

Análisis fitoquímico preliminar y valoración de la actividad antioxidante de tres especies de Mangle de Campeche, México

Francisco J. Aguirre-Crespo^{a*}, Luis D. Cu-Quíñones^a, Marco A. Popoca-Cuaya, María G. Maldonado-Velázquez, Carlos Chan-Keb^a, Claudia M. Graz-Hernaández^b, Emanuel Hernández-Núñez^c

^aFacultad de Ciencias Químico-Biológicas, ^bInstituto EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar S/N entre Calle 20 y Juan de la Barrera, Col. Buenavista, CP 24039, San Francisco de Campeche, Campeche, México.

^cDpto. Recursos de Mar, CINVESTAV-Mérida. Mérida Yucatán, México.

*fjaguirr@uacam.mx

Recibido: 01 Mayo 2021, Aceptado: 31 Mayo 2021.

Resumen

Rhizophora mangle, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* son especies presentes en la Reserva de la Biosfera Los Petenes, Campeche, México, y cuentan con reportes de usos tradicionales en la salud humana. El presente trabajo plantea identificar la especie idónea para la búsqueda de entidades químicas con aplicaciones terapéuticas. Las hojas de *L. racemosa* tienen el mejor rendimiento de extracción metanólica (35.29±0.45%); mediante espectroscopía y métodos químicos se identifica una gran diversidad de familias de metabolitos secundarios en todas las especies. El mayor contenido de clorofilas (0.27±0.03 mg/g), carotenoides (0.015±0.002 mg/g) y fenoles simples (0.79±0.001 mg/g eq. AG) se registra en *R. mangle* y flavonoides (0.228±0.001 mg/g eq. Q) en *A. germinans*. *L. racemosa* presenta la mejor actividad antioxidante en el modelo de DPPH (CE₅₀: 59.2 µg/mL; E_{max}: 68.8±1.6%), sin embargo, es menor a *C. sinensis* (CE₅₀: 4.85 µg/mL; E_{max}: 93.37±0.14%). Finalmente, mediante FTIR se identifica la presencia de AG, Q y catequina (C) en *R. mangle* y se estima un 0.33 y 0.73% de AG en *R. mangle* y *A. germinans*, respectivamente. *L. racemosa* es la especie idónea para el desarrollo de un estudio fitoquímico biodirigido orientado a la identificación de entidades químicas no polifenólicas con actividad antioxidante.

Palabras clave: *Rhizophora mangle* L., *Avicennia germinans* L., *Laguncularia racemosa* L., Antioxidante, DPPH.

1. Introducción

Los manglares son comunidades de importancia ecológica conformada por árboles o arbustos que crecen en las zonas costeras salobres, zonas fangosas y suelos rocosos [1]. En México, la Reserva de la Biosfera Los Petenes (RBLP) se localiza en la franja costera del estado de Campeche al noroeste de la Península de Yucatán, presenta petenes conformados por bosque subcaducifolio y manglares [2]. En la RBLP predominan comunidades de manglar de tipo borde y cuenca (42.2% de la superficie terrestre) [3].

A nivel global, especialmente en países del sureste asiático, se han documentado aspectos taxonómicos, de distribución, morfológicos, etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos de especies asociadas al manglar (84 especies) y se identifican 27 especies con usos medicinales tradicionales [4]. En la RBLP se reporta la presencia de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. (Combretaceae), *Avicennia germinans* (L.) L. (Acanthaceae) y *Conocarpus erectus* L. (Combretaceae) [5] entre otras especies, las cuales sufren el impacto de la modificación del flujo de agua, la deforestación, contaminación orgánica y presencia de desechos sólidos, contaminación química, entre otros factores [6] que modifican su fisiología y desarrollo.

Desde una perspectiva etnomédica, las raíces, corteza y

hojas de *R. mangle* se emplean para aliviar la diarrea, en infecciones por hongos, como antiséptico, en la elefantiasis, disentería, lepra, fracturas de huesos, tuberculosis, dolor de muelas y diabetes. La corteza de *L. racemosa* se emplean como cicatrizante y en la elaboración de jabón. Corteza, hojas y frutos de *A. germinans* se emplea como astringente, en la malaria, en hemorroides, reumatismos, en la hinchazón, dolor de garganta, en la incontinencia, dolor de pecho y en úlceras bucales [4,7]. La medicina tradicional de Campeche adquiere relevancia por la diversidad de especies vegetales, la herencia cultural Maya, la migración de grupos étnicos [8] y por los estudios científicos que validan el uso tradicional de la flora.

Actualmente, las hojas de *R. mangle*, *L. racemosa* y *A. germinans* cuentan con estudios fitoquímicos y farmacológicos que apoyan la validación del uso tradicional [4]. En este sentido, se reporta la presencia de taninos, triterpenos, flavonoides, glicósidos de flavonoides en *R. mangle* [9,10]; polifenoles, taninos, saponinas, esteroides, cumarinas en *L. racemosa* [11,12] y en *A. germinans* se reporta la presencia de glicósidos [13]. De igual forma, ensayos *in vitro* han demostrado actividad antioxidante (DPPH, FRAP y SO) inducida por los extractos de *R. mangle* [14,15]; inhibición de proteína quinasa por *L. racemosa* [12] y actividad antimicrobiana por extractos *A. germinans* [16].

A pesar de los amplios trabajos realizados con las

especies, se requiere reforzar los estudios fitoquímicos y farmacológicos de *R. mangle* (mangle rojo), *L. racemosa* (mangle blanco) y *A. germinans* (mangle negro) desarrollados en la RBLP. En este sentido, el presente trabajo plantea identificar la especie idónea para la búsqueda de entidades químicas con aplicaciones al control del estrés oxidativo asociado a procesos patológicos de inflamación, dolor, diabetes, hipertensión, entre otros.

2. Parte experimental

Hojas de *R. mangle*, *L. racemosa*, *A. germinans* fueron colectadas en Peten Neyac, Campeche, México; depositadas e identificadas en el Herbario CIHyS-UACAM. El material se secó a temperatura ambiente, a la sombra y se molió; finalmente, se resguardo bajo las recomendaciones de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos [17].

Los extractos se obtuvieron vía maceración (2g:40mL. m/Vol; MeOH; 24 h; 25°C), se filtraron, secaron y almacenaron en refrigeración (5°C); la variación en el rendimiento se determinó mediante un método gravimétrico.

El análisis fitoquímico cualitativo se llevó a cabo mediante el empleo del índice de espuma (saponinas), reacción de Meyer y Dragendorff (alcaloides), de Liebermann-Burchard (esteres insaturados y triterpenos pentacíclicos), de Baljet (cumarinas), ácido pícrico en Na₂CO₃ (glucósidos cianogénicos), ácido 3,5-dinitrobenzoico/KOH (glucósidos cardiotónicos), FeCl₃ (polifenoles), HCl/Mg²⁺ (flavonoides), KOH/CH₃CH₂COOH/ C₆H₆/NH₃OH (antraquinonas) [18].

Los extractos se examinaron en la región UV-Vis [19] y por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) [20]. La determinación de clorofilas y carotenoides se llevó de acuerdo con lo descrito por [21,22]. Fenoles simples equivalentes al ácido gálico (AG, **1**) y flavonoides equivalentes a quercetina (Q, **2**) se llevó a cabo de acuerdo con [23,24]. La actividad antioxidante bajo el modelo del DPPH se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por [23]. Finalmente, soluciones de los extractos metanólicos de *Camellia sinensis* (1-50 µg/mL) y del ácido gálico (1-6 µg/mL) se emplearon como controles positivos.

Todas las muestras en estudio se realizaron con tres experimentos independientes y tres réplicas cada uno. Los gráficos se construyeron mediante el empleo de Origin 8.0 y se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA); valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. Resultados y discusión

L. racemosa registra un mayor rendimiento de extracción metanólica (35.29±0.45%), con respecto al registro de *R. mangle* (19.49±1.35%) y *A. germinans* (20.01±1.51%). La evaluación cualitativa química permite identificar la presencia de alcaloides, esteroides insaturados, polifenoles simples, glucósidos cardiacos y cianogénicos,

flavonoides y saponinas en los extractos metanólicos derivados de las hojas de *L. racemosa*, *R. mangle* y *A. germinans*.

La clorofila, los carotenoides, así como las antocianinas, betalainas y flavonoides se destacan como pigmentos vegetales lipo- e hidrosolubles [25]. El análisis de la región UV-Vis permite la estimación de clorofilas y carotenoides en *R. mangle* (0.27±0.03 y 0.015±0.002 mg/g), *L. racemosa* (0.12±0.02 y 0.007± 0.003 mg/g) y en *A. germinans* (0.20±0.03 y 0.009±0.002 mg/g). Los mejores rendimientos se registran en *R. mangle*, sin embargo, su valoración requiere ser llevada a cabo en material fresco y el empleo de acetona al 80% a 5°C, sistema de extracción ampliamente reconocido en la extracción y estimación de pigmentos liposolubles [26]. Los espectros FTIR de los extractos secos de *R. mangle*, *L. racemosa* y *A. germinans* describen seis bandas en la región de grupos funcionales y en ellas se observan sobre tonos y/o superposiciones que están relacionados con la abundancia y diversidad de los grupos funcionales presentes en los metabolitos secundarios presentes en los extractos (**Figura 1**).

En la banda 3286.89±52.59 cm⁻¹ se identifican estrechamientos de R-OH típicos en agua, alcoholes, fenoles, flavonoides, amidas. Las bandas 2924.09±3.23 y 2851.41 cm⁻¹ corresponde a vibraciones de estrechamiento y deformantes de R-CH₃ y R-CH₂ presentes en lípidos, derivados metoxilados, aldehídos. Entre 1800-1600 cm⁻¹, las vibraciones a 1653 cm⁻¹ se relacionan con estrechamiento C=O presentes en amidas primarias, cetonas, aldehídos, ésteres de ácidos grasos libres; la presencia de lípidos en *R. mangle* y *L. racemosa* se confirma con bandas a 1720 y 1203.31±8.4 cm⁻¹; dichas bandas no están presentes en el extracto de *A. germinans*, sin embargo, con la presencia de una banda a 1474.16 cm⁻¹ (flexión de metilenos, R-CH₂-) no se descarta la presencia de ácidos grasos en la especie. La banda a 1610.83±5.99 cm⁻¹ corresponde a vibraciones de C-C de anillos fenólicos, por lo que esta banda junto con las bandas a 3286.89±52.59 se relaciona con flavonoides (1420 cm⁻¹ flexión simétrica R-CH₃, estiramiento COO-; 1058 cm⁻¹, estiramiento CC, =COC, flexión CO) y compuestos fenólicos. La banda a 1399 cm⁻¹ presente en *A. germinans* se asocia con vibraciones en tijera de R-CH₃ unidos a proteínas; sin embargo, no se identifican bandas a 1302 (estiramiento C-N), 1252 (flexión fuera de plano -N-H) y 1178 cm⁻¹ (estiramientos C-C, C-N y C-O) que confirmen su presencia [27]. En la región de 1400-1300 cm⁻¹ se relaciona con estiramiento C-O y C-C de amidas, fenilos; en la región de 1300-1100 cm⁻¹ se registran bandas correspondientes a estiramientos C-O de carbonilos y flexiones R-O-H. Finalmente, la banda entre 1100 y 1000 cm⁻¹ se relaciona con estiramientos C-O-C presente en carbohidratos [28].

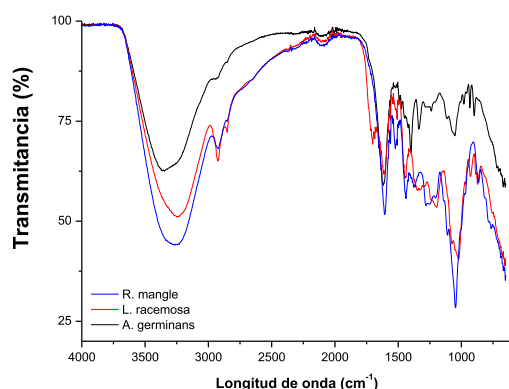


Figura 1. Espectro FTIR de los extractos metanólicos de las hojas de *R. mangle*, *L. racemosa* y *A. germinans* (masa sólida seca, KBr 5%).

La ponderación de la transmitancia y la determinación del área bajo la curva (ABC) permiten registrar cambios en las bandas del espectro FTIR registradas para los extractos de las especies en estudio (**Tabla 1**). En general, el extracto de *A. germinans* presenta las bandas con menor ABC, situación que podría estar asociada a la naturaleza foto- y/o termolábil de los metabolitos secundarios contenidos. Por otro lado, la banda entre 3680-2980 cm^{-1} de *R. mangle* es ± 40 y $\pm 10\%$ más grande que las de *A. germinans* y *L. racemosa*, respectivamente. Una mayor ABC se relaciona con la mayor presencia y/o diversidad de metabolitos secundarios con grupos R-OH (polifenoles, flavonoides, taninos entre otros con grupos hidroxilo) en los extractos metanólicos, sin embargo, en las bandas a ± 3500 y ± 1650 cm^{-1} se relacionan con la presencia de agua en los extractos [16], en este sentido, se requiere la evaluación de los extractos en condiciones anhidras.

Tabla 1. Variación del área bajo la curva (ABC) y proporción relativa de las bandas presentes en los extractos de las especies en estudio

Banda (cm^{-1})	<i>R. mangle</i>		<i>L. racemosa</i>		<i>A. germinans</i>	
	ABC	p.r.	ABC	p.r.	ABC	p.r.
3680-2980	11410.3	1.40	10334.9	1.27	8165.9	1
2965-2900	90.3	4.8	225.2	12.1	18.6	1
2865-2825	41.4	1.6	102.1	3.9	26.5	1
1800-1660	n.d	n.d	1603.0	1	n.d	n.d
1670-1550	1500.6	1.2	957.3	0.8	1270.2	1
1175-950	3651.8	3.1	2246.9	1.9	1192.2	1

Nota: p.r.: proporción relativa

En el extracto metanólico de *L. racemosa*, la banda en la región de 2965-2900 cm^{-1} (R-CH₃) es 12.1 y 2.5 veces más grande con respecto a la registrada en los extractos de *A. germinans* y *R. mangle*; de igual forma, se observa un incremento en la banda a 2865-2825 (R-CH₂-R) en *L. racemosa*, estas señales en su conjunto sugieren una mayor presencia de ácidos y ésteres de lípidos, así como aldehídos de cadena larga [27]. Finalmente, el ABC de la banda en 1175-950 cm^{-1} de *R. mangle* indica una mayor abundancia grupos éter (C-O-C) y presentes en carbohidratos, glucósidos, así como en saponinas.

En la **Tabla 2** se muestra que el contenido de compuestos fenólicos es mayor en el extracto metanólico de *R. mangle* > *L. racemosa* > *A. germinans*; patrón similar al registrado en el ABC en la banda de la región 3680-2980 cm^{-1} del espectro FTIR (**Tabla 1**); de hecho, el extracto metanólico de *R. mangle* presenta el mayor contenido de fenoles simples equivalentes a **1** y el mayor contenido de flavonoides equivalentes a **2** está en el extracto metanólico de hojas de *A. germinans*.

Tabla 2. Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante en el modelo del DPPH e inducida por los extractos metanólicos en estudio.

Especie	Fenoles eq. a 1 (mg/g)	Flavonoides eq. a 2 (mg/g)	Actividad Antioxidante (DPPH)	
			CE ₅₀ (mg/mL)	E _{max} (%)
<i>R. mangle</i>	0.8 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.02	165.4 $\pm$ 5.4	65.5 $\pm$ 4.8
<i>L. racemosa</i>	0.7 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03	59.2 $\pm$ 3.6	68.8 $\pm$ 1.6
<i>A. germinans</i>	0.5 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	141.2 $\pm$ 4.7	66.8 $\pm$ 5.2
<i>C. sinensis</i>	n.d	n.d	4.9 $\pm$ 0.7	93.4 $\pm$ 0.1
1	---	---	2.2 $\pm$ 0.8	91.4 $\pm$ 0.2

Nota: n.d.: no determinado

De manera adicional, la presencia de bandas a 866, 1026, 1237, 1451, 1542 y 1619 cm^{-1} para (**1**) 721.2, 784.6, 795.8, 820, 864.7, 941.2, 1013.8, 1092.1 y 1559.9 cm^{-1} para (**2**) y a 831, 1040, 1112, 1144, 1478, 1512 y 1611 cm^{-1} para Catequina (**3**) [15, 31], se identifican en el espectro FTIR de *R. mangle*; **3** y **1** en *L. racemosa* y en *A. germinans* se identifican señales únicamente para **1**. Bandas entre 725-717 y 756-768 cm^{-1} se han empleado en la estimación de **2** y **1**, respectivamente [20]; en este sentido, se estima una abundancia 0.33 y 0.73% de **1** en *R. mangle* y *A. germinans*, respectivamente.

La evaluación en el modelo del DPPH indican que los extractos metanólicos de las especies ejercen un efecto antioxidante dependiente de la concentración (**Tabla 2** y **Figura 2**). El extracto de *L. racemosa* describe una Curva Concentración-Respuesta (CCR) desplazada a la izquierda con respecto a *R. mangle* y *A. germinans*, por lo que ejerce la mayor potencia (CE₅₀), así como la mejor eficacia (E_{max}) antioxidante, sin embargo, el efecto es menor al de *C. sinensis* y **1**, controles positivos empleados ($p < 0.05$).

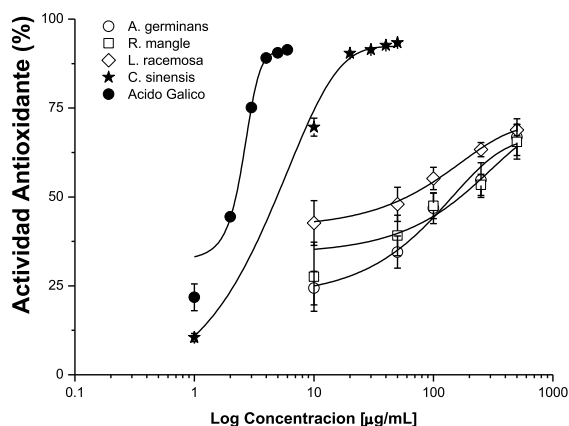


Figura 2. Actividad antioxidante inducida por los extractos metanólicos de hojas de *L. racemosa*, *R. mangle*, *A. germinans* en el modelo DPPH. Los resultados son expresados como el promedio $\pm$ DS de tres experimentos con tres replicas cada uno. (* $p < 0.05$ vs. *C. sinensis*).

La CCR de **1** en la extrema izquierda indica su participación en los efectos ejercidos por los extractos, sin embargo, la actividad antioxidante de *L. racemosa* no se relaciona con la abundancia de compuestos fenólicos y flavonoides, la actividad antioxidante se relaciona con la diversidad y la sinergia entre los metabolitos secundarios de naturaleza polifenólica y no polifenólica, los cuales, en su conjunto, juegan un rol importante en la actividad antioxidante ante situaciones de estrés fisiológico.

Se han identificado ± 27 metabolitos secundarios en extractos polares de ramas y corteza de *L. racemosa* [29], en hojas se reportan triterpenos, fenoles, taninos, saponinas [30], iones, proteínas, carbohidratos, vitaminas y polifenoles [31].

A partir de hojas de *L. racemosa*, se han reportado la presencia y/o el aislamiento de metabolitos secundarios como la apigenina (**4**), kaempferol (**5**), **2**, isorahamnetina (**6**), miricetina (**7**), quercetina-3-O-rhamnosido (**8**), isoquercitrina (**9**), dihidrocrisina (**10**), naringenina (**11**), dihidrokaempferol (**12**), dihidromiricetina (**13**), (epi)-afzelequina (**14**), (epi)-catequina (**15**), (epi)-galocatequina (**16**), quercetina-3-O-arabinosido (**17**), castalagina (**18**), corilagina (**19**), ácido chebulágico (**20**), ácido chebulínico (**21**), ácido neochebulínico (**22**), 2,3-di-O-galoil-D-glucopiranosas (**23**), 1,2,3,6-tetra-O-galoil-D-glucopiranosas (**24**), 2,3,4,6-O-galoil-D-glucopiranosas (**25**), 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glucopiranosas (**26**), 2,3-(S)-HHDP-D-glucosa (**27**), punicalagina (**28**), metil eter- (**29**), dimetil eter- (**30**), trimetil eter- (**31**), pirogaloil eter del ácido elágico (**32**), ácido elágico (**33**), dilactona del ácido valonólico (**34**), **1**, metil galato (**35**), etil galato (**36**), galoil galato (**37**), galoil hexóxido (**38**), digaloil hexóxido (**39**), trigaloil hexosido (**40**), pentagaloil hexóxido (**41**), dimero de (epi)-catequina (**42**), dimero de (epi)-galocatequina (**43**), dimero de (epi)-galocatequina galato (**44**), ácido vanillico (**45**), ácido protocatecuico (**46**), ácido jasmónico (**47**), 5'-(hidroxisulfonilo) del ácido jasmónico (**48**), catecol (**49**), pirogalol (**50**),

casuarinina (**51**), digaloil-hexahidroxidifenol glucosa (**52**); los hidrocarburos (C_{27} (**53**) y C_{29} (**54**) son los más abundantes de una serie conformada por $C_{23} \rightarrow C_{34}$ (**55-64**), escualeno (**65**), α -tocopherol (**66**), lupeol (**67**), D-friedoolean-14-en-3-ona (**68**), taraxerol (**69**), α -amirina (**70**), germanicol (**71**), β -amirina (**72**), C-friedoolean-8-en-3-ona (**73**), taraxasterol (**74**), β -sitosterol (**75**), betulinol (**76**), friedelina (**77**), ergosta-7,22-dien-3 β -ol (**78**), 2-metil-1,3-dihidroxi-5-tridecilbenceno (**79**), 1,3-dihidroxi-5-undecilbenceno (**80**), emodina (**81**) [30, 32-38].

Se ha descrito que la actividad antioxidante inducida por los compuestos fenólicos se correlaciona con el número de grupos hidroxilo unidos a los anillos aromáticos [39], sin embargo, es importante destacar que los protones de ácidos fenólicos favorecen ambientes oxidantes, generación de radicales libres, reacciones radicalarias y formación de quinonas, semiquinonas [40] entre otros artefactos que, en su conjunto, afectan la actividad antioxidante mediada por polifenoles.

4. Conclusiones

Se requiere continuar el estudio fitoquímico y farmacológico de los extractos metanólicos de las hojas de *R. mangle*, *L. racemosa* y *A. germinans* desarrolladas en la RBLP. El extracto metanólico de las hojas de *L. racemosa* ejerce un efecto antioxidante dependiente de la concentración y registrar la mayor potencia antioxidante en el modelo del DPPH. La actividad está relacionada con la presencia de metabolitos secundarios fenólicos y no fenólicos, sin embargo, es necesario la documentación de su diversidad y abundancia, el tipo y la magnitud de interacciones químicas, así como las sinergias entre los metabolitos secundarios con respecto a la actividad antioxidante ejercida.

5. Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas y a la Universidad Autónoma de Campeche (FCQB-UACAM) por las facilidades para el desarrollo de esta investigación; de igual forma, agradecemos el apoyo técnico a la QFB Iliana Osorio Horta (FCQB-UACAM).

6. Referencias:

- Kathiresan, K.; Bingham, B.L. **2001**, Adv. Mar. Biol. 40, 81-251.
- Oliva, M., Montiel, S., García, A., & Vidal, L. **2014**. Trop. Conserv. Sci., 7(4), 781-795.
- Pat-Fernández, L.A., Anguebes-Franceschi, F., Pat-Fernández, J.M., Hernández-Bahena, P., Ramos-Reyes, R. **2018**. Estudios de cultura maya, 52, 227-254.
- Nabeelah Bibi, S., Fawzi, M.M., Gokhan, Z., Rajesh, J., Nadeem, N., Kannan, R.R.R., Albuquerque, R.D.D.G., Pandian, S.K. **2019**. Marine drugs, 17(4), 231.
- Zamora-Crescencio, P., Mas, J-F., Rico-Gray, V., Domínguez-Carrasco, M.R., Villegas, P., Gutiérrez-Báez, C., Barrientos-Medina, R.C. **2015**. Polibotánica, 39, 1-19.

6. Acosta-Lugo, E., Alonzo-Parra, D., Andrade-Hernández, M., Castillo-Tzab, D., Chablé-Santos, J., Durán, R., ... & Tun-Dzul, F. 2010. Pronatura. Mérida, Yucatán. p. 184.
7. Agraz-Hernandez C.M. Estudio de caso: usos y beneficios ecológicos, económicos y sociales que proporcionan los ecosistemas de manglar en el estado de Campeche. CONABIO, Gobierno del Estado de Campeche, Universidad Autónoma de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur. 2010; pp 470-475.
8. Benítez, J.A., Samarrón, D., Ben-Arie, J., Carrillo-Medina, M.Y. Valoración económica de los servicios ambientales de Campeche. CONABIO, Gobierno del Estado de Campeche, Universidad Autónoma de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur. 2010; pp 442-457.
9. Revathi, P.; Senthinath, T.J.; Thirumalaikolundusubramanian, P.; Prabhu, N. 2014. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 6, 1-5.
10. Kandil, F.; Grace, M.; Seigler, D.; Cheeseman, J. 2004. Trees, 18, 518-528.
11. Nyananyo, B. I., Briyai, F. O., & Kiesekime, S. G. G. 2009. J. Appl. Sci. Environ. Manage, 13(2), 47-49.
12. Aragoa-Mendes, R.J., Pereira-Filho, A.A., Lustosa-Nogueira, A.J., Freitas-Araújo, K.R., Costa-França, C.R., Borba de Carvalho, I., Lindoso da Silva, N.m., Santana-Azevedo, A., Garros-Rosa, I. 2018. Rev Inst Med Trop São Paulo, 60:e7, 1-9.
13. Thatoi, H.; Samantaray, D.; Das, S.K. 2016. Life Sci. 9, 267-291.
14. Sánchez, J.C., García, R.F., Cors, M.T.M. Pharmacog. Res. 2010, 2, 279.
15. Zhang, L.L.; Lin, Y.M.; Zhou, H.C.; Wei, S.D.; Chen, J.H. 2010. Molecules, 15, 420-431.
16. Rajeshwari, E.; Gajendiran; Elamathy, S. 2013. Int. J. 1, 952-954.
17. Secretaría de Salud. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Mexico, 2001, pp 19-31.
18. Robles-García, M.A., Aguilar, A.J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J.A., Guerrero-Medina, P.J., Madrigal-Pulido, J.A., Del-Toro-Sánchez, C.L. 2016. Sid. Biotechnia, 18(3), 3-8.
19. Jain, P. K., Soni, A., Jain, P., & Bhawsar, 2016. J Chem Pharm Res, 8(2), 1-6.
20. Aguirre-Crespo, F.J., Cerino-Pérez, E., Valdovinos-Estrella, J.D.V., Maldonado-Velázquez, M.G., Ortega-Morales, B. O., Zamora-Crecencio, P., Hernandez-Núñez, E., Estrada-Soto, S.E. 2021. Phcog Mag, 17(73), 23.
21. Hansman, E. Pigment analysis. Cambridge University Press. London, 1973, pp 359-368.
22. Hager, A., Meyer-Bertenrath, T. 1966. Planta, 69, 198-217.
23. Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. 2006. J Agric food Chem, 54(3), 607-616.
24. Valenzuela, G. M., Cravzov, A. L., Soro, A. S., Tauguinas, A. L., Gimenez, M. C., & Gruszycki, M. R. 2014. Dominguezia, 30(1), 19-24.
25. Girón, J.M., Martínez, J.A., Hurtado, L.G., Cuaran, J.D., Ocampo, Y.A. 2016. Inventum, 11(21), 51-62.
26. Solarte, M. E., Moreno, L., Melgarejo, L.M. (2010). VI. Fotosíntesis y pigmentos vegetales. Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2010. pp. 107-122.
27. Domínguez-Pérez, L.A., Lagunes-Gálvez, L.M., Barajas-Fernández, J., Olán-Acosta, M.D.L. García-Alamilla, R., García-Alamilla, P. 2019. Acta universitaria, 29. 1-17.
28. Mondragon-Cortez, P. Espectroscopia de Infrarrojo Para Todos; Centro de Investigacion y Asistencia en Tecnologia y Diseno del Estado de Jalisco: Jalisco, Mexico, 2015; pp 27-33.
29. Shi, C., Xu, M., J., Bayer, M., Deng, Z.W., Kubbutat, M.H., Waejen, W., Proksch, P., Lin, W. H. 2010. Phytochemistry, 71(4), 435-442.
30. Raffi, Z.A., Dodd, R.S., Fromard, F. 1996.. Biochem Sys Eco, 24(4), 341-345.
31. do Nascimento Santos, D. K., de Melo, C. M. L., da Silva, E. M., de Almeida, V. S., da Cruz Filho, I. J., de Souza Lima, G. M., ... & Vieira, J. R. C. 2021. The Natural Products Journal, 11(2), 231-243.
32. Neves-Costa, F., Jerz, G., Hewitson, P., Souza-Figueiredo, F., Ignatova, S. 2021. Molecules, 26(8), 2284.
33. Glasenapp, Y., Lucas, C., Wöltje, T., Fohrer, J., Papenbrock, J. 2019. Chem Biodiversity, 16(5), e1800632. Pp: 1-13.
34. Koch, B.P., Harder, J., Lara, R.J., Kattner, G. 2005. Org Geochem, 36(2), 273-285.
35. Koch, B.P., Rullkötter, J., Lara, R.J. 2003. Wetlands Ecology and management, 11(4), 257-263.
36. He, D., Ladd, S.N., Sachs, J.P., Jaffé, R. 2017. Org Geochem, 110, 1-12.
37. Wu, J., Xiao, Q., Xu, J., Li, M. Y., Pan, J. Y., & Yang, M. H. 2008. Natural Product Reports, 25(5), 955-981.
38. Bittencourt-Rodrigues, C.F., Hessel-Gaeta, H., Novo-Belchor, G., Pena-Ferreira M.J., Terashima-Pinho, M. V., de Oliveira-Toyama, D., Hikari-Toyama, M. 2015. Marine drugs, 13(7), 4505-4519.
39. Sroka, Z., & Cisowski, W. 2003. F Chem Tox, 41(6), 753-758.
40. Eslami, A. C., Pasanphan, W., Wagner, B. A., & Buettner, G. R. 2010. Chem CJ, 4(1), 1-4.