MS difiere de un organismo a otro (Keefover-Ring *et al.*, 2009; Hubby y Forrest, 1960), ya sea en términos cualitativos o cuantitativos (Polatoğlu, 2013). Estas diferencias se deben a factores genéticos y no son causadas por variaciones estacionales (Holopainen *et al.*, 1987); esto último es especialmente importante cuando se reportan diferencias cuantitativas, es decir, cuando el perfil químico muestra el mismo tipo de metabolitos, pero en concentraciones diferentes, dando lugar a dos clases de quimiotipos: los quimiotipos “puros”, o bien definidos, que se definen como aquellas variedades químicas en las que el componente principal constituye más del 50% de la composición química, y los quimiotipos “mixtos” que contienen dos o tres componentes en altas

concentraciones, pero menores al 50% del contenido total (Güngör y Oluk, 2021; Nguyen y Németh, 2016; Polatoğlu, 2013; Holopainen *et al.*, 1986).

En México se ha reportado la presencia de dos quimiotipos de *C. brasiliense*, con diferencias tanto en los perfiles fitoquímicos, como en la anatomía de sus hojas y en el tipo de actividad biológica que muestran, reconociéndose al quimiotipo 1 (CT1) por producir cumarinas tipo mammea, y al quimiotipo 2 (CT2) por contener mayormente cromanonas y calanólidos (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2011). Los diferentes estudios morfológicos, anatómicos y genéticos realizados a especímenes mexicanos de *C. brasiliense* sugieren que la existencia de estas variedades químicas no es una respuesta al ambiente, sino que más bien está determinada por factores genéticos (García-Zebadúa *et al.*, 2014).

Las diferencias químicas entre individuos considerados como quimiotipos se ven reflejadas en su actividad biológica; el CT1 presenta actividad antiparasitaria frente a *Trypanosoma* sp., observándose que una mezcla de dos cumarinas posee una mejor actividad en la inhibición del crecimiento de tumores implantados en ratones, que la vincristina utilizada como tratamiento convencional (Figura 1.8) (Ruiz-Marcial *et al.*, 2007).

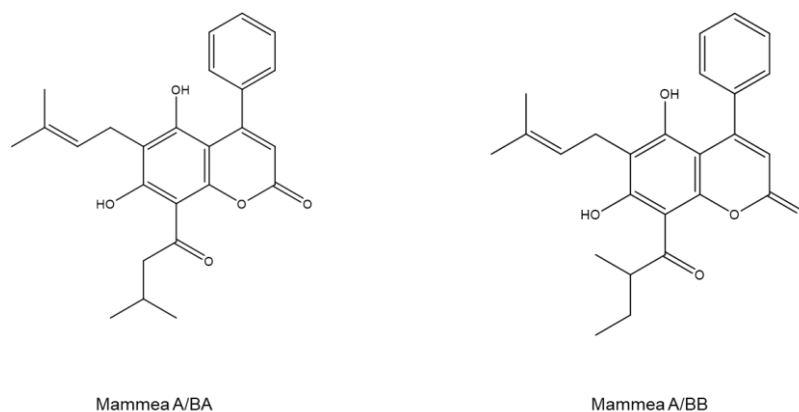


Figura 1.8. Cumarinas aisladas de *C. brasiliense* CT1 con actividad inhibitoria del crecimiento de tumores cancerígenos.

Por su parte, el CT2 de *C. brasiliense* produce MS con actividad inhibitoria significativa de la transcriptasa inversa del virus del VIH (VIH-1 RT); esta actividad se le atribuye a las cumarinas aisladas de las hojas, siendo el (+)-calanólido A uno de los MS más prometedores dado que actualmente se encuentra en la fase 2-3 de los ensayos clínicos, convirtiéndolo en una alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad (Figura 1.9) (Reyes-Chilpa y Huerta-Reyes, 2009; Huerta-Reyes *et al.*, 2004).

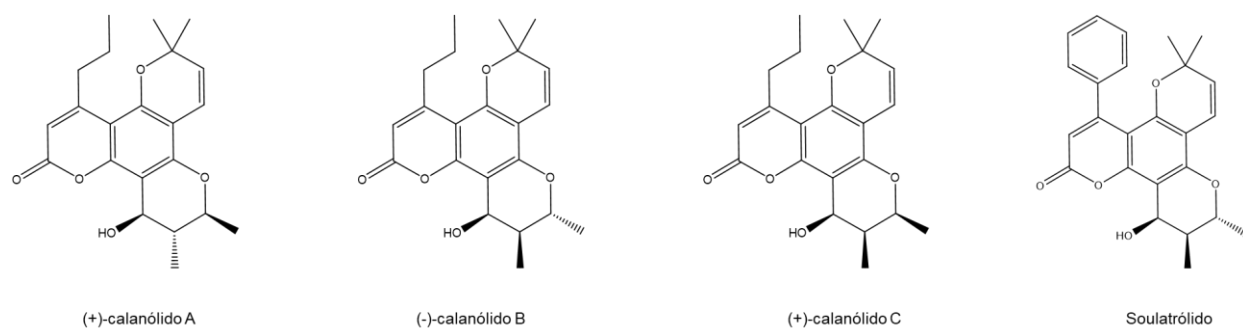


Figura 1.9. Cumarinas con actividad inhibitoria de la VIH-1 RT aisladas de las hojas de *C. brasiliense* CT2.

Recientemente, se observaron diferencias significativas en los perfiles cromatográficos y de actividad biológica de los extractos crudos de corteza y las fracciones semipurificadas de dos individuos de *C. brasiliense* colectados en dos sitios diferentes, Mérida y Calakmul (Silva-Castro, 2020) (Figura 1.10), sugiriendo la posibilidad de que los individuos de las dos localidades existentes en la Península de Yucatán pudieran pertenecer a quimiotipos diferentes.

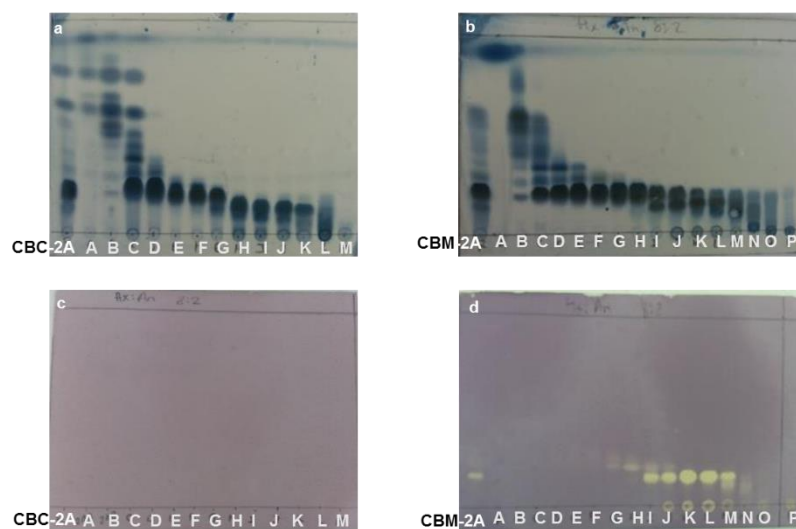


Figura 1.10. Perfiles cromatográficos (TLC; Hx:An, 80:20; a/b visualizados con reactivo de ácido fosfomolibdico, c/d visualizados con DPPH) de fracciones semipurificadas de dos individuos de *C. brasiliense* colectados en dos localidades: Mérida (CBM) y Calakmul (CBC) (tomado de Silva-Castro, 2020).

1.2 ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS

El procedimiento para la obtención de un producto puro con actividad biológica generalmente empieza por el fraccionamiento del extracto crudo de interés, seguido de un fraccionamiento el cual, usualmente, es un proceso bioguiado. Para la purificación de los componentes de una mezcla se emplean técnicas cromatográficas de separación y, posteriormente, se realiza la identificación de los productos obtenidos en forma pura, mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos (Patil, 2020). El método más empleado para el establecimiento de la estructura química de MS es la espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN) de protón (^1H -RMN) y de carbono (^{13}C -RMN) (Cieśła y Moaddel, 2016), ya que provee una resolución superior a la de cualquier otro método espectroscópico y proporciona suficiente información para la elucidación estructural (Reynolds, 2017). A menudo, el número de componentes presentes en un extracto crudo o fracción semipurificada puede complicar la purificación e identificación de cada uno; lo anterior resulta en procedimientos de fraccionamiento y de purificación lentos y laboriosos que, frecuentemente, y a pesar del tiempo y trabajo invertidos, resultan en la obtención de MS previamente identificados y reportados. Por esta razón, se ha vuelto necesario desarrollar estrategias que ayuden a reducir el tiempo de trabajo y a hacer más eficientes los procesos de

fraccionamiento e identificación incluyendo, durante la obtención de perfiles químicos, estrategias de desduplicación (Hubert *et al.*, 2015).

1.2.1 Análisis de desduplicación

En un principio, el término “desduplicación” (dereplication, en inglés), se usaba en la etapa inicial de estudios de cribado para hacer referencia al reconocimiento y posterior descarte de productos previamente reportados (Ito y Masubuchi, 2014). En el contexto del estudio de PN, la desduplicación es considerada como una forma de identificación rápida de metabolitos conocidos presentes en mezclas complejas, reduciendo así el tiempo de trabajo requerido en los procesos de aislamiento (Dinan, 2005). En los estudios que involucran procedimientos de desduplicación, se comparan los datos obtenidos a partir de técnicas espectroscópicas con aquellos compilados en bases de datos que contienen las características de compuestos estándar; para este tipo de análisis se pueden utilizar los perfiles de UV, tiempos de retención, peso y fórmula molecular, patrones de fragmentación, desplazamientos químicos o propiedades biológicas (Carnevale *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2015). Entre las diferentes opciones para los análisis de desduplicación se puede mencionar el uso de ^{13}C -RMN, ya que la simplicidad del espectro (una señal corresponde a un átomo de C), la poca o nula presencia de solapamiento de señales, su estabilidad frente a los efectos del disolvente y la temperatura y la posibilidad de descartar entre los diferentes tipos de carbono con la ayuda de los experimentos DEPT-90 y DEPT-135, la convierten en una herramienta especialmente útil para este tipo de análisis (Nuzillard, 2021; Bruguière *et al.*, 2020).

La desduplicación utilizando ^{13}C -RMN requiere el uso de bases de datos para comparar los datos obtenidos experimentalmente con los que están almacenados en las mismas. Estas bases de datos están constituidas por datos espectroscópicos teóricos de ^{13}C -RMN para productos reportados en la literatura de manera general o tomando en cuenta información taxonómica, esto último con la finalidad de reducir el número de MS coincidentes al limitar la búsqueda a los que hayan sido reportados en especies taxonómicamente relacionadas (Lianza *et al.*, 2021). La principal ventaja de utilizar el análisis de desduplicación en los estudios de aislamiento e identificación de moléculas bioactivas es que permite descartar aquellas fracciones que contengan metabolitos previamente reportados y concentrar los esfuerzos y atención en las muestras en las que los resultados sugieran la presencia de MS novedosos o moléculas que constituyan un nuevo reporte en la especie estudiada (Dang *et al.*, 2015).

JUSTIFICACIÓN

La química de productos naturales es un área de estudio con un enorme potencial, la mayoría de los tratamientos médicos actuales derivan de productos de origen natural y las plantas son la principal fuente de ellos.

La familia Clusiaceae es reconocida por producir metabolitos secundarios bioactivos, particularmente en los géneros *Calophyllum* y *Garcinia* se han aislado moléculas con actividades biológicas diversas y de alto valor farmacéutico. Aunque en Yucatán los estudios químicos de *G. intermedia* y *C. brasiliense* son escasos, actualmente el conocimiento fitoquímico de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae es amplio, por lo que el uso del análisis de desduplicación por ^{13}C -RMN permitirá identificar, de manera rápida, las fracciones que contengan MS conocidos, así como también, aquellas en las que se sugiera la presencia de MS con estructuras novedosas.

Por otra parte, y dado que es bien conocido que la producción de MS puede variar entre las especies pertenecientes a un mismo género e, incluso, puede haber diferencias entre poblaciones de individuos de la misma especie, dando lugar a quimiotipos; por lo que los estudios orientados a la determinación de estas diferencias químicas contribuyen a un mejor entendimiento de la fitoquímica de las especies estudiadas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos previamente en especies de la familia Clusiaceae, existe una alta probabilidad de que *G. intermedia* produzca metabolitos secundarios de tipo PPAPS con actividades biológicas interesantes como las que se han reportado previamente en otros miembros del género y que el estudio fitoquímico de individuos de *C. brasiliense* colectados de diferentes localidades permita establecer la relación quimiotaxonómica entre ellos.

OBJETIVOS

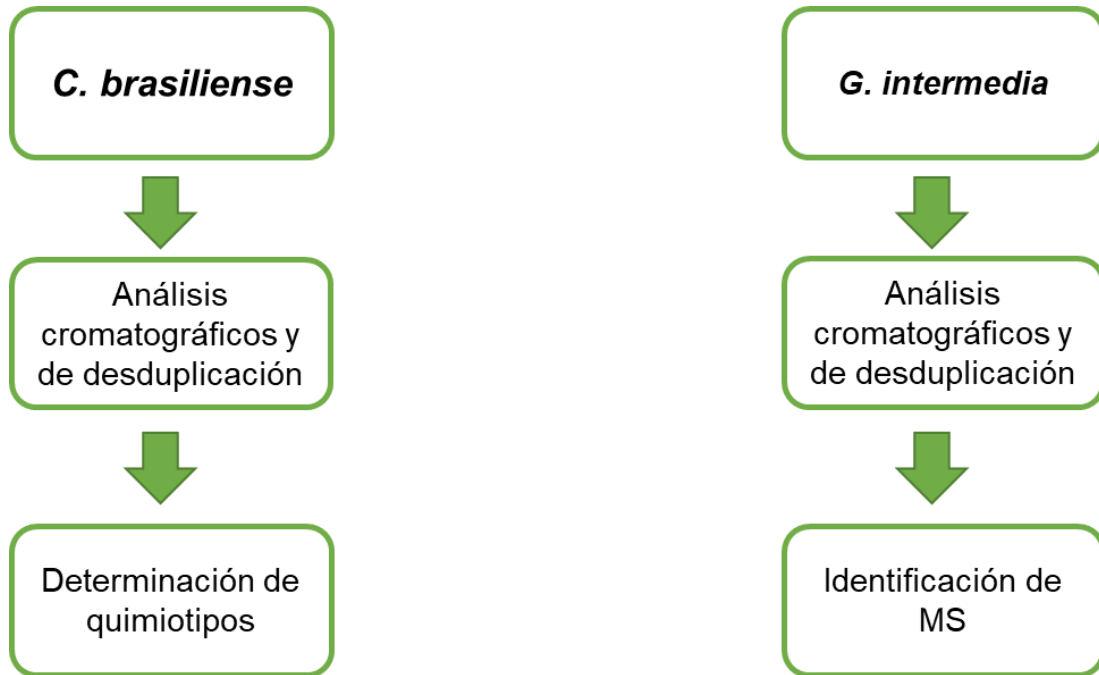
OBJETIVO GENERAL

Identificar metabolitos bioactivos presentes en la corteza de *G. intermedia* y determinar la relación quimiotaxonómica de individuos de *C. brasiliense* colectados de dos poblaciones diferentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer una estrategia para la identificación de MS de *G. intermedia* y *C. brasiliense* mediante análisis de desduplicación basados en ^{13}C -RMN, complementados con los datos obtenidos de los experimentos DEPT-135 y DEPT-90.
- Determinar, mediante el estudio químico de dos individuos de *C. brasiliense* presentes en Yucatán, si éstos pertenecen a quimiotipos diferentes.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES

Inicialmente, se analizaron los extractos crudos y las fracciones de mediana y baja polaridad (obtenidas mediante un proceso de partición líquido-líquido) de la corteza de individuos de *C. brasiliense* colectados originalmente en Mérida y Calakmul en periodos diferentes (diciembre 2018 y marzo 2019, respectivamente) (Silva-Castro 2020).

Para los análisis de cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) se usaron placas de gel de sílice 60 (E.M. Merck) con soporte de aluminio y un espesor de 0.25 mm. Para la obtención de los perfiles cromatográficos se emplearon diferentes mezclas de disolventes. Para la visualización de los perfiles cromatográficos (TLC) se utilizó como revelador una disolución de 20 g de ácido fosfomolibdico y 2.5 g de sulfato de cerio (IV) disuelta en 500 mL de ácido sulfúrico al 5%.

Para el análisis por HPLC de los extractos y fracciones de *C. brasiliense* se empleó un cromatógrafo de la marca Alliance, con un módulo de separación Waters 2695 y un detector PDA 2998. Se utilizó una columna Luna C18 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm ; 100 Å, Phenomenex) y una elución en gradiente utilizando mezclas de agua/ácido fórmico a pH 5 (disolvente A) y metanol (MeOH, disolvente B), siguiendo el método que se describe a continuación:

t (min)	%A	%B
0	90	10
30	0	100
50	0	100

Para la preparación de las muestras se tomaron 5 mg de cada fracción o extracto y se disolvieron en 1 mL de MeOH grado HPLC. Las disoluciones resultantes fueron filtradas con la ayuda de un filtro de nylon de 0.450 μm .

Los análisis de RMN se llevaron a cabo en la Universidad de Angers, Francia, utilizando un espectrómetro JEOL-ECZ de 400 MHz equipado con una sonda inversa de 5 mm. Todas las muestras fueron disueltas en CDCl_3 .

2.2 ANÁLISIS DE DESDUPLICACIÓN

Para llevar a cabo los análisis de desduplicación se empleó el software MixONat, el cual fue desarrollado en la Universidad de Angers, Francia. Este programa realiza la desduplicación de productos naturales utilizando los datos del espectro de ^{13}C -RMN y de los experimentos DEPT-135 y DEPT-90.

Se seleccionaron, tomando en cuenta sus perfiles cromatográficos, fracciones semipurificadas previamente obtenidas (Silva-Castro, 2020) mediante una purificación por VLC de fracciones de mediana y baja polaridad de *G. intermedia* y *C. brasiliense* para ser analizadas por RMN. Una vez obtenidos los espectros, se empleó el software MNova-Mestrelab para corregir la fase y la línea base y para referenciar el disolvente en cada uno de ellos. Por último, se seleccionaron las señales de forma manual. Una vez seleccionadas las señales, con la ayuda del mismo programa, se creó una tabla para cada espectro y experimentos (^{13}C , DEPT-90 y DEPT-135) con los desplazamientos químicos e intensidades de las señales y cada una de las tablas fue copiada en diferentes documentos de Excel para guardar los archivos en el formato correcto (.csv, archivo separado por comas) y subirlos a la interfaz del programa. Junto con los archivos de Excel se subió una base de datos en formato .SDF que se empleó para llevar a cabo la comparación entre los valores de desplazamiento químico. Las bases de datos usadas en los análisis fueron Triterpenes DB, Lotus Garcinia DB, Garcinia DB y Calophyllum DB, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio SONAS de la Universidad de Angers, Francia. Estas bases de datos contienen 6623, 1663, 718 y 364 productos naturales, respectivamente. Para crear una base de datos, en primer lugar, se realiza una recopilación de las estructuras reportadas en un determinado género o familia, cada una de ellas puede dibujarse con la ayuda de un programa como ChemDraw, o bien, pueden ser descargadas de bases de datos como SciFinder o Dictionary of Natural Products (disponibles bajo suscripción). Posteriormente, todas las estructuras obtenidas se compilan en un solo archivo en formato .SDF y se calculan los valores de desplazamiento químico teóricos con la ayuda de un software de predicción, por ejemplo, ACD/Labs Spectrus y C/H_NMR Predictor. Finalmente, usando el programa CTypeGen que

viene incluido en el software del MixONat, se clasifica cada valor de desplazamiento según el tipo de carbono que corresponda (metilo, metileno, metino o cuaternario) (Bruguieré *et al.*, 2021; 2020).

Para identificar el o los metabolitos presentes en las fracciones evaluadas, el programa MixONat ofrece una serie de resultados ordenados de mayor a menor prioridad. Para establecer este orden de prioridad se toma en cuenta, en primer lugar, un valor de score que va de 0 a 1, el cual indica el número de valores experimentales de desplazamiento químico (δ_{exp}) que coinciden con los valores teóricos de desplazamiento químico contenidos en la base de datos (δ_{SDF}). En segundo lugar, se considera el error, que corresponde a la diferencia absoluta acumulada de los valores de desplazamiento químico de las señales coincidentes.

Para finalizar el análisis, se comparan los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente con aquellos reportados en la literatura (en el mismo disolvente) para cada uno de los MS considerados como posibles candidatos. La comparación se realizó con la ayuda de bases de datos como SciFinder, Scopus y Clarivate Web of Science, entre otras. En esta última comparación, la diferencia entre los valores coincidentes de desplazamiento químico experimentales y reportados, no debe ser mayor de 0.4 ppm (Bruguère *et al.*, 2020).

2.3 MATERIAL VEGETAL

Se realizaron dos colectas de material vegetal. La primera de ellas fue realizada por Silva-Castro (2020), durante la cual se tomaron muestras de corteza de *Garcinia intermedia* (Cobá, Quintana Roo; noviembre de 2018) y *Calophyllum brasiliense* (Mérida, Yucatán; diciembre de 2018 y Calakmul, Campeche; marzo de 2019). Se depositó un espécimen de cada individuo colectado en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, con número de folio 70873 (*G. intermedia*), 70874 (*C. brasiliense*, Calakmul) y 72345 (*C. brasiliense*, Mérida). En la segunda colecta se tomaron muestras de hojas y corteza de *C. brasiliense*. La colecta se realizó en dos localidades, Calakmul y Mérida (Figura 2.1). Las muestras del individuo ubicado en Calakmul se colectaron el 10 de marzo de 2022 en la Reserva de la Biósfera de Calakmul del estado de Campeche. El sitio de colecta se encuentra en las coordenadas 17.92287 N, 89.32590 W, a 6 km al oeste del Civalito rumbo a la localidad Dos Naciones. Las muestras del individuo ubicado en Mérida fueron colectadas el 11 de marzo de

2022 en el jardín de la iglesia de Monjas ubicada en el centro de la ciudad. La identificación taxonómica fue realizada por el técnico Gabriel Dzib. El material vegetal fue secado durante dos días en un horno con luz artificial a 40 °C en las instalaciones del CICY, Mérida.

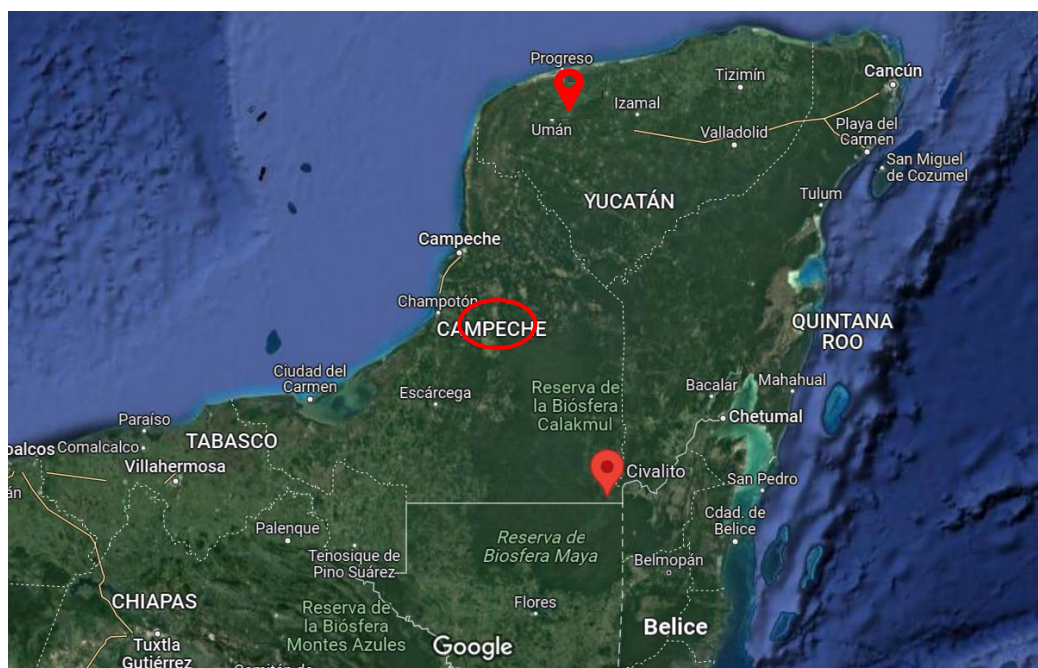


Figura 2.1. Sitios de colecta de *C. brasiliense*: El Civalito (Campeche) y Mérida (Yucatán).

2.3.2 Extracción del material vegetal

La corteza de *G. intermedia* y *C. brasiliense* obtenida en la primera colecta fue sometida a un proceso de extracción utilizando etanol, para obtener así los extractos crudos de ambas especies (Silva-Castro, 2020).

Para el procesamiento de la corteza de *C. brasiliense* obtenido en la segunda colecta, se siguió la misma metodología empleada por Silva-Castro (2020). En primer lugar, la corteza seca de *C. brasiliense* fue cortada en trozos pequeños y sumergida por completo en etanol. Se dejó en reposo por 48 h y posteriormente se filtró el disolvente, primero a través de algodón y después de papel filtro. El procedimiento de extracción se repitió dos veces más y en cada una de ellas el

disolvente fue eliminado a presión reducida para obtener el extracto crudo, del que se tomó 1 g aproximadamente como referencia.

Para la extracción de las hojas se siguió la metodología empleada por Reyes-Chilpa *et al.* (2004), extrayendo el material vegetal de manera sucesiva con disolventes de polaridad ascendente. En primer lugar, las hojas fueron secadas y molidas. El material vegetal seco y molido fue sumergido por completo en hexano (Hx) y se dejó en reposo durante 48 h; pasado este tiempo, se filtró el disolvente y se evaporó a presión reducida. El Hx recuperado se usó para realizar dos extracciones más, utilizando un tiempo de reposo de 24 h en cada extracción. Al finalizar la extracción con Hx el material vegetal fue sometido a tres extracciones más con acetona (An) y tres más con metanol (MeOH).

2.3.3 Partición líquido-líquido

El proceso de fraccionamiento de los extractos crudos de *G. intermedia* y *C. brasiliense* (primera colecta), fue realizado por Silva-Castro (2020). La misma metodología fue empleada para el fraccionamiento de los extractos de corteza de *C. brasiliense* obtenidos en la segunda colecta.

Se empleó 1 g de extracto crudo, el cual fue resuspendido en 40 mL de MeOH para después ser agregado, gota a gota, a 60 mL de agua destilada que permaneció en agitación constante. La suspensión resultante se mantuvo en agitación por otros 30 min y posteriormente fue extraída con 200 mL de Hx. Se tomó la fase orgánica y se eliminó el disolvente a presión reducida. La fracción acuosa residual fue extraída dos veces más utilizando 100 mL de Hx. Al finalizar la partición con Hx se repitió el mismo proceso de partición de la fracción acuosa usando acetato de etilo (AcOEt).

La purificación de las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo de la corteza de *G. intermedia* y *C. brasiliense* (primera colecta) fue realizada por Silva-Castro (2020). Se purificaron las fracciones de baja y mediana polaridad. La fracción de baja polaridad de *G. intermedia* se purificó por cromatografía flash y la fracción de mediana polaridad de *G. intermedia* y las fracciones de mediana y baja polaridad de *C. brasiliense* se purificaron por VLC, respectivamente. Para la cromatografía flash se empleó una columna de 50 mm y una elución isocrática utilizando CH₂Cl₂:Hx:MeOH (40:18:2 v/v) como disolvente de elución, y para la purificación por VLC se utilizó una columna de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura y una elución con mezclas de polaridad creciente de Hx:An:MeOH (100:0:0 – 60:38:2; *G. intermedia*) y Hx:An

(100:0 – 70:30, fracción de baja polaridad; 100:0 – 88:12, fracción de mediana polaridad, ambas de *C. brasiliense*).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 METABOLITOS IDENTIFICADOS EN LAS FRACCIONES SEMIPURIFICADAS DE *G. intermedia*

Las fracciones semipurificadas que se seleccionaron para los análisis de desduplicación se eligieron con base en su contenido de productos con actividad antioxidante, observados en los diferentes perfiles cromatográficos (TLC) obtenidos como resultado de la purificación de las fracciones de baja (GFHCVC y GFHCVF) y mediana (GFACVB, GFACVC y GFACVD) polaridad (Silva-Castro, 2020).

El análisis de desduplicación de la fracción GFACVC sugirió la presencia de estigmasterol como componente mayoritario; aun cuando este metabolito aparece en la posición 6 con un score de 1.0 al emplear la base de datos Lotus Garcinia DB, al usar la base de datos Calophyllum DB (Figura 3.1) el metabolito se ubica en la posición 1 con un score de 1.0 (29/29 C coincidentes). La identificación de estigmasterol propuesta por MixONat, se confirmó mediante la comparación de los valores experimentales con los reportados en la literatura (Kamal *et al.*, 2016).

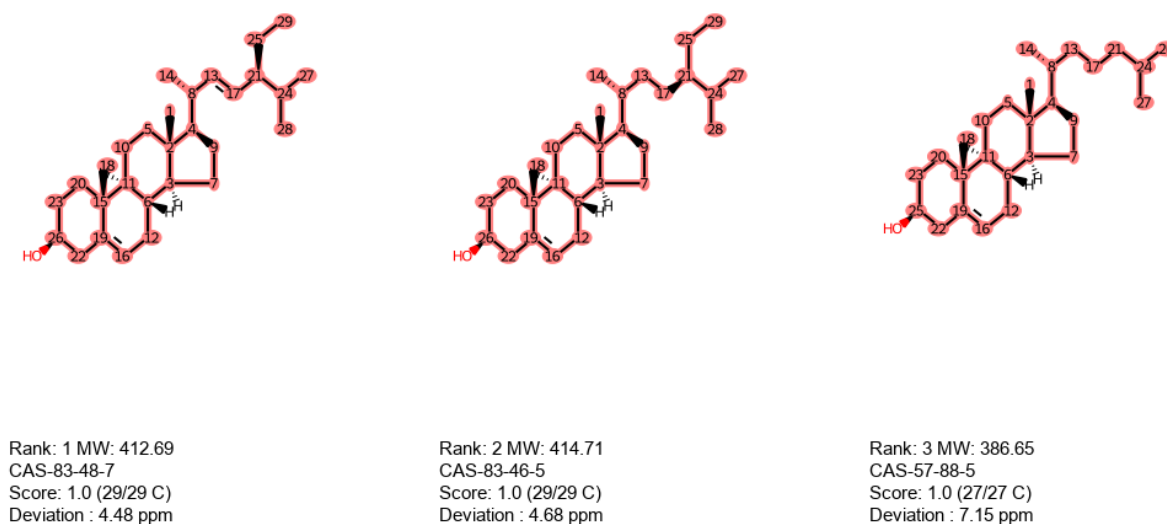


Figura 3.1. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción GFACVC.

Un análisis similar de la fracción GFACVD indicó la presencia de β -sitosterol como primera opción, con un score de 0.97 (28/29 C coincidentes) al usar la base de datos Calophyllum DB (Figura 3.2), y en la posición 3 (score 0.97, 28/29 C) al emplear la base de datos Lotus Garcinia DB. La identidad del metabolito propuesto por MixONat se confirmó al comparar los datos experimentales con los repostados en la literatura (Sadikun *et al.*, 1996).

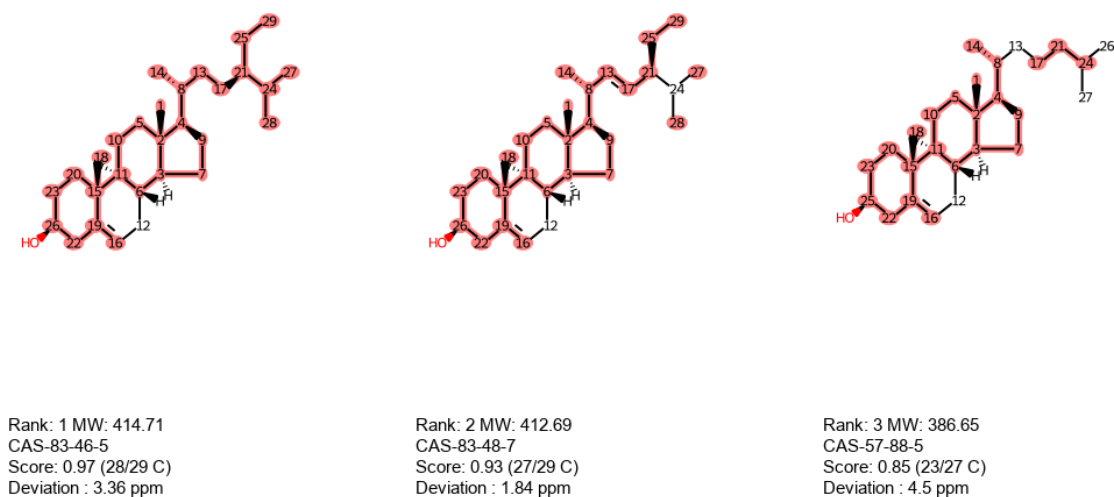


Figura 3.2. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción GFACVD.

Dado que esteroides como el β -sitosterol, estigmasterol y campestanol son componentes principales de las membranas vegetales, es común encontrarlos distribuidos ampliamente en diferentes grupos taxonómicos (Moreau *et al.*, 2002), por lo que frecuentemente se aíslan como metabolitos de especies vegetales (Cabral y Simas, 2017), incluyendo más de diez especies del género *Garcinia* (Espirito Santo *et al.*, 2020; Hemshekhar *et al.*, 2011; Lannang *et al.*, 2008; Shadid *et al.*, 2007).

Por otra parte, el análisis de desduplicación de la fracción GFACVB propuso la presencia de escualeno (Figura 3.3) como el componente mayoritario, con una prioridad 1 y un score de 0.93 (28/30 C coincidentes). La identificación del terpenoide se confirmó mediante la coincidencia de sus datos espectroscópicos experimentales con los reportados en la literatura (Ekeocha *et al.*, 2021). Aun cuando la presencia de escualeno se ha reportado en otras especies del género *Garcinia* (Jayakar *et al.*, 2020; Salleh *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2009), este es su primer reporte

en *G. intermedia*, lo que contribuye al conocimiento fitoquímico de esta especie que, hasta ahora, reporta además la presencia de carotenoides, benzofenonas, xantonas, flavonoides y triterpenos (Giuffrida *et al.*, 2022; Abe *et al.*, 2004).

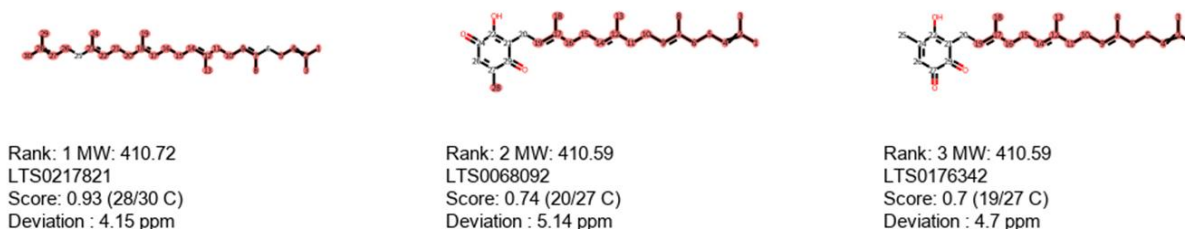


Figura 3.3. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción GFACVB.

Adicionalmente, el análisis de desduplicación del componente mayoritario de la fracción GFHCVF indicó la presencia de una mezcla de dos componentes identificados como aristofenonas A y B (Figura 3.4), con prioridad 1 y un score de 0.82 (27/33 C coincidentes) al utilizar la base de datos PPAPS GROSSMAN. Sin embargo, al realizar la comparación final de los valores de desplazamiento experimentales (δ_{exp}) con los reportados (δ_{rep}) en la literatura, se observó que los valores experimentales no coincidían con los reportados para aristofenona B, en tanto que, para el caso de la aristofenona A, solamente uno de los valores experimentales (C-33) no coincidía con el valor reportado en la literatura (Cuesta-Rubio *et al.*, 2001) (Tabla 3.1). Con base en estos resultados, la identificación de aristofenona A en esta fracción puede considerarse como tentativa ya que en ocasiones puede haber errores en las asignaciones reportadas para un metabolito (Herbert-Doctor *et al.*, 2022); para la identificación de este producto es necesario llevar a cabo su purificación y el análisis de sus datos espectroscópicos, o confirmar la presencia de la aristofenona A en el perfil cromatográfico de la fracción utilizando un estándar comercial o una muestra auténtica.

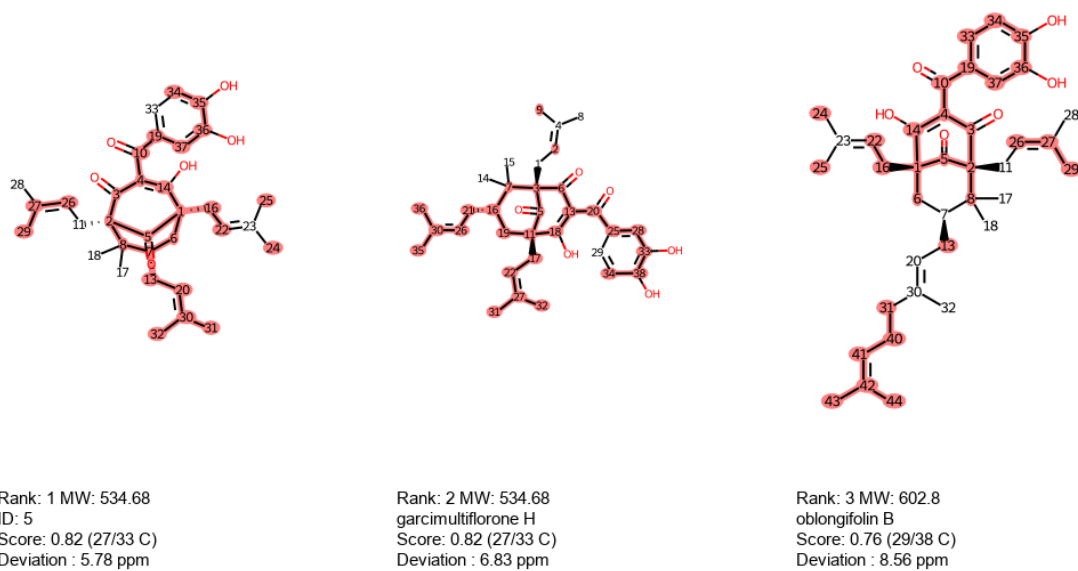


Figura 3.4. Resultados del análisis de desduplicación para la fracción GFHCVF.

Tabla 3.1 Datos espectroscópicos experimentales (400 MHz, CDCl₃) y reportados de ¹³C-RMN de la mezcla de aristofenonas A y B.

Posición	Experimental	Reportado (Aristofenona A)	Reportado (Aristofenona B)
C-1	69.64	69.40	66.20
C-2	196.20	196.50	198.00
C-3	115.74	115.90	115.60
C-4	198.19	198.60	196.90
C-5	58.78	58.80	63.00
C-6	38.37	38.60	40.10
C-7	40.05	40.20	40.70
C-8	50.95	50.60	51.30
C-9	208.26	208.30	208.60
C-10	26.13	26.20	25.30
C-11	120.14	120.30	118.70
C-12	135.18	135.00	135.00
C-13	25.50	25.30	25.60
C-14	17.93	17.70	17.50
C-15	194.93	194.80	194.50
C-16	128.19	128.10	128.10
C-17	124.26	125.20	125.70
C-18	114.59	114.80	114.80
C-19	149.92	149.50	149.60
C-20	143.84	143.50	143.30
C-21	116.63	116.80	116.80
C-22	30.57	30.50	31.40
C-23	119.61	119.70	119.20
C-24	134.90	134.90	134.90
C-25	18.21	18.00	17.90
C-26	26.13	26.10	25.70
C-27	28.52	28.50	28.60
C-28	124.26	124.40	124.30
C-29	132.26	132.10	132.20
C-30	17.93	17.70	17.10
C-31	25.81	26.00	26.20
C-32	24.08	23.70	23.60
C-33	14.73	15.80	15.70

Los acilfloroglucinoles policíclicos poliprenilados (PPAPS), como las aristofenonas A y B, son un grupo de productos naturales con estructuras policíclicas complejas. Poseen núcleos derivados de acilfloroglucinol altamente oxigenados, a los cuales se enlazan cadenas laterales de isoprenilo o geranilo (Yang *et al.*, 2018). Aun cuando este tipo de metabolitos se encuentra ampliamente reportado en poco más de 30 especies del género *Garcinia* (Kumar *et al.*, 2013), hasta ahora su presencia no había sido reportada en *G. intermedia*.

La hyperforina es el PPAPS más conocido, es el principal constituyente de la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*), ampliamente utilizada para aliviar los problemas de depresión (El Hamdaoui *et al.*, 2022); estos MS poseen una amplia variedad de actividades biológicas entre las que destaca su actividad antiviral contra el VIH, además de su actividad antiinflamatoria, antiplasmodial, antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, entre otras (Cao *et al.*, 2006; Almanza *et al.*, 2011; Sakunpak y Panichayupakaranant, 2012).

Finalmente, y aun cuando el análisis de desduplicación de la fracción GFHCVC no resultó en la identificación de un producto en particular, los resultados obtenidos de las diferentes bases de datos utilizadas sugieren la probable presencia de metabolitos de tipo xantona o PPAPS (Figura 3.5). Contrario a lo que pudiera parecer, estos resultados “negativos”, en los que no se logra identificar MS presentes en una fracción, es otra de las aplicaciones y una de las principales ventajas del análisis de desduplicación, ya que esta información sugiere la probable presencia de un cierto tipo de MS, por ejemplo, xantonas o PPAPS, con una estructura novedosa que hasta ahora no han sido reportada en la literatura.

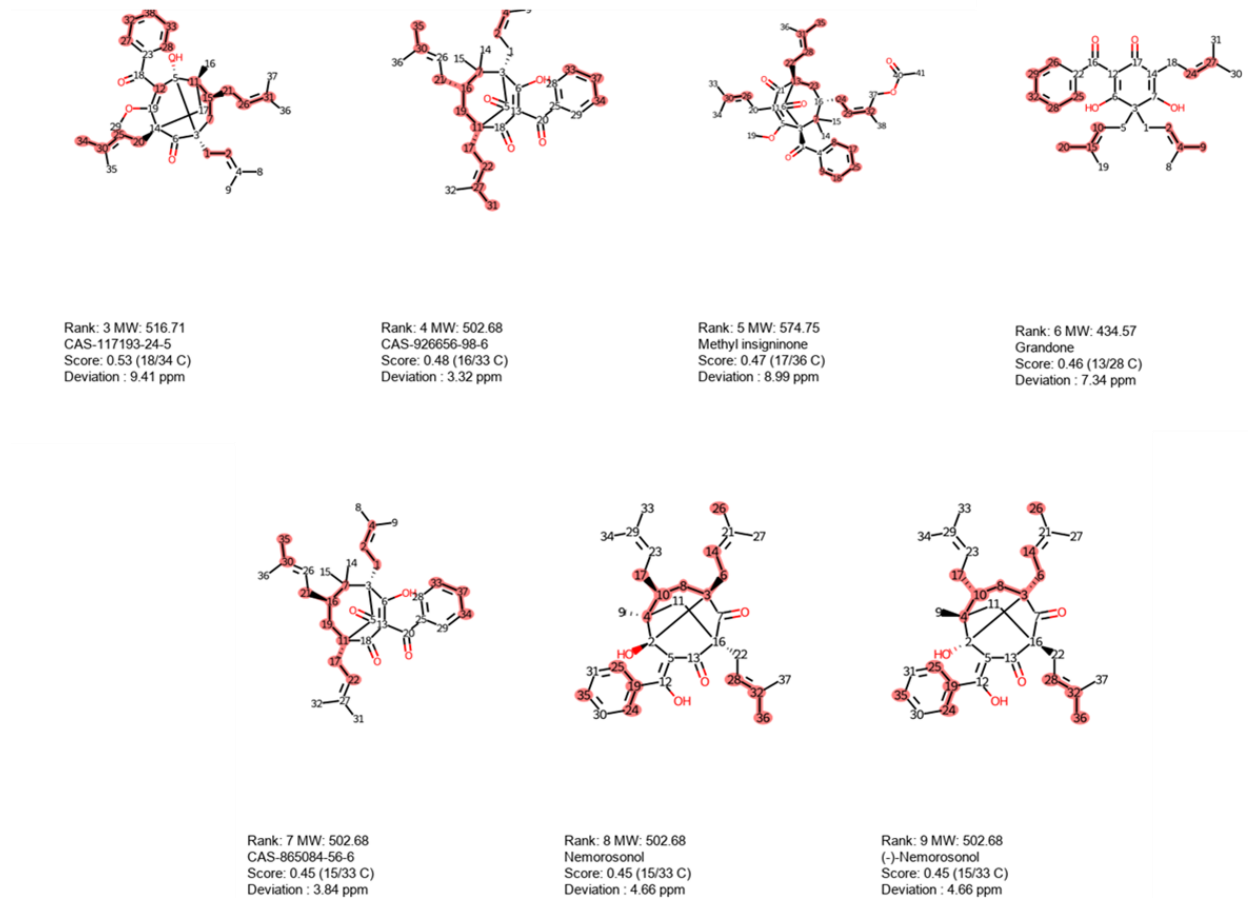


Figura 3.5. Parte de los resultados del análisis de desduplicación de la fracción GFHCVC.

3.2. METABOLITOS IDENTIFICADOS EN LAS FRACCIONES SEMIPURIFICADAS DE *C. brasiliense* COLECTADO EN CALAKMUL

El estudio previo de desduplicación de fracciones semipurificadas obtenidas a partir del extracto de corteza de un individuo de *C. brasiliense* colectado en Mérida resultó en la identificación de la macluraxantona como la xantona principal, además de otras xantonas mono- y polihidroxiladas, cromanonas y terpenoides (Silva-Castro *et al.*, 2021). Sin embargo, se observó que los perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones semipurificadas del individuo colectado en Mérida eran significativamente diferentes a los correspondientes obtenidos del individuo colectado en Calakmul, particularmente en cuanto a la presencia de componentes con actividad antioxidante (Figura 1.10). Con base en lo anterior, y con el fin de explorar posibles coincidencias en la composición fitoquímica de los individuos colectados en dos diferentes localidades, se seleccionaron fracciones obtenidas de la purificación del extracto de corteza del individuo colectado en Calakmul para ser analizadas por desduplicación; así, de la purificación de la fracción de baja polaridad se seleccionó la fracción FHCVJ y de la purificación de la fracción de mediana polaridad se seleccionaron las fracciones FAcCCVD, FAcCCVF y FAcCCVK.

Al usar la base de datos Calophyllum DB para el análisis de desduplicación de la fracción FAcCCVD, los resultados sugirieron la presencia de fitoesteroles y triterpenos (Figura 3.6), incluyendo el β -sitosterol, con prioridad 1 y un score de 1.0 (29/29 C coincidentes); α -amirina, con prioridad 2 y un score de 0.97 (29/30 C coincidentes) y estigmasterol, con prioridad 5 y un score de 0.93 (27/29 C coincidentes). La identificación de estos tres metabolitos se confirmó al comparar los valores experimentales de desplazamiento químico, con los reportados en la literatura por Sadikun *et al.* (1996), Knight (1974) y Kamal *et al.* (2016), respectivamente. Como se mencionó anteriormente, los fitoesteroles y los triterpenos como las amirinas se encuentran ampliamente distribuidos en las especies vegetales y a menudo se reportan de hojas, corteza, madera y resina de diversas plantas medicinales (Ramos-Hryb *et al.*, 2018). Los triterpenos pentacíclicos como la α -amirina suelen encontrarse en un amplio rango de especies y se les atribuyen actividades biológicas variadas; por ejemplo, se ha reportado que la mezcla de α - y β -amirina muestra actividad inmunoestimulante, antiinflamatoria, ansiolítica y antidepresiva (Blundell *et al.*, 2020; Wawer, 2008). Cabe mencionar que, aun cuando la α -amirina ha sido aislada de diferentes especies del género *Calophyllum* (Ravelonjato *et al.*, 1987), hasta ahora no se ha encontrado en *C. brasiliense*, incluyendo el estudio de desduplicación realizado a las fracciones semi-purificadas del individuo de *C. brasiliense* colectado en Mérida (Silva-Castro, 2020).

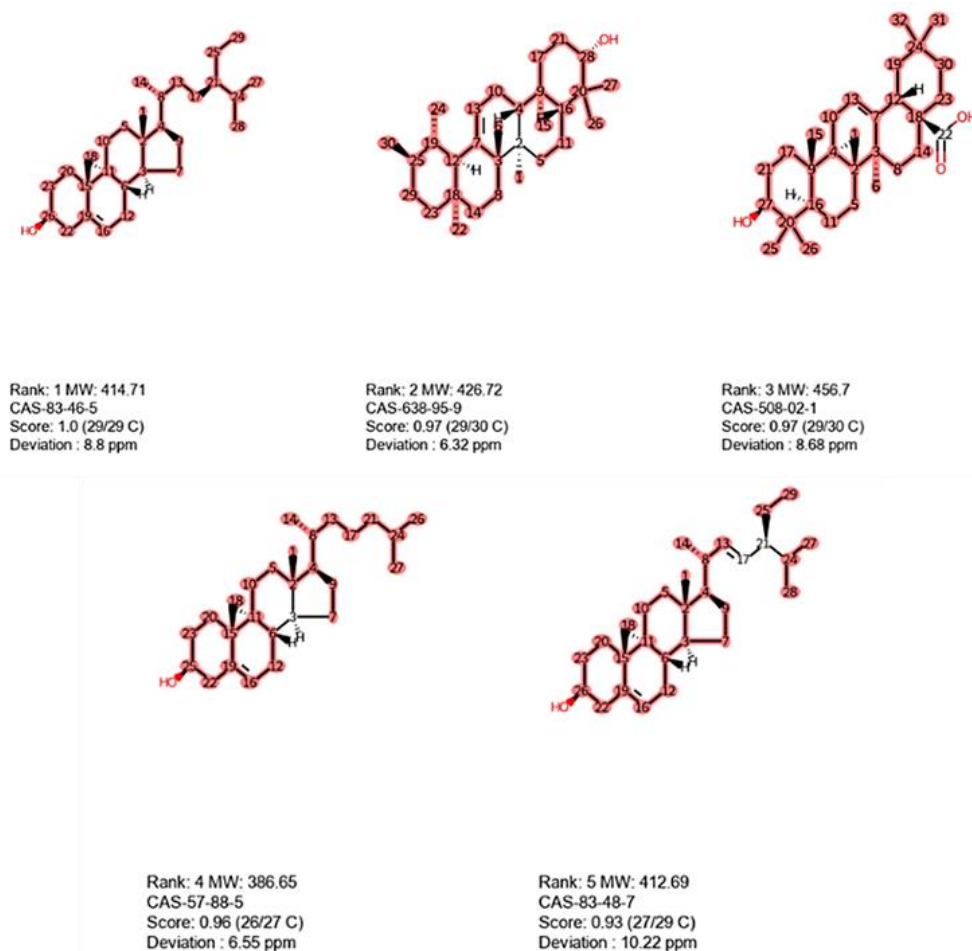


Figura 3.6. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción FAcCCVD.

El análisis de desduplicación de la fracción FAcCCVK usando la base de datos Calophyllum DB, sugirió la probable presencia de tres metabolitos (Figura 3.7); aun cuando el calanólido E y el ácido isoapetálico aparecen con prioridades 2 y 3 y ambos con un score de 0.55 (12/22 C coincidentes), su identificación se confirmó al comparar sus valores experimentales de desplazamiento químico con los reportados en la literatura (Tabla 4) por McKee *et al.* (1996) y Shen *et al.* (2004), respectivamente. La presencia del calanólido E se ha reportado en al menos siete especies del género *Calophyllum*, incluyendo *C. brasiliense* (Nahar *et al.*, 2020). Aunque es el componente más abundante de *C. lanigerum*, no se le relaciona con la actividad anti-VIH de esta especie, pues esta actividad está asociada a piranocumarinas que poseen un grupo *gem*-dimetilo y un β -hidroxilo o una cetona en la posición 12 (McKee *et al.*, 1998). Sin embargo, recientemente se reportó que el calanólido E posee actividad antiparasitaria frente a *Trypanozoma cruzi* y *Leishmania infantum* (Silva *et al.*, 2020). Por otra parte, el ácido isoapetálico

se ha aislado de la resina, semillas, hojas y corteza de diferentes especies de *Calophyllum*, incluyendo *C. brasiliense* (Bello *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2004) y se ha reportado que posee actividad antibacteriana y citotóxica (Aminudin *et al.*, 2016).

La presencia del calanolido E y el ácido isoapetálico, junto con los fitoesteroles β -sitosterol y estigmasterol, en las fracciones obtenidas de la purificación del extracto de corteza de *C. brasiliense* del individuo colectado en Calakmul, coincide con los resultados obtenidos previamente, durante el análisis de desduplicación de las fracciones obtenidas de la purificación del extracto de corteza del individuo colectado en Mérida (Silva-Castro, 2020). Sin embargo, es importante mencionar que, en ninguna de las fracciones obtenidas de la purificación del extracto de corteza del individuo de Calakmul, se detectó la presencia de macluraxantona, reportada como la xantona principal en las fracciones obtenidas de la purificación del extracto de corteza del individuo de Mérida.

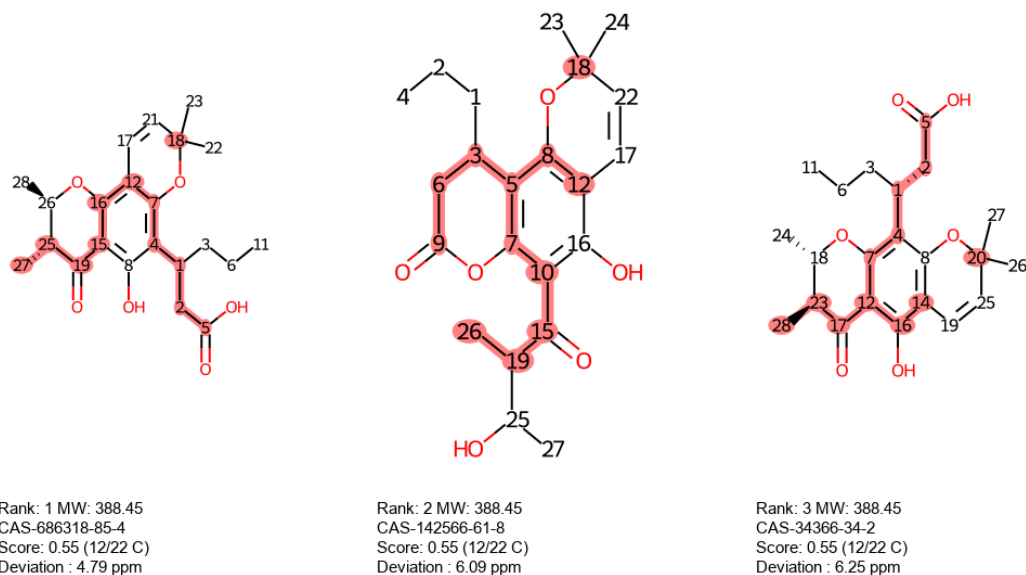


Figura 3.7. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción FAcCCVK.

Tabla 3.2. Datos espectroscópicos experimentales (400 MHz, CDCl₃) y reportados de ¹³C-RMN para calanólido E y ácido isoapetálico*.

Posición	Calanólido E		Ácido isoapetálico	
	δ rep	δ exp	δ rep	δ exp
C-2	178.7	178.55	79	78.96
C-3	38.4	38.42	45.8	45.76
C-4	30.4	30.15	199.4	199.22
C-5	108.8	108.81	157.1	157.07
C-6	157	157.07	115.7	115.67
C-7	78.1	78.04	125.7	125.53
C-8	125.7	125.53	78.2	78.04
C-10	115.7	115.64	109	109.1
C-11	102.6	102.37	160	160.02
C-12	159.9	160.02	101.9	101.94
C-13	101.8	101.36	102.6	102.37
C-14	159.9	160.02	157	157.07
C-15	199.3	199.22	19.5	19.46
C-16	45.7	45.76	10.5	10.24
C-17	78.8	78.66	28.4	28.1
C-18	19.5	19.46	28.2	28.42
C-19	35.5	35.24	30.4	30.15
C-20	20.7	20.68	38.8	39.02
C-21	14	13.91	179.7	179.2
C-22	28	28.1	35.6	35.24
C-23	28.4	28.42	20.9	20.68
C-24	10.5	10.24	14.1	13.91

*McKee *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2004.

Finalmente, y aunque el análisis de desduplicación de las fracciones FHCCVJ (Figura 3.8) y FAcCCVF (Figura 3.9) no resultó en la identificación de un metabolito en particular, el uso de cuatro diferentes bases de datos sugirió una estructura tipo xantonina para el componente mayoritario en la fracción FHCCVJ. La relevancia de este resultado está dada por el hecho de que, a pesar de que existe un número importante de xantoninas reportadas de la familia Clusiaceae y del género *Calophyllum*, incluyendo a *C. brasiliense* (Filho *et al.*, 2009), el análisis de desduplicación puede utilizarse para detectar fracciones que contengan MS con estructuras novedosas que podrían ser un nuevo registro para *C. brasiliense* o productos que hasta ahora no han sido descritos en esta especie o en el género.

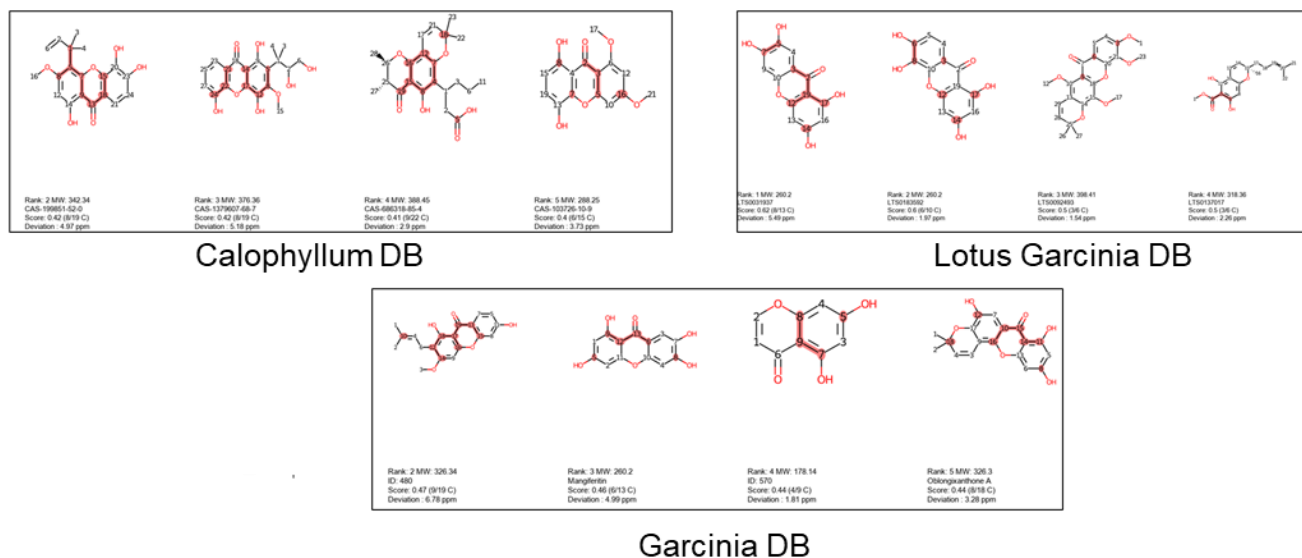


Figura 3.8. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción FHCCVJ empleando tres bases de datos diferentes.

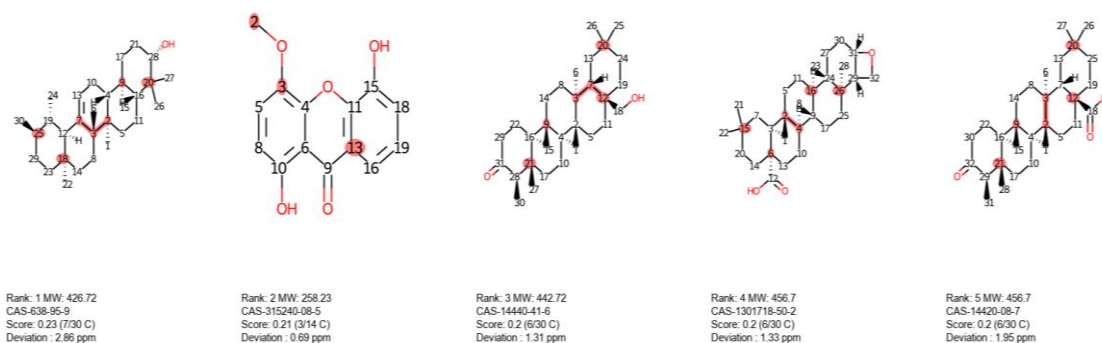


Figura 3.9. Resultados del análisis de desduplicación de la fracción FAcCCVF.

3.3 DETERMINACIÓN DE QUIMIOTIPOS EN *C. brasiliense*

3.3.1 Comparación de los perfiles cromatográficos de extractos y fracciones obtenidos de individuos de *C. brasiliense* (primera colecta)

Como se mencionó anteriormente, las cumarinas tipo mammea y los calanólidos son los MS principales aislados de las hojas de los quimiotipos I y II de *C. brasiliense* que se encuentran en México (Venancio-Rodríguez *et al.*, 2021). Estos MS pueden extraerse con etanol y disolventes de baja polaridad como hexano y cloroformo (Matos *et al.*, 2015). Un análisis preliminar de los perfiles cromatográficos (TLC) de los extractos de corteza de los individuos colectados en Mérida y Calakmul (Figura 3.10a) mostró que, aun cuando la composición química de los dos extractos parece ser cualitativamente similar, existen diferencias cuantitativas entre los componentes de ambos extractos, particularmente en cuanto al contenido de componentes de mayor polaridad en el extracto del individuo de Mérida. Esta similitud cualitativa en la composición fitoquímica de ambos extractos se observa también al comparar los perfiles cromatográficos de las correspondientes fracciones de baja y mediana polaridad (Figuras 3.10b y 3.10c, respectivamente).

Para confirmar las diferencias o similitudes en la composición fitoquímica de los extractos y fracciones de corteza de los individuos de *C. brasiliense* colectados en Mérida y Calakmul, las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Figuras 3.11 y 3.12).

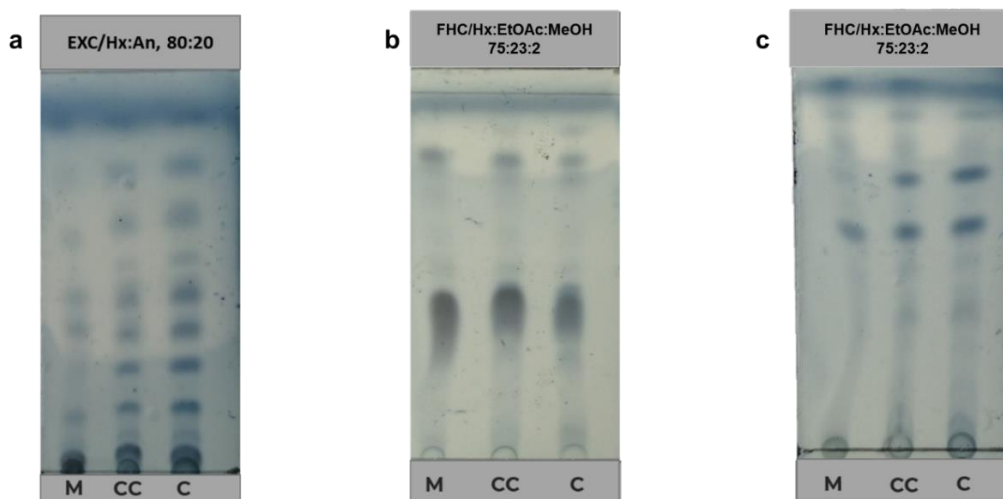


Figura 3.10. Perfil cromatográfico de los extractos crudos y fracciones de baja (FHC) y mediana (FAC) polaridad de *C. brasiliense*. M: Mérida, CC: Co-cromatografía, C: Calakmul.

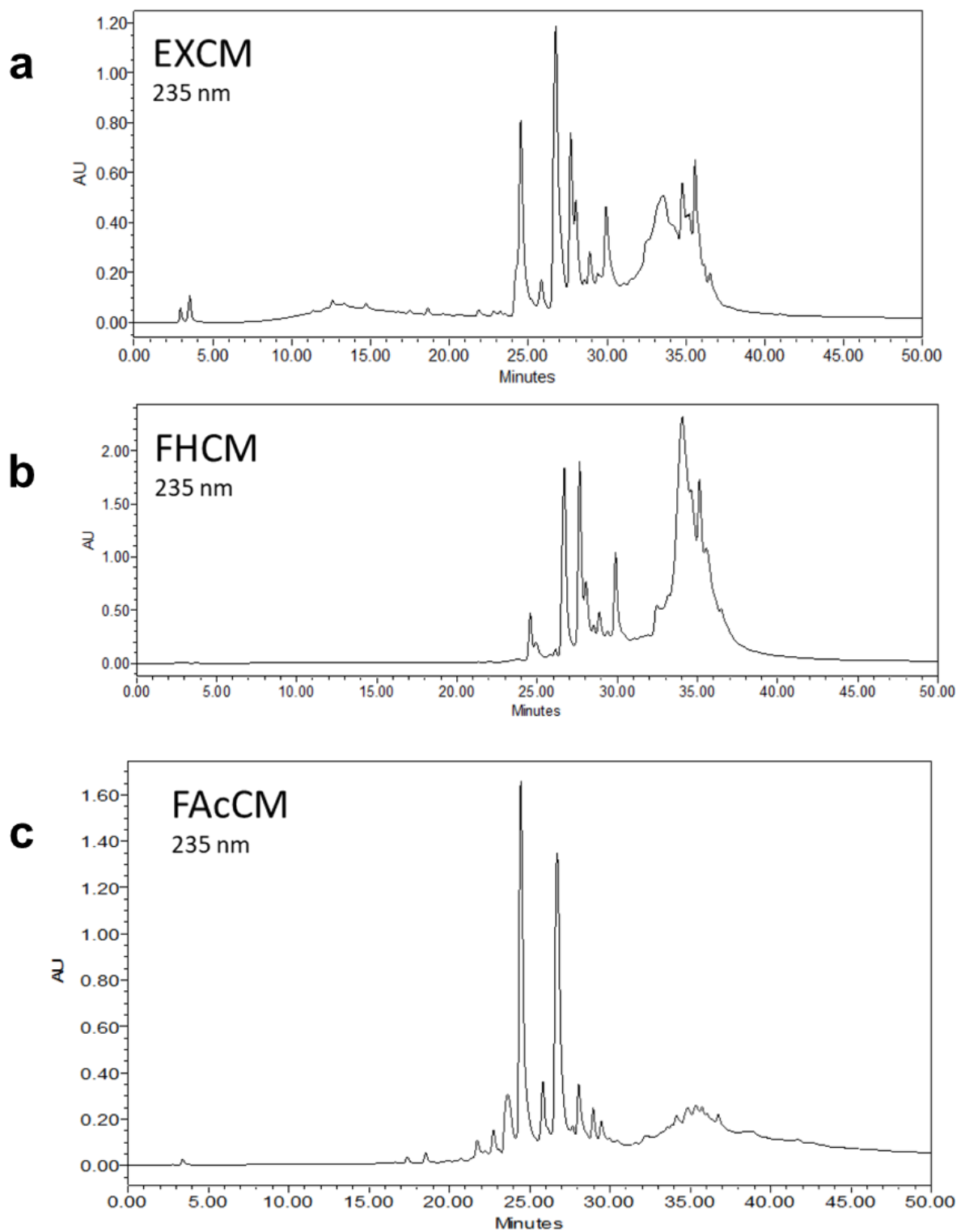


Figura 3.11. Perfiles cromatográficos (HPLC) del extracto crudo de corteza (a) y de las fracciones de baja (b) y mediana (c) polaridad del individuo de *C. brasiliense* colectado en Mérida.

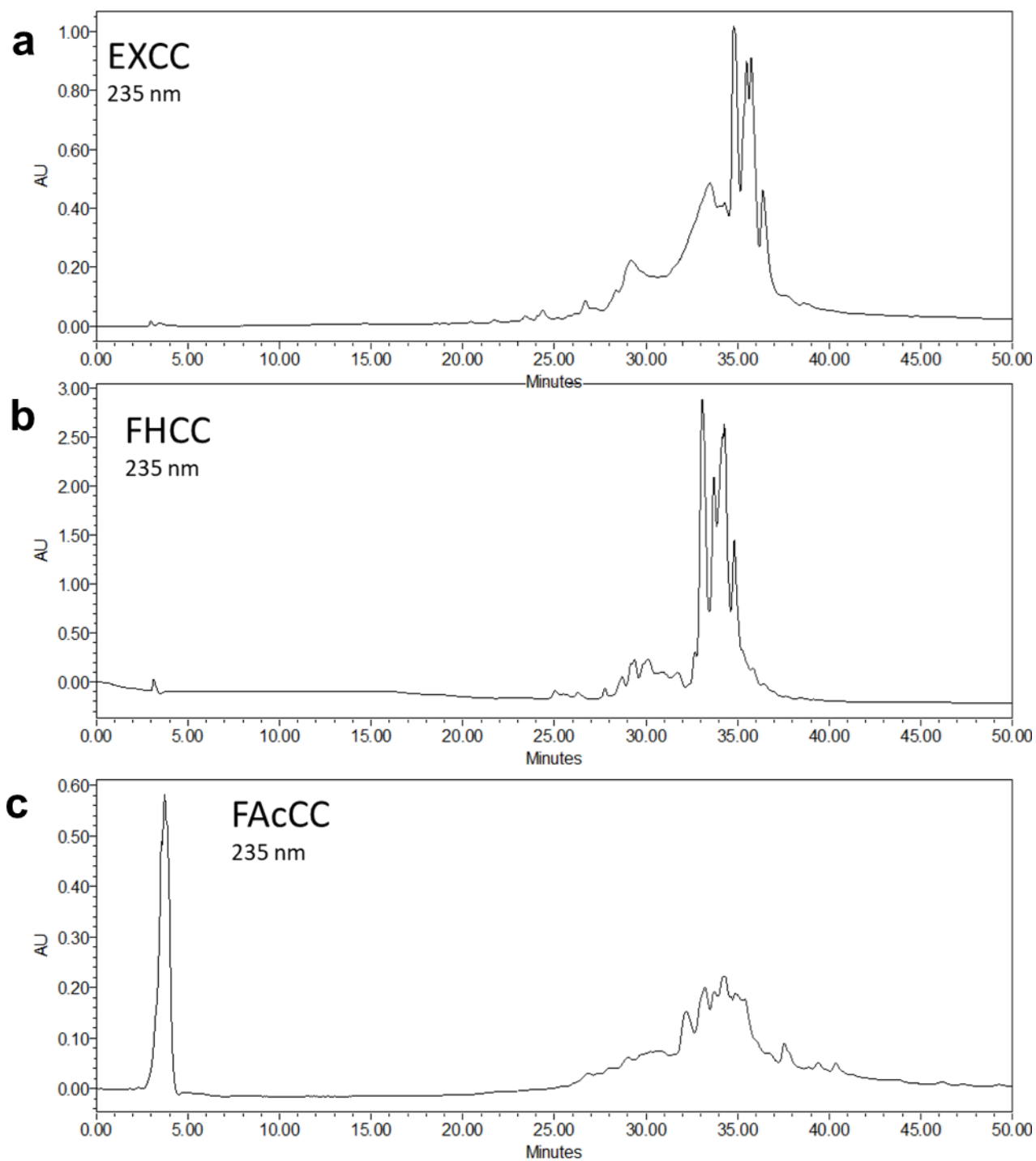


Figura 3.12. Perfiles cromatográficos (HPLC) del extracto de corteza (a) y de las fracciones de baja (b) y mediana (c) polaridad del individuo de *C. brasiliense* colectado en Calakmul.

Los perfiles cromatográficos por HPLC de los extractos crudos y fracciones de polaridad baja y media obtenidos de los individuos de ambas localidades confirmaron los resultados observados en el análisis cromatográfico por TLC, por ejemplo, el extracto crudo y las fracciones de la corteza del individuo colectado en Mérida muestran una mayor presencia de componentes más polares (según el t_R 23-30 min, observado en la Figura 3.11), en tanto que el extracto y las fracciones del individuo colectado en Calakmul muestran un mayor contenido de componentes menos polares (t_R 33-36 min; Fig. 3.12). El análisis detallado de los perfiles cromatográficos de ambos extractos crudos confirmó también los resultados obtenidos previamente, en donde se pudo observar que los extractos de ambos individuos parecen tener un contenido de MS similar, pero cuantitativamente diferente (Figura 3.13 y 3.14). Esta relación entre la abundancia de un grupo de MS y la dificultad para visualizar otro que se encuentra en bajas concentraciones se observa claramente en los perfiles cromatográficos por HPLC de las diferentes fracciones (3.11b/c, 3.12b/c). Estas diferencias en el contenido de los diferentes MS puede ser atribuida, en parte, a la ubicación geográfica del sitio de colecta de cada uno de los individuos estudiados, dado que cada sitio tiene características climáticas y ambientales diferentes y, particularmente, en el caso del individuo colectado en Mérida, éste se encuentra sometido a condiciones de estrés abiótico que incluyen contaminación, elevadas temperaturas y una mayor influencia antropogénica, en tanto que el individuo colectado en Calakmul se ha desarrollado en una zona alejada de la población.

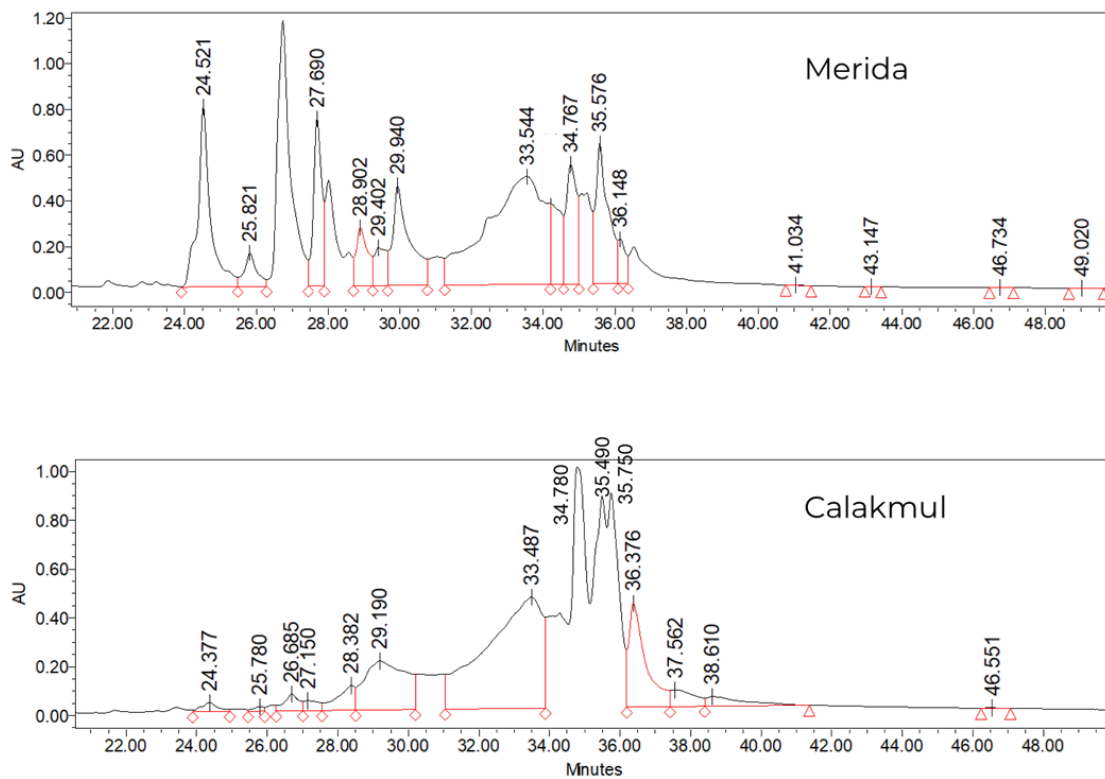


Figura 3.13. Comparación de los perfiles cromatográficos de los extractos crudos de corteza de *C. brasiliense* de Mérida y Calakmul.

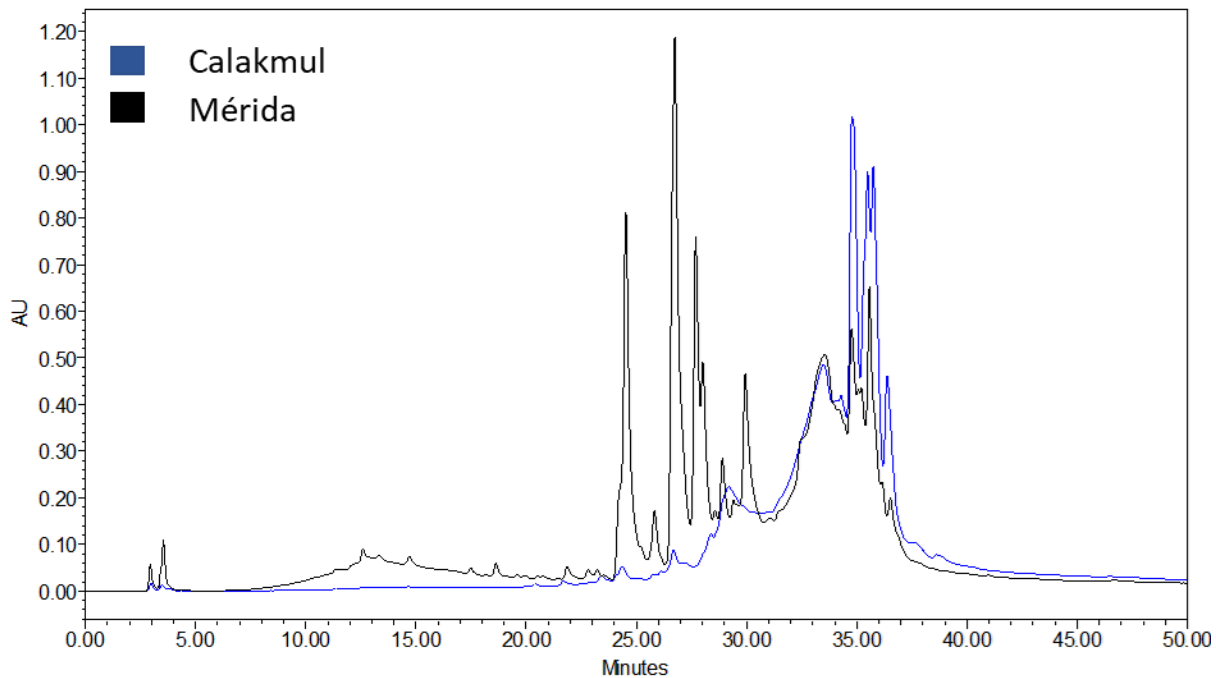


Figura 3.14. Comparación de los perfiles cromatográficos, obtenidos por HPLC, de los extractos crudos de la muestra de Mérida (en negro) y la de Calakmul (en azul).

3.3.2 Comparación de los extractos y fracciones de corteza y extractos foliares de *C. brasiliense* (segunda colecta)

Existen numerosos reportes sobre el efecto de la variación estacional en la producción de MS de plantas y actualmente se reconoce que estas variaciones en el contenido de MS pueden ser el resultado de diversos factores, como las fluctuaciones de temperatura, precipitación y horas de luz a la que se encuentran expuestas las plantas a lo largo del año (Mittal *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2011; Anesini *et al.*, 2008). Asimismo, se ha demostrado que estas variaciones responden a la necesidad de la planta de mantener condiciones adecuadas para su desarrollo en las diferentes etapas de su ciclo de vida, como, por ejemplo, la floración, la producción de frutos o el rebrote de las hojas (Ramírez-Briones *et al.*, 2017).

Hasta ahora, de la corteza de especies del género *Calophyllum* se han reportado xantonas con actividades biológicas variadas, incluyendo antiparasitaria, inhibitoria de sulfotransferasas y con efecto antinociceptivo (Klein-Júnior *et al.*, 2017; Abe *et al.*, 2004; Mesía-Vela *et al.*, 2001) y recientemente se reportó la presencia de jacaerubina (García-Niño *et al.*, 2017) y de macluraxantona (Silva-Castro *et al.*, 2021) en el extracto y fracciones de *C. brasiliense*. Tomando en cuenta que las diferencias observadas en los perfiles cromatográficos de los extractos de corteza de los individuos colectados en Mérida y en Calakmul, podrían deberse a la estacionalidad en la que se realizaron los muestreos en cada uno de los sitios de colecta (diciembre de 2018, Mérida y marzo de 2019, Calakmul), y con el fin de reducir la influencia de la variación estacional en la producción de MS de los individuos, se realizó una segunda colecta de material vegetal en cada una de las localidades previamente mencionadas. Los perfiles cromatográficos (TLC) de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de cada uno de los individuos no presentaron diferencias notables (Figura 3.15); sin embargo, al comparar los perfiles cromatográficos (TLC) de los extractos de corteza obtenidos de cada uno de los individuos en las diferentes colectas (1 y 2), nuevamente se observó una composición cualitativamente similar, pero cuantitativamente diferente entre los extractos de los individuos (Figura 3.16).

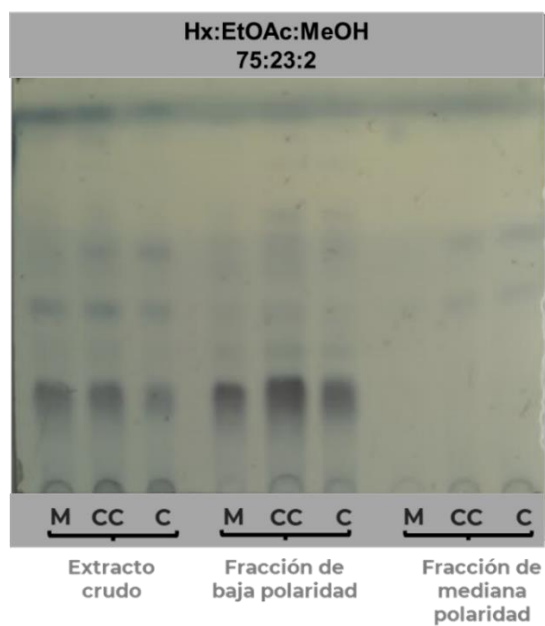


Figura 3.15. Perfil cromatográfico de extractos y fracciones obtenidos a partir de la corteza de individuos de *C. brasiliense* colectados en el segundo muestreo. CC: Co cromatografía, M: Mérida, C: Calakmul.

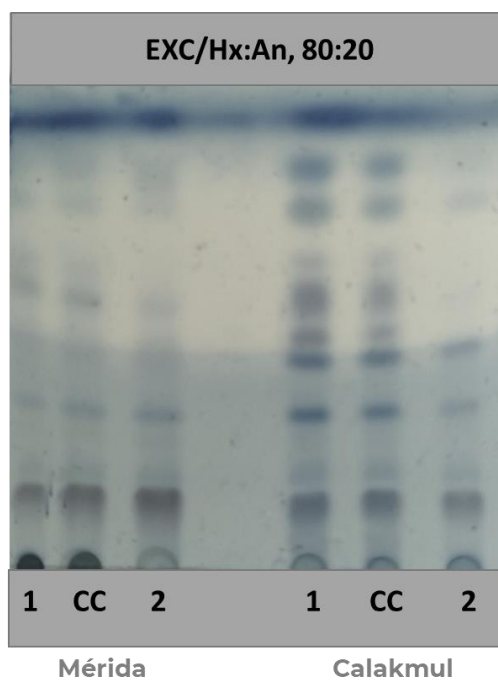


Figura 3.16. Comparación de los perfiles cromatográficos de extractos de corteza de *C. brasiliense* colectada en el primer (1) y en el segundo (2) muestreo. CC: Cromatografía.

Dado que la descripción e identificación de los quimiotipos de *C. brasiliense* se realizó únicamente con base en las diferencias en la composición de extractos foliares (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2011; Reyes-Chilpa y Huerta -Reyes, 2009; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004), en el presente estudio, durante la segunda colecta de *C. brasiliense* se colectó material foliar de cada uno de los individuos, con el fin de estudiar su perfil cromatográfico por TLC. En este caso, y aun cuando se observaron algunos componentes similares en los dos extractos, los perfiles cromatográficos (TLC) de los extractos de las hojas de los individuos colectados en Mérida y en Calakmul, mostraron cada uno la presencia de un componente mayoritario diferente (Figura 3.17).

Debido a que macluraxantona se identificó como la xantona principal en el extracto de corteza del individuo colectado en Mérida, pero no se detectó, por TLC o en el análisis de desduplicación de las fracciones obtenidas del extracto de corteza del individuo colectado en Calakmul, se realizó una comparación por TLC de los diferentes extractos de hoja con un estándar de macluraxantona. Los resultados obtenidos demostraron que macluraxantona no está presente en los extractos de hojas de *C. brasiliense* de ninguna de las dos localidades (Figura 3.18), aunque la presencia de componentes con actividad antioxidante en los extractos y fracciones sugiere la posible presencia de otras xantonas, confirmando los reportes de este y otros tipos de metabolitos (e.g. ácido shikímico, biflavonoides y terpenos) en las hojas de *C. brasiliense* (Marchiosi *et al.*, 2019; Ito *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2001). A pesar de estas diferencias, la presencia de calanólido E y ácido isoapetálico, detectados en el análisis de desduplicación de fracciones de extractos de corteza de individuos colectados en Calakmul durante la primera colecta, indica que los individuos de *C. brasiliense* de ambas localidades tienen MS en común.

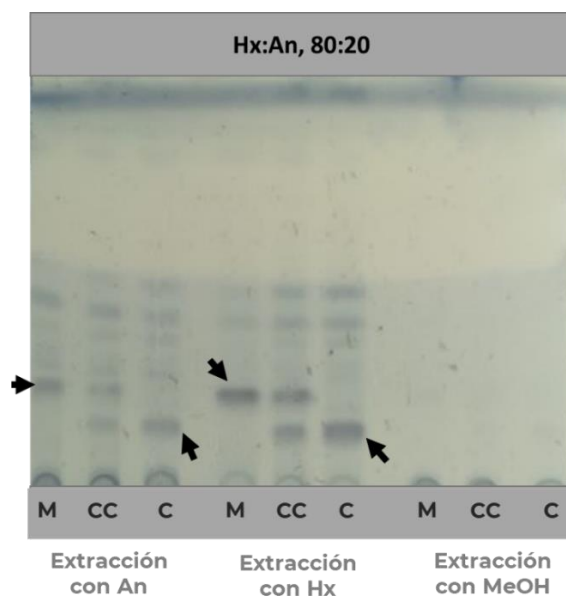


Figura 3.17. Perfiles cromatográficos de extractos de hojas de *C. brasiliense* colectados en Mérida (M) y Calakmul (C). CC: Co cromatografía.

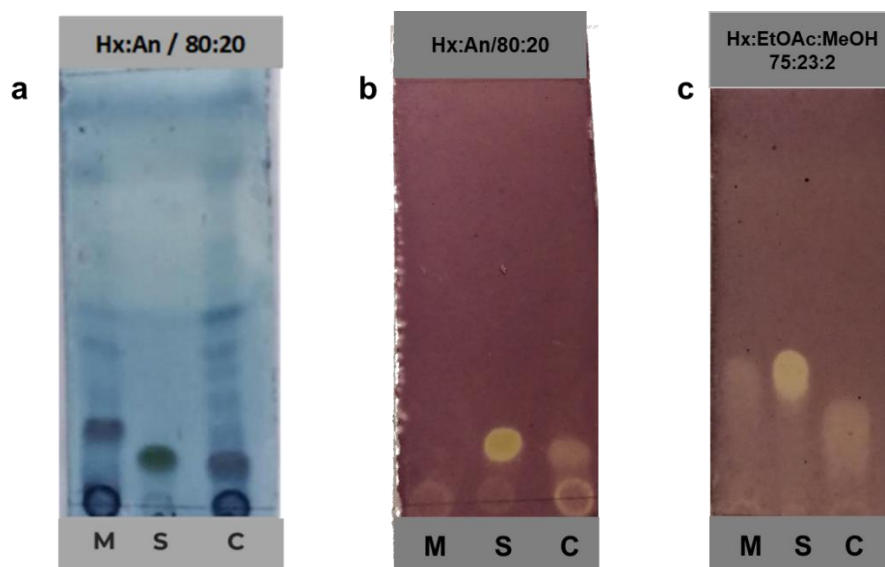


Figura 3.18. Comparación entre los perfiles cromatográficos de los extractos de baja polaridad de las hojas de *C. brasiliense* colectadas en Mérida (M) y en Calakmul (C) y el estándar de macluraxantona (S), empleando dos sistemas de elución diferentes y revelados con ácido fosfomolibdico (a) y DPPH (b y c).

Aunque no existen reglas bien establecidas para la definición de quimiotipos, es necesario tomar en cuenta ciertos factores para descartar que las diferencias en los perfiles químicos no son el resultado de las variaciones comunes en la síntesis de MS producidas por el cambio de estación (Polatoğlu, 2013), ya que las diferencias cualitativas o cuantitativas observadas en los perfiles químicos de los individuos estudiados podrían deberse más a procesos de adaptación estacionales que a cambios en su genotipo, siendo, esto último, un factor determinante para el establecimiento de la presencia de quimiotipos dentro de poblaciones de una misma especie (Desjardins, 2008).

Tomando en cuenta que las primeras colectas de *C. brasiliense* se realizaron en localidades y periodos estacionales muy diferentes entre sí, en conjunto, los factores naturales y los antropogénicos podrían estar causando que el perfil de MS de los extractos de corteza y fracciones de baja y mediana polaridad de los individuos colectados en Mérida y Calakmul (primera colecta) presenten diferencias cuantitativas. Lo anterior se confirmó al comparar los extractos crudos y fracciones de la corteza de individuos de *C. brasiliense* colectados en cada una de las localidades, durante el mismo periodo estacional.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

Los resultados de los análisis de desduplicación de las fracciones semipurificadas de *G. intermedia* y *C. brasiliense* comprobaron la capacidad de este tipo de análisis para identificar MS presentes en una mezcla, sin necesidad de purificar por completo una fracción.

Asimismo, los resultados de los análisis de desduplicación demostraron su importancia para predecir la presencia de un tipo en particular de MS en una fracción, por lo que constituye una buena herramienta para seleccionar fracciones que podrían contener MS estructural o biológicamente interesantes, por ejemplo, la presencia de PPAPS en fracciones semipurificadas de *G. intermedia*, o de xantonas en *C. brasiliense*.

En la fracción FHCCVJ de *C. brasiliense*, se propone la presencia de MS de tipo xantona que no pudieron ser identificados y los análisis cromatográficos por TLC hechos a los extractos de corteza, tampoco pudieron confirmar que se trata de macluraxantona. Las xantonas han sido ampliamente reportadas en el género *Calophyllum*, por lo cual, al no poderse confirmar la identificación de los MS presentes en esta fracción, es probable que pueda ser aislado un producto que no haya sido reportado en el género o incluso, un metabolito novedoso.

Los resultados de los análisis de desduplicación de las fracciones GFHCVC (*G. intermedia*) y FHCCVJ (*C. brasiliense*) confirman que la desduplicación asistida por ^{13}C -RMN puede ser considerada como una estrategia de gran utilidad para dirigir los procesos de purificación y aislamiento de MS interesantes.

Si bien, los resultados de los análisis cromatográficos empleados para estudiar los extractos y fracciones de corteza de *C. brasiliense* no mostraron variaciones importantes en la composición química de ambas localidades, en los extractos de las hojas sí se observaron diferencias evidentes en los perfiles cromatográficos obtenidos por TLC, por lo que se sugiere que los individuos de *C. brasiliense* de la península de Yucatán podrían estar produciendo diferentes tipos de metabolitos secundarios y podrían identificarse como pertenecientes a cada uno de los dos quimiotipos reportados anteriormente para esta especie.

4.2 PERSPECTIVAS

Dado que el conocimiento fitoquímico de *G. intermedia* es todavía limitado, y tomando en cuenta la diversidad estructural y actividad biológica de los PPAPS, el continuar con el estudio fitoquímico de las fracciones semipurificadas de *G. intermedia* permitirá confirmar la aplicación de los análisis de desduplicación para la identificación de PPAPS y otros MS con estructuras novedosas. De la misma forma, la purificación de fracciones semipurificadas de corteza y hojas permitirá obtener nuevas xantonas con potencial actividad biológica.

Finalmente, para establecer la presencia de quimiotipos de *C. brasiliense* en la península de Yucatán, es necesario llevar a cabo un estudio fitoquímico más profundo de los extractos de corteza y de hojas de los individuos colectados en cada una de las localidades y confirmar los resultados obtenidos mediante el uso de herramientas de biología molecular que permitan establecer, de manera complementaria, si existen diferencias genéticas en las rutas biosintéticas que producen los metabolitos que son diferentes en el perfil químico de cada individuo. Asimismo, y dado que no se cuenta con más registros de poblaciones de *C. brasiliense* en la península de Yucatán, es importante ampliar las investigaciones en la distribución de esta especie con la finalidad de ubicar poblaciones con el número suficiente de individuos para poder realizar la comparación de su contenido químico.

REFERENCIAS

- Abe, F., Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Estrada-Muñiz, E., Huerta-Reyes, M., Reyes-Chilpa, R. (2004). Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27(1), 141-143.
- Acuña, U., Jancovski, N., Kennelly, E. (2009). Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: potential drugs and lead compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 9(16), 1560-1580.
- ALkhamaiseh, S., Taher, M., Farediah, A. (2011). The Phytochemical Contents and Antimicrobial Activities of Malaysian *Calophyllum rubiginosum*. *American Journal of Applied Sciences*. 8(3), 201-205.
- Almanza, G., Quispe, R., Mollinedo, P., Rodrigo, G., Fukushima, O., Villagomez, R., Akesson, B., Sterner, O. (2011). Antioxidant and Antimutagenic Polyisoprenylated Benzophenones and Xanthenes from *Rheedia acuminata*. *Natural Product Communication*. 6(9), 1269-1274.
- Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes, J., Delgado-Alvarado, E., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral, J. (2006). El Metabolismo Secundario de las Plantas, Un Nuevo Concepto. *Vid supra*. 1(2), 39-50.
- Almeida-Lima, A., Teixeira, R. (2017). Natural Benzophenones from Clusiaceae Family: Structural Diversity and Biological Activities, en: *Frontiers in Natural Product Chemistry*, Atta-ur-Rahman, FRS (Ed). Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, pp: 293-346.
- Aminudin, N., Ahmad, F., Taher, M., Zulkifli, R. (2016). Cytotoxic and Antibacterial Activities of Constituents from *Calophyllum ferrugineum* Ridley. *Records of Natural Products*. 10(5), 649-653.
- Anesini, C., Ferraro, G., Filip, R. (2008). Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(19), 9225–9229.

- Angami, T., Wangchu, L., Debnath, P., Sarma, P., Singh, B., Singh, A., Singh, S., Hazarika, B., Singh, M., Aochen, C., Lungmuana. (2021). *Garcinia* L.: a gold mine of future therapeutics. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 68, 11–24.
- Bello, A., Cuesta-Rubio, O., Cárdenas, J., Piccinelli, A., Rastrelli, L. (2008). Constituents of the Cuban Endemic Species *Calophyllum pinetorum*. *Journal of Natural Products*. 71, 1283-1286.
- Blundell, R., Azzopardi, J., Briffa, J., Rasul, A., Vargas-de la Cruz, C., Shah, M. (2020). Chapter 13 - Analysis of pentaterpenoids, en: *Recent Advances in Natural Products Analysis*, Sanches, A., Nabavi, S., Saeedi, M., Nabavi, S. (Eds.). Elsevier, pp. 457-475.
- Bruguière, A., Le Ray, A., Bréard, D., Blon, N., Bataillé, N., Guillemette, T., Simoneau P., Richomme, P. (2016). Identifying Natural Products (NPs) as potential UPR inhibitors for crop protection. *Planta Medica*. 81(S 01), S1–S381.
- Bruguière, A., Derbré, S., Diestch, J., Leguy, J., Rahier, V., Pottier, Q., Bréard, D., Sour, S., Vialt, G., Le-Ray, A., Saubion, F., Richomme, P. (2020). MixONat, a software for the dereplication of mixtures based on ¹³C NMR spectroscopy. *Analytical chemistry*. 92(13), 8793-8801.
- Cabral, C., Simas, M. (2017). Phytosterols in the Treatment of Hypercholesterolemia and Prevention of Cardiovascular Diseases. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 109(5), 475-482.
- Cao, S., Low, K., Glover, R., Crasta, S., Ng, S., Buss, A., Butler, M. (2006). Sundaicumones A and B, Polyprenylated Acylphloroglucinol Derivatives from *Calophyllum sundaicum* with Weak Activity against the Glucocorticoid Receptor. *Journal of Natural Products*. 69(4), 707–709.
- Carnevale, F., Pilon, A., Selegato, D., Freire, R., Gu, H., Raftery, D., Lopes, N., 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, 59.
- Chandler, D., Bailey, A., Tatchel, M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society Serie B*. 366, 1987-1998.

-
- Chen, J., Ting, C., Hwang, T., Chen, I. (2009). Benzophenone Derivatives from the Fruits of *Garcinia multiflora* and Their Anti-inflammatory Activity. *Journal of Natural Products*. 72(2), 253–258.
- Cieśła, Ł., Moaddel, R. (2016). Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. *Natural Product Reports*. 33(10), 1131-1145.
- Cuesta-Rubio, O., Padron, A., Velez, H., Pizza, C., Rastrelli, L. (2001). Aristophenones A and B. A New Tautomeric Pair of Polyisoprenylated Benzophenones from *Garcinia aristata*. *Journal of Natural Products*. 64, 973-975.
- da Silva, K., dos Santos, A., Mattos, P., Yunes, R., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V. (2001). Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie*. 56(4), 431-434.
- Dang, B., Guitton, Y., Freuze, I., Grovel, O., Litaudon, M., Richomme, P., Séraphine, D., Séverine, D. (2015). Dereplication of *Mammea neurophylla* metabolites to isolate original 4-phenylcoumarins. *Phytochemical Letters*. 11, 61-68.
- De Melo, M., Quintans de S, A., Duarte, M., Bonjardim, L., Nogueira, P., Moraes, V., de Araújo-Júnior, J., Ribeiro, E., Quintans-Júnior, J. (2014). A systematic review for anti-inflammatory property of Clusiaceae family: a preclinical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 960258.
- Desjardins, A. Natural Product Chemistry Meets Genetics: When Is a Genotype a Chemotype? (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. 56(17), 7587–7592.
- Dinan, L. (2005). Dereplication and partial identification of compounds, en: *Natural Products Isolation*, 2nd Edn, Sarker, D., Latif, Z., Gray, A. (Eds). Humana Press, New Jersey, pp. 297-321.
- Einbond, L., Mighty, J., Kashiwazaki, R., Figueroa, M., Jalees, F., Acuna, U., Le Gendre, O., Foster, D., Kennelly, E. (2013). *Garcinia* benzophenones inhibit the growth of human colon cancer cells and synergize with sulindac sulfide and turmeric. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. 13(10), 1540-1550.

- El Hamdaoui, Y., Zheng, F., Fritz, N., Ye, L., Tran, M., Schwickert, K., Schirmeister, T., Braeuning, A., Lichtenstein, D., Hellmich, U., Weikert, D., Heinrich, M., Treccani, G., Schäfer, M., Nowak, G., Nürnberg, B., Alzheimer, C., Müller, C., Friedland, K. (2022). Analysis of hyperforin (St. John's wort) action at TRPC6 channel leads to the development of a new class of antidepressant drugs. *Molecular Psychiatry*. 36224261.
- Ekeocha, P., Ezeh, C., Anyam, J., Ikekpeazu, J., Igoli, J. (2021). Isolation, Structural Elucidation and Therapeutic Potentials of Root of *Cucurbita pepo*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 83(6), 1288-1294.
- Espirito Santo, B., Santana, L., Kato, W., de Araújo, F., Bogo, D., Freitas, K., Guimarães, R., Hiane, P., Pott, A., Filiú, W., Arakaki, M., Figueiredo, P., Bastos, P. (2020). Medicinal Potential of *Garcinia* Species and Their Compounds. *Molecules*. 25(19), 4513.
- Filho, V., Meyre-silva, C., Niero, R. (2009). Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry and Biodiversity*. 6(3), 313-327.
- Forestrania, R., Anaya-Eugenio, G., Acuña, U., Ren, Y., Elya, B., de Blanco, E. (2020). Secondary metabolites from *Garcinia daedalanthera* Pierre leaves (Clusiaceae). *Natural Product Research*. 12, 1-7.
- García-Niño, W., Estrada-Muñiz, E., Valverde, M., Reyes-Chilpa, R., Vega, L. (2017). Cytogenetic effects of Jacareubin from *Calophyllum brasiliense* on human peripheral blood mononucleated cells in vitro and on mouse polychromatic erythrocytes in vivo. *Toxicology Applied Pharmacology*. 15(335), 6-15.
- García-Zebadúa, J., Magos-Guerrero, G., Mumbrú-Massip, M., Estrada-Muñoz, E., Contreras-Barrios, M., Huerta-Reyes, M., Campos-Lara, M., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R. (2011). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia*. 82(7), 1027-1034.
- García-Zebadúa, J., Reyes-Chilpa, R., Huerta-Reyes, M., Castillo-Arellano, J., Santillán-Hernández, S., Vázquez-Astudillo, B., Mendoza-Espinoza, J. (2014). El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: una revisión botánica, química y farmacéutica. *Vitae*. 21(2), 126-145.

-
- Giuffrida, D., Molinar, E., Murillo, E. (2022). First complete quali-quantitative carotenoids characterization of *Aiphanes aculeata*, *Quararibea cordata* and *Garcinia intermedia* fruits. *Applied Food Research*. 2(1), 100045.
- Gómez-Verjan, J., Gonzalez-Sanchez, I., Estrella-Parra, E., Reyes-Chilpa, R. (2015). Trends in the chemical and pharmacological research on the tropical trees *Calophyllum brasiliense* and *Calophyllum inophyllum*, a global context. *Scientometrics*. 105, 1019-1030.
- Guillemette, T., Calmes, B., Simoneau, P. (2014). Impact of UPR on the virulence of the plant fungal pathogen *A. brassicicola*. *Virulence*. 5(2), 357-364.
- Guillén-Enríquez, C., Lopez-Teros, V., Martín-Orozco, U., López-Díaz, J.A., Del Hierro-Ochoa, J., Ramos-Jiménez, A., Astiazarán-García, H., Martínez-Ruiz, N.D.R., Wall-Medrano, A. (2018). Selected Physiological Effects of a *Garcinia Gummi-Gutta* Extract in Rats Fed with Different Hypercaloric Diets. *Nutrients*. 10, 565.
- Güngör, H., Oluk, E. (2021). Description and Significance of Plant Chemotype. *Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology*. 10(2), 184-191.
- Gunter, N., The, S., Lim, Y., Mah, S. (2020). Natural Xanthenes and Skin Inflammatory Diseases: Multitargeting Mechanisms of Action and Potential Application. *Frontiers in Pharmacology*. 11, 594202.
- Gupta, S., Dikshit, A. (2010). Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides*. 3(1), 186-188.
- Gupta, S., Gupta, P. (2020). The Genus *Calophyllum*: Review of Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacology, en: *Bioactive Natural products in Drug Discovery*. Singh, J., Meshram, V., Gupta, M (Eds.). 8, 215-42.
- Gupta, S., Gupta, P. (2021). The Genus *Calophyllum*: Review of Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacology, en: *Bioactive Natural products in Drug Discovery*. Singh, J., Meshram, V., Gupta, M. (Eds.). Springer Nature Singapore, pp. 215-242.
- Gustafson, K., Blunt, J., Munro, M., Fuller, R., McKee, T, Cardellina, J., McMahon, J., Cragg, G., Boyd, M. (1992). The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia*

- globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron*. 48(46), 10093-10102.
- Hemshkhar, M., Sunitha, K., Sebastin, M., Devaraja, S., Kemparaju, K., Vishwanath, B., Niranjana, S., Girish, K. (2011). An overview of genus *Garcinia*: phytochemical and therapeutic aspects. *Phytochemistry Reviews*. 10, 325-351.
- Herbert-Doctor, L., Bruguère, A., Derbré, S., Richomme, P., Peña-Rodríguez, L. (2022). ¹³C-NMR dereplication-assisted isolation of bioactive polyphenolic metabolites from *Clusia flava* Jacq. *Natural Products Research*. 10, 1-10.
- Herbert-Doctor, L., Dzib, G., Hammel, B., Chi-Manzanero, B., Canto-Canché, B., García-Sosa, K., Richomme, P., Derbré, S., Peña-Rodríguez, L. (2021). *Clusia suborbicularis* is not a synonym of *Clusia flava*: Molecular and metabolomic evidence. *Taxon*. 70(6),1229-1238.
- Holopainen, M., Hiltunen, R., von Schantz M. (1987). A study on tansy chemotypes. *Planta Medica*. 53(3), 284-287.
- Hubby, J., Forrest, H. (1960). Studies on the Mutant Maroon-like in *Drosophila Melanogaster*. *Genetics*. 45(2), 211-224.
- Hubert, J., Nuzillard, J.M., Renault, J.H. (2015). Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochemistry Review*. 16, 55-95.
- Huerta-Reyes, M., Basualdo M., Lozada, L., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., Reyes-Chilpa, R. (2004). HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. **2004**. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27(6), 916-920.
- Isaias, D., Niero, R., Noldin, V., de Campos-Buzzi, F., Yunes, R., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V. (2004). Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Pharmazie*. 59(11), 879-881.
- Ito, C., Itoigawa, M., Mishina, Y., Cechinel, V., Mukainaka, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H. (2002). Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: Structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. *Journal of Natural Products*. 65, 267–272.

-
- Ito, C., Itoigawa, M., Mishina, Y., Filho, V., Enjo, F., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H. (2003). Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *Journal of Natural Products*. 66(3), 368-371.
- Ito, T., Masubuchi, M. (2014). Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *The Journal of Antibiotics*. 67, 353–360.
- Itoigawa, M., Ito, C., Tan, H., Kuchide, M., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H. (2001). Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Cancer Letters*. 169(1),15-19.
- Jamila, N., Khairuddean, M., Khan, S., Khan, N. (2014). Complete NMR assignments of bioactive rotameric (3–8) biflavonoids from the bark of *Garcinia hombroniana*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 52, 345-52.
- Jayakar, V., Lokapur, V., Shantaram, M. (2020). Identification of the volatile bioactive compounds by GC-MS analysis from the leaf extracts of *Garcinia cambogia* and *Garcinia indica*. *Medicinal Plants*. 12(4), 580-590.
- Jiménez, C. (2013). El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *Anales de Química de la RSEQ*. 109(2), 134-141.
- Kamal, N., Clements, C., Gray, A., Edrada-Ebel, R. (2016). Anti-infective Activities of Secondary Metabolites from *Vitex pinnata*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6(1), 102-106
- Karpuz, M., Gunay, M., Ozer, A. (2020). Liposomes and phytosomes for phytoconstituents, en: *Advances in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biologicals Agents*, Singh, R., Singh, D., Kanwar, J., Singh, N. (Eds.). Academic Press, pp 525-553.
- Keefover-Ring, K., Thompson, J., Linhart, Y. (2009). Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and Fragrance Journal*. 24(3), 117-122.
- Klein-Júnior, L., Zambiasi, D., Salgado, G., Delle Monache, F., Cechinel, F., Campos, F. (2017). The validation of *Calophyllum brasiliense* (“guanandi”) uses in Brazilian traditional

- medicine as analgesic by in vivo antinociceptive evaluation and its chemical analysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 390, 733–739.
- Knight, S. (1974). Carbon-13 RMN Spectra of some Tetra- and Pentacyclic Triterpenoids. *Organic Magnetic Resonance*. 6, 603-611.
- Krisanti, E., Farisal, A., Mulia, K. (2021). *Garcinia mangostana* L. fruit rind extract in ethyl acetate, n- butanol and water fractions: phytochemical analysis, antioxidant assay and cytotoxicity assay. *IOP Conference Series Material Science and Engineering*. 1053, 012040.
- Kuete, V., Meli, A., Komguem, J., Louh, G., Tangmouo, J., Lontsi, D., Meller, J., Lall, N. (2007). Antimycobacterial, Antibacterial and Antifungal Activities of the Methanolic Extract and Compounds from *Garcinia polyantha*. *Pharmacology online*. 3, 87-95.
- Kumar, S., Sharma, S, Chattopadhyay, S. (2013). The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia*. 89, 86-125.
- Lam, K.S. (2007). New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*. 15(6), 279-280.
- Lannang, A., Louh, G., Lontsi, D., Specht, S., Sarite, S., Flörke, U., Hussain, H., Hoerauf, A., Krohn, K. (2008). Antimalarial Compounds from the Root Bark of *Garcinia polyantha* Oliv. *The Journal Antibiotics*. 61(8), 518–523.
- Lemus, C., Smith-Ravin, J., Marcelin, O. (2021). *Mammea americana*: A review of traditional uses, phytochemistry and biological activities. *Journal of Herbal Medicine*. 29(5), 100466.
- Lianza, M., Leroy, R., Machado, C., borie, N., Sayagh, C., Remy, S., Kuhn, S., Renault, J., Nuzillard, J. (2021). The Three Pillars of Natural Products Dereplication. Alkaloids from the Bulbs of *Urceolina peruviana* (C. Presl) J.F. Macbr. as a Preliminary Test Cast. *Molecules*. 26, 637.
- Marchiosi, R., Ferro, A., Ramos, A., Baldoqui, D., Constantin, R., Constantin, R., dos Santos, W., Ferrarese-Filho, O. (2019). *Calophyllum brasiliense* Cambess: An alternative and promising source of shikimic acid. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 14, 100188.

-
- Martínez y Pérez, J., Castillo-Campos, G., Nicolalde, F. (2015). Flora de Veracruz, Clusiaceae, Fascículo 165. Instituto de Ecología, México, pp 1-3.
- Mesía-Vela, S., Sánchez, R., Estrada-Muñiz, E., Alavez-Solano, D., Torres-Sosa, C., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Kauffman, F. (2001). Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases, SULT1A1 and SULT2A1. *Phytomedicine*. 8(6), 481-488.
- Matos, M., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O., Molina, E., Yordi, E. (2015). Coumarins: An Important Class of Phytochemicals, en: *Phytochemicals - Isolation, Characterization and Role in Human Health*, Venketeshwer, R. (Ed.). InTech.
- McKee, T., Covington, C., Fuller, R., Bokesch, H., Young, S., Kadushin, M., Soejarto, D., Stevens, P., Cragg, G., Boyd, M. (1998). Pyranocoumarins from Tropical Species of the Genus *Calophyllum*: A Chemotaxonomic Study of Extracts in the National Cancer Institute Collection 1. *Journal of Natural Products*. 61, 1252-1256.
- McKee, T., Fuller, R., Covington, C., Cardellina, J., Gulakowski, R., Krepps, B., Boyd, M. (1996). New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. *Journal of Natural Products*, 59(8), 754–758.
- Mittal, K., Malik, J., Gautam, V. (2013). Effect of Geographical and Seasonal Variation on the oil yield and geraniol content of *Pelargonium graveolens*. *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research*. 3(3), 45-50.
- Moreau, R., Whitaker, B., Hicks, K. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*. 41 (6), 457–500.
- Morel, C., Seraphin, D., Teyrouz, A., Larcher, G., Bouchara, J. P., Litaudon, M., Richomme, P., Bruneton, J. (2002). New and Antifungal Xanthones from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Medica*. 68(1), 41-44.
- Muñoz-Acuña, U. (2011). Phenolic Constituents from *Garcinia intermedia* and Related Species. Tesis de doctorado. City University of New York, EEUU. pp 110.

- Muñoz-Acuña, U., Dastmalchi, K., Basile, M., Kennelly, E. (2012). Quantitative high-performance liquid chromatography photo-diode array (HPLC-PDA) analysis of benzophenones and biflavonoids in eight *Garcinia* species. *Journal of Food Composition and Analysis*. 25(2), 215-220.
- Muñoz-Acuña, U., Figueroa, M., Kavalier, A., Jancovski, N., Basile, M., Kennelly, E. (2010). Benzophenones and biflavonoids from *Rheedia edulis*. *Journal of Natural Products*. 73(11), 1775-1779.
- Muñoz-Acuña, U., Jancovski, N., Kenelly, E. (2009). Polyisoprenylated Benzophenones from Clusiaceae: Potential Drugs and Lead Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 9: 1560-1580.
- Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martínez, A., Mondello, L. (2013). Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry*. 140(4), 825-836.
- Nahar, L., Das, A., Nath, D., Nath, S., Mehan, A., Ismail, F., Sarker, S. (2020). Naturally Occurring Calanolides: Occurrence, Biosynthesis, and Pharmacological Properties Including Therapeutic Potential. *Molecules*. 25(21), 4983.
- Najib, S., Ekayanti, M., Ardiana, L., Sauriasari, R., Elya, B. (2017). Pharmacognostical and phytochemical evaluation leaves extract of *Garcinia daedalanthera* Pierre. *Journal of Young Pharmacists*. 9, 60–64
- Newman, D., Cragg, G. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 79(3), 629-661.
- Nguyen, H., Németh, E. (2016). Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 3(4), 143-150.
- Nuzillard, J. (2021). Taxonomy-Focused Natural Product Databases for Carbon-13 NMR-Based Dereplication. *Analytica*. 2, 50-56.
- Patil, A. (2020). Plant Secondary Metabolites: Isolation, Characterization & Biological Properties. Studera Press, Delhi, pp. 39-40.

- Patil, M., Appaiah, K. (2015). *Garcinia*: Bioactive compounds and health benefits, en: Introduction to Functional Food Science, Martirosyan, D.M. (Ed.). CreateSpace Independent Publishing Platform. 1, pp. 110–125.
- Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., Pérez-Rojas, J. (2008). Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology*. 46(10), 3227-3239.
- Pennington, T., Sarukhán J. (1998). Árboles tropicales de México. 2ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. Fondo de Cultura Económica. 521 p.
- Peraza-Sánchez, S., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M., Mut-Martín, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*. 78(4), 315-318.
- Pérez-Alonso, N., Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 11(4), 195-211.
- Pittier, Hammel. (1989). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 76(3), 927–928. Semwal, R., Semwal, D., Vermaak, I., Viljoen, A. (2015). A comprehensive scientific overview of *Garcinia cambogia*. *Fitoterapia*. 102, 134-48.
- Polatoğlu, K. (2013). “Chemotypes”– A Fact that should not be Ignored in Natural Product Studies. *The Natural Products Journal*. 3(1), 10-14.
- POWO (Plants Of the World Online). (2021). *Calophyllum brasiliense* Cambess. **2021**. Publicado en internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000581058>. [Acceso 6 octubre 2021].
- Ramírez-Briones, E., Rodríguez-Macías, R., Salcedo-Pérez, E., Martínez-Gallardo, N., Tiessen, A., Molina-Torres, J., Délano-Frier, J., Zañudo-Hernández, J. (2017). Seasonal variation in non-structural carbohydrates, sucrolytic activity and secondary metabolites in deciduous and perennial *Diospyros* species sampled in Western Mexico. *Plos One*. 12(10), e0187235.

- Ramos-Hryb, A., Cunha, M., Kaster, M., Rodrigues, A. (2018). Chapter 6 - Natural Polyphenols and Terpenoids for Depression Treatment: Current Status, en: *Studies in Natural Products Chemistry*. Volume 55, Rahman, A. (Ed.). Elsevier, pp. 181-221,
- Ravelonjato, B., Kunesch, N., Poisson, J. (1987). Neoflavonoids from the stem bark of *Calophyllum verticillatum*. *Phytochemistry*. 26(11), 2973-2976.
- Resende, D., Pereira-Terra, P., Inácio, Â., Costa, P., Pinto, E., Sousa, E., Pinto, M. (2018). Lichen Xanthonones as Models for New Antifungal Agents. *Molecules*. 23, 2617.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Ramírez, T., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C., Vázquez-Torres, M. (2004). Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Science*. 75, 1635-1647.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Vega-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J., Hernández-Ortega, S. (2008). Trypanocidal constituents in plants: 7. Mammea-type coumarins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 103(5), 431-436.
- Reyes-Chilpa, R., Huerta-Reyes, M. (2009). Natural compounds from plants of the Clusiaceae family: Type 1 human immunodeficiency virus inhibitors. *Interciencia*. 34(6), 385-392.
- Reynolds, W. (2017). Natural Products Structure Elucidation by NMR Spectroscopy, en: *Pharmacognosy: Fundamentals, Application and Strategies*. Badal, S., Delgoda, R. (Eds). Academic Press, pp 567-568.
- Ruiz-Marcial, C., Reyes-Chilpa, R., Estrada, E., Reyes-Esparza, J., Garrido-Fariña, G., Rodríguez-Fragoso, L. (2007). Antiproliferative, cytotoxic and antitumor activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59, 719-725.
- Sadikun, A., Aminah, I., Ismail, N., Ibrahim, P. (1996). Sterols and Sterol Glycosides from the Leaves of *Gynura procumbens*. *Natural Products Science*. 2(1), 19-23.
- Sakunpak, A., Panichayupakaranant, P. (2012). Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food Chemistry*. 130(4), 826-831.

-
- Salleh, W., Sazali, N., Ahmad, F., Taher, M. (2017). Biflavonoids from the leaves and stem bark of *Garcinia griffithii* and their biological activities. *Marmara Pharmaceutical. Journal.* 21(4), 889-897.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., Rocha-Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 21(3), 355-363.
- Shadid, K., Shaari, K., Abas, F., Israfi, D., Hamzah, A., Syakroni, N., Saha, K., Lajis, N. (2007). Cytotoxic caged-polyprenylated xanthonoids and a xanthone from *Garcinia cantleyana*. *Phytochemistry.* 68(20), 2537-2544.
- Shen, Y., Wang, L., Khalil, A., Kuo, Y. (2004). Chromanones and Dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 52(4), 402-405.
- Silva, L., Gomes, K., Costa-Silva, T., Romanelli, M., Tempone, A., Sartorelli, P., Lago, J. (2020). Calanolides E1 and E2, two related coumarins from *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae), displayed in vitro activity against amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. *Natural Product Research.* 35(23), 5373-5377.
- Silva, K., Santos, A., Matos, P., Yunes, R., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V. (2001). Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense*. *Therapie.* 56, 431-434.
- Silva-Castro, L. (2020). Búsqueda de inhibidores naturales de UPR para el control de hongos fitopatógenos. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 114.
- Silva-Castro, L., Derbré, S., Le Ray, A., Richomme, P., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L. (2021). Using ¹³C-NMR dereplication to aid in the identification of xanthonoids present in the stem bark extract of *Calophyllum Brasiliense*. *Phytochemical Analysis.* E1, 1-7.
- Stevens, P. (1980). A revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum.* 61(2), 117-171.

- Trejo-Torres, J. C., Rodríguez, J. (2014). Listas para Usarse: Los Árboles del Mayab (Campeche, Quintana Roo y Yucatán), v. 1. www.PlantasDelMayab.com [Acceso 10 junio 2021]
- Venancio-Rodríguez, C., Pérez-Torres, C., Ibarra-Laclette, E. (2021). Cumarinas: metabolitos secundarios de amplia actividad en plantas. <https://www.inecol.mx> [Acceso 26 marzo 2021]
- Verma, R., Verma, R.K., Chauhan, A., Yadav, A. (2011). Seasonal Variation in Essential Oil Content and Composition of Thyme, *Thymus serpyllum* L. Cultivated in Uttarakhand Hills Indian. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73(2), 233–35.
- Wawer, I. (2008). Chapter 4 - Solid-State Measurements of Drugs and Drug Formulations, en: *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Holzgrabe, U., Wawer, I., Diehl, B. (Eds.). Elsevier, pp. 201-231.
- Williams, R., O’Niel-Johnson, M., Williams, A., Wheeler, P., Pol, R., Moser, A. (2015). Dereplication of natural products using minimal NMR data inputs. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 13, 9957.
- World Flora Online. (2018). *Calophyllum brasiliense* Cambess. <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000581058>. [Acceso 06 octubre 2021].
- World Health Organization. (2018). Pesticide residues in food. (2018). <https://www.who.int/es> [Acceso 03 abril 2021].
- Yang, X., Grossman, R., Xu, G. (2018). Research Progress of Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. *Chemical Reviews*. 118(7), 3508-3558.
- Ye, H., Wang, Q., Zhu, F., Feng, G., Yan, C., Zhang, J. (2020). Antifungal Activity of Alpha-Mangostin against *Colletotrichum gloeosporioides* In Vitro and In Vivo. *Molecules*. 25, 5335.
- Zavaleta-Mancera, H., Reyes-Chilpa, R., García-Zebadua, J. (2011). Leaf Structure of Two Chemotypes of *Calophyllum brasiliense* from Mexico. *Microscopy and Microanalysis*. 17(S2), 340-341.