

# CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PICRAMNIA SP. EN LA AMAZONÍA ECUATORIANA

## PHYTOCHEMICAL SCREENING AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF SECONDARY METABOLITES FROM PICRAMNIA SP. IN THE ECUADORIAN AMAZON

Stalin Bermúdez-Puga<sup>1</sup>, Génesis Romero-Zambrano<sup>1</sup>,  
María Peñuela-Mora<sup>1</sup>, Amanda Cevallos-Vallejo<sup>2</sup>,  
Juan Romero-Benavides<sup>3</sup>, Luis Guamán O.<sup>3</sup> & Pablo Cisneros-Pérez<sup>1\*</sup>

Recibido: 16 de enero 2020 / Aceptado: 18 de mayo 2020

Publicado en línea: 2 de junio 2020

DOI: 10.26807/ia.v8i2.129

**Palabras claves:** Antioxidantes, antimicrobianos, antraquinonas,  
Napo, *Picramnia*.

**Keywords:** Antioxidants, antimicrobial, anthraquinones,  
Napo, *Picramnia*.

---

1 Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Napo, Ecuador (stalin.bermudez@est.ikiam.edu.ec; genesis.romero@est.ikiam.edu.ec; mariacristina.penuela@ikiam.edu.ec; \*correspondencia: pablo.cisneros@ikiam.edu.ec).

2 Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas, Quito, Ecuador (ascevallosv@puce.edu.ec)

3 Universidad Técnica Particular de Loja, Sección Departamental Química Básica y Aplicada, Departamento de Química y Ciencias Exactas, Loja, Ecuador (jcromerob@utpl.edu.ec, limguaman@utpl.edu.ec).

## RESUMEN

Las especies del género *Picramnia* se encuentran a lo largo de América tropical, evidenciando una amplia distribución. Además, se han descrito los metabolitos secundarios que presentan algunas de ellas. En la provincia de Napo, ubicada en la Amazonía ecuatoriana, se encuentra una de las especies de este género, cuyos metabolitos aún no han sido elucidados. En el presente trabajo se estableció como objetivo extraer y aislar metabolitos secundarios de esta planta, así como caracterizarlos mediante técnicas espectroscópicas. Se recolectaron las partes aéreas de la planta *Picramnia* sp. en la Reserva Biológica Jatun Sacha. Las hojas secas y molidas fueron maceradas consecutivamente en diferentes solventes, y algunos de los extractos obtenidos fueron particionados y/o purificados por cromatografía en columna flash. Tanto a las hojas secas como a los extractos obtenidos se les realizó pruebas cualitativas para determinar la presencia de los metabolitos de interés. Se comprobó la presencia de antraquinonas, taninos, terpenoides, fenoles y flavonoides. Finalmente, se identificaron  $\beta$ -sitosterol y crisofanol en fracciones purificadas, las cuales fueron elucidadas usando una combinación de espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas. Se conoce que ambas moléculas cuentan con diversas actividades farmacológicas, dentro de las cuales destaca su actividad antimicrobiana.

## ABSTRACT

The species of the genus *Picramnia* are found throughout tropical America, evidencing a wide distribution. In addition, secondary metabolites that some of them exhibit have been described. In the province of Napo, located in the Ecuadorian Amazon, one of the species of this genus is found, whose metabolites have not yet been elucidated. In the present work, the objective was to extract and isolate secondary metabolites from this plant, as well as to characterize them using spectroscopic techniques. For this, the aerial parts of the *Picramnia* sp. were collected in the Jatun Sacha Biological Reserve. The dried and ground leaves were then macerated consecutively in different solvents, and some of the obtained extracts were partitioned and / or purified by Flash Column Chro-

matography. Both the dried leaves and the obtained extracts were subjected to qualitative tests to determine the presence of the metabolites of interest. The presence of anthraquinones, tannins, terpenoids, phenols and flavonoids was verified. Finally,  $\beta$ -sitosterol and chrysophanol were identified in purified fractions, which were elucidated using a combination of  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and mass spectrometry. It is known that both molecules have various pharmacological activities, among which their antimicrobial activity stands out.

## INTRODUCCIÓN

El género *Picramnia*, perteneciente a la familia *Picramniaceae*, contiene 39 especies distribuidas lo largo de América tropical (Jacobs, 2003). Este género se caracteriza fitoquímicamente por la presencia de antraquinonas y derivados antracénicos (Alves et al., 2014), aunque también se han descrito ácidos grasos y terpenoides (Jacobs, 2003). En algunas especies tales como *Picramnia sellowii* (Aponte et al., 2008; Balderrama et al., 2001), *Picramnia latifolia* en Perú (Díaz et al., 2004) y *Picramnia hirsuta* en México (Hernández-Medel, López-Marquez, Santillán, & Trigos, 1996) se han caracterizado metabolitos como nataloemodina, crisofaneína y mayosida, que presentan actividad anticancerígena. *Picramnia magnifolia*, por su parte, a pesar de

no haber sido caracterizada fitoquímicamente, ha evidenciado actividad antimicrobiana en los extractos etanólicos y acuosos de las hojas al inhibir bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. (Andoque et al., 2009). Adicionalmente, los autores mencionan que las hojas de esta planta han sido usadas tradicionalmente para el tratamiento de afecciones cutáneas (Andoque et al., 2009).

Desde mediados del siglo XX se ha originado una variedad enorme de antibióticos, los cuales han permitido combatir efectivamente infecciones bacterianas por décadas. Sin embargo, el mal uso de los mismos ha conducido a la resistencia bacteriana, complicando así el tratamiento

de ciertas enfermedades incluso aquellas que anteriormente podían tratarse con facilidad. Se estima que en Europa mueren 25 000 personas al año por la resistencia bacteriana a los medicamentos (Zaman et al., 2017). Este alarmante aumento de resistencia antibiótica en la que el repertorio de tratamientos es limitado resalta la importancia de la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana.

Con el objetivo de conocer los metabolitos secundarios de especies de este género en Ecuador, se realizó un estudio a una especie del género *Picramnia* colectada en la provincia de Napo.

Los metabolitos de interés incluyen fenoles, flavonoides y taninos, a los cuales se les ha atribuido propiedades curativas previamente (Cabrera-Carrión et al., 2017). Además, se ha evidenciado actividad antioxidante, antimutagénica, antimicrobiana y antiinflamatoria asociada a este tipo de moléculas (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006; Luengo, 2002). Por su parte, los terpenoides y las antraquinonas, además de ser característicos del género en estudio, se sabe que han sido usados ampliamente en la industria farmacéutica por sus propiedades medicinales (Jiang, Kempinski, & Chappell, 2016; Locatelli, 2011).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Recolección y tratamiento de muestras**

Se recolectaron las partes aéreas de la planta *Picramnia* sp. ubicada en las coordenadas 18M 0208827, en la Reserva Biológica Jatun Sacha, Napo, Ecuador. Los raquis se separaron de las hojas y se descartaron. Las hojas se cortaron en cuadros 1 x 1 cm y se secaron en fundas de papel a 40 °C

hasta peso constante. El material seco fue molido en un molino de café Oster® BVSTBMH23, en el modo de molienda fina.

### **Reactivos químicos**

Los reactivos químicos utilizados fueron éter etílico (Merck, Alemania), diclorometano (Merck, Alemania), metanol (Sigma-Aldrich, USA), éter de

petróleo (Sigma-Aldrich, USA) y acetato de etilo (Sigma-Aldrich, USA), todos de grado analítico. Gel de Sílice grado técnico (tamaño de poro 60 Å, malla de 230-400) (Supelco). Placas de TLC con matriz de gel de Sílice (tamaño de poro de 60 Å) con indicador fluorescente (Sigma-Aldrich).

### **Extracción y purificación de metabolitos secundarios**

Se utilizaron dos muestras de hojas secas y molidas de 70 g cada una para la obtención de los extractos A, B, C, D, D1, D2, D3, E, F, F1, F2 y F3. El proceso de obtención de los mismos se detalla en la Figura 1. Los extractos fueron comparados a través de perfiles cromatográficos en TLC, utilizando como fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo 60:40 y revelados bajo luz UV de 365 nm. El extracto D1, por haber sido el que presentó menos manchas en el perfil cromatográfico, fue purificado mediante cromatografía en columna flash. Para esto se usó una fase estacionaria de gel de sílice y como eluyente la mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo en relación creciente del segundo disolvente hasta alcan-

zar una relación 75:25. Se recolectó 12 fracciones, las cuales fueron nombradas desde D1.1 hasta D1.12.

### **Análisis cualitativo**

Para todos los tests incluidos, se siguió la metodología propuesta por Harborne (1984) para el análisis cualitativo de extractos y hojas.

#### ***Tests para extractos***

Flavonoides y compuestos fenólicos

A 5 mg de cada extracto disuelto en 2 mL de agua, se le agregó 3 gotas de  $\text{FeCl}_3$  al 4 %.

Si la disolución desarrolla una coloración negro-azulada indica la presencia de fenoles y si desarrolla una coloración verde indica la presencia de flavonoides. Este test se aplicó en los extractos A, B, C, D1, D2, D3, E, F1, F2 y F3.

Flavonoides

A 5 mg de cada extracto disuelto en 2 mL de agua, se le agregó 3 gotas de NaOH al 2 %.

Si la disolución desarrolla una coloración amarilla intensa que desapa-

rece al añadir HCl diluido, revela la presencia de flavonoides. Este test se

aplicó en los extractos A, B, C, D1, D2, D3, E, F1, F2 y F3.

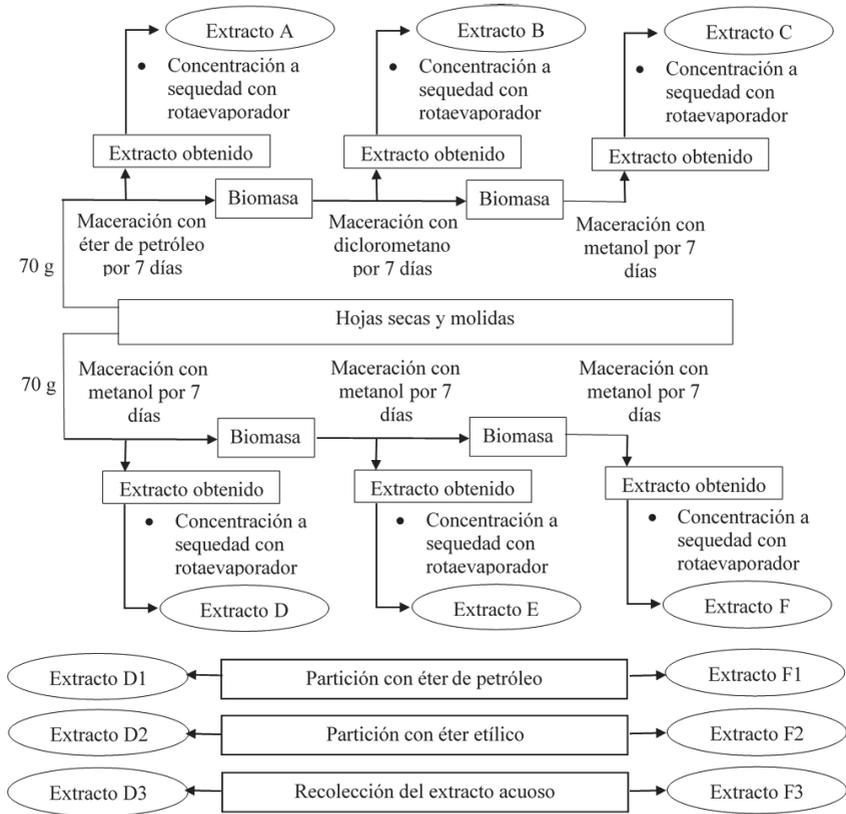


Figura 1. Proceso de extracción a partir de hojas secas y molidas de *Picramnia sp.* en la provincia de Napo, Ecuador

Terpenoides

A 2 mg de cada extracto disuelto en  $\text{CHCl}_3$ , se le adicionó 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La for-

mación de un anillo rojo en la interfase muestra terpenoides. Este test se aplicó en los extractos A, B, C, D1, D2, D3, E, F1, F2 y F3.

### **Tests para hojas**

#### **Taninos**

La mezcla de 500 mg de hojas secas y 20 mL de agua fue calentada hasta ebullición y filtrada. Se adicionó 5 gotas de  $\text{FeCl}_3$  0,1 %. La coloración de café verdoso a negro azulado, muestra la presencia de taninos.

#### **Antraquinonas**

Se agitó 6 g de hojas molidas en 10 mL de tolueno durante 10 minutos. La mezcla se filtró y se adicionó 10 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 10 %. La coloración rosa muestra la presencia de antraquinonas.

### **Identificación de metabolitos**

De las fracciones obtenidas a partir

de la purificación del extracto D1, se analizaron las más puras por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  fueron obtenidos a 400 MHz en un espectrómetro Varian NMR System y fueron referenciados al pico del disolvente residual en 7,26 ppm ( $\text{CDCl}_3$ ). Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos a 100 MHz en un espectrómetro Varian NMR System y fueron referenciados respecto al pico del disolvente residual en 77 ppm ( $\text{CDCl}_3$ ). Los espectros de masas fueron registrados por un cromatógrafo de gases Agilent 7890 acoplado a un espectrómetro de masas y un detector de ionización de llama. Las masas obtenidas se compararon con la biblioteca del equipo.

## **RESULTADOS**

En la Tabla 1, se describe los extractos obtenidos a partir de las hojas con su respectivo porcentaje de acuerdo a la biomasa inicial utilizada. La maceración con tres porciones de metanol, generó una mayor cantidad de extracto en comparación con la realizada con los tres disolventes. Otra diferencia, es que la cantidad de ex

tracto se redujo de maceración a maceración cuando solo se utilizó metanol.

Los perfiles cromatográficos, en TLC de gel de Sílice para los tres primeros extractos mostraron semejanzas entre los extractos A y B, y se caracterizaron por presentar compuestos de alta

polaridad (eluyen en mezclas éter de petróleo:acetato de etilo relación 60:40). Sin embargo, estos extractos a diferencia del extracto de metanol C también presentaron compuestos de baja polaridad. El extracto de metanol C, presentó manchas con Rf similares a los extractos A y B correspondientes a compuestos de alta polaridad, pero con mayor intensidad. Los perfiles cromatográficos para los extractos D, E y F presentaron un número de manchas y Rf similares. Además, se observó mayor intensidad en las manchas del ex-

tracto F. Los extractos D y F fueron sometidos a partición con Éter de Petróleo (D1 y F1) y Éter Etlíco (D2 y F2). El extracto E fue conservado como control.

El análisis fitoquímico realizado directamente sobre las hojas secas mostró la presencia de antraquinonas y taninos. Por otro lado, las pruebas realizadas a los diferentes extractos demostraron la existencia de fenoles en los extractos D2, D3, F2 y F3; flavonoides en el extracto A y terpenoides en los extractos C y D1.

**Tabla 1. Resumen de cada uno de los extractos obtenidos de hojas de *Pricamnia* sp en la provincia de Napo, Ecuador**

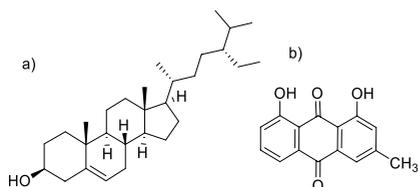
Código de extracto	Descripción extracto	% (m/m)
A	Maceración con Eter de petróleo <sup>a</sup>	1
B	Maceración con Diclorometano <sup>a</sup>	2,01
C	Maceración con MeOH <sup>a</sup>	7
D	Maceración con Metanol-1 <sup>b</sup>	5,50
D1	Partición EP del macerado MeOH-1 <sup>b</sup>	0,59
D1.1	Fracción 1 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,03
D1.2	Fracción 2 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,02
D1.3	Fracción 3 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,08
D1.4	Fracción 4 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,05
D1.5	Fracción 5 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,01
D1.6	Fracción 6 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,01
D1.7	Fracción 7 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,02
D1.8	Fracción 8 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,02
D1.9	Fracción 9 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,01

<b>D1.10</b>	Fracción 10 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,01
<b>D1.11</b>	Fracción 11 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,01
<b>D1.12</b>	Fracción 12 de la columna del extracto EP de MeOH-1 <sup>b</sup>	0,01
<b>D2</b>	Partición EE del macerado MeOH-1 <sup>b</sup>	0,53
<b>D3</b>	Residuo Acuoso Partición MeOH-1 <sup>b</sup>	3,74
<b>E</b>	Maceración con MeOH-2 <sup>b</sup>	5,13
<b>F</b>	Maceración con MeOH-3 <sup>b</sup>	4,11
<b>F1</b>	Partición EP del macerado MeOH-3 <sup>b</sup>	0,40
<b>F2</b>	Partición EE del macerado MeOH-3 <sup>b</sup>	0,23
<b>F3</b>	Residuo Acuoso Partición MeOH-3 <sup>b</sup>	2,85

<sup>a</sup> Maceración consecutiva muestra 1. <sup>b</sup> Maceración consecutiva muestra 2.

EE: Éter etílico EP: Éter de petróleo

A partir de la columna cromatográfica del extracto D1 se aislaron; de la fracción D1.2 crisofanol, y de la fracción D1.5  $\beta$ -sitosterol (Figura 2)



**Figura 2. a)  $\beta$ -sitosterol y b) crisofanol, metabolitos secundarios aislados de *Picramnia* sp.**

**Crisofanol:** 15mg fracción **D1.2** (22-33) de la partición del éter de petróleo del extracto metanólico 1.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 12,12 (1H, s, -OH), 12,02 (1H, s, -OH), 7,80 (1H, d  $J_1 = 8,00$  Hz), 7,72–7,69 (1H, dd,  $J_1 = 6,0$  Hz;  $J_2=3,6$ ), 7,54–

7,52 (1H, dd,  $J_1 = 6,0$  Hz;  $J_2=3,6$ ), 7,30 (1H, d,  $J_1 = 8,0$  Hz), 7,10 (1H, s), 2,47 (3H, s); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 192,7, 182,2, 162,9, 162,6, 149,5, 137,1, 133,6, 132,6, 124,7, 123,5, 121,5, 120,0, 116,0, 113,9, 23,1. IE-EM m/z: 254 [M]<sup>+</sup>. Estos datos son similares a los reportados en la literatura para la molécula Crisofanol (Khan & Armes, 1999) (Guo et al., 2011).

**$\beta$ -sitosterol:** 10 mg fracción **D1.5** (55) de la partición del éter de petróleo del extracto metanólico 1.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5,35 (1H, bd,  $J_1= 5,1,$ ); 3,41–3,59 (1H, m); 0,59–2,34 (48H, m); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 140,8, 121,7, 71,8, 56,8, 56,1, 50,1, 45,8, 42,3, 42,2, 39,8, 37,3, 36,5, 36,1, 34,0, 31,9,

31,7, 29,2, 28,3, 26,1, 24,1, 23,3, 21,1, 19,8, 19,4, 19,0, 18,8, 12,2, 12,0. Estos datos son similares en-

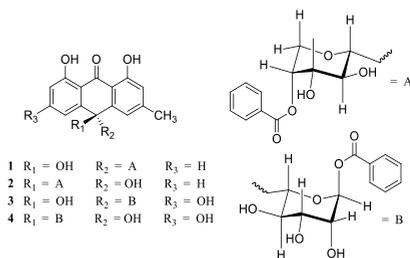
contrados en la literatura para la molécula  $\beta$ -sitosterol (McCarthy et al., 2005).

## DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios con estructuras novedosas como son las oxantronas C-glicosiladas (Figura 3) han sido aislados de los extractos metanólicos de las especies *P. hirsuta* (Hernandez-Medel et al., 1996), *P. antidesma* (Hernandez-Medel et al., 1999) y *P. latifolia* (Diaz et al., 2004). Considerando que estas oxantronas C-glicosiladas son inherentemente polares, la principal ventaja del primer método de maceración es que se obtiene un extracto metanólico, con menor número de productos apolares, lo que permitiría una purificación más fácil de este tipo de moléculas.

La mayor intensidad en las manchas del extracto F podría ser indicativo de una mayor concentración de metabolitos. Esto también muestra que el extracto de la tercera maceración en metanol está enriquecido en productos que absorben luz UV, como las antraquinonas y compuestos fenóli-

cos y las mismas oxantronas C-glicosiladas. Por otro lado, los extractos D y E podrían estar enriquecidos en compuestos que no absorben luz UV como los terpenos y alcoholes.



**Figura 3. Oxantronas C-glicosiladas**

Al comparar los perfiles cromatográficos de los cuatro extractos de partición (D1, D2, F1 y F2), se observó que D1 tenía menos manchas, lo que se interpretó como el extracto de menor dificultad de purificación por cromatografía en columna flash.

La identificación del crisofanol, una antraquinona muy común en esta familia de plantas (Balderrama et al.,

2001; Diaz et al., 2004; Hernandez-Medel et al., 1999) confirma el análisis cualitativo de las hojas secas que dio positivo para antraquinonas. Se ha reportado que esta molécula presenta efectos neuroprotectores (dos Santos, Silva & de Freitas, 2011). Además, ha evidenciado actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Coopoosamy & Magwa, 2006), e incluso contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (Hatano et al., 1999).

De la misma manera, la molécula  $\beta$ -sitosterol ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista farmacológico debido a sus actividades anti-inflamatorias, inductoras de apoptosis en células cancerígenas, analgésicas, antimutagénicas, antioxidantes, neuroprotectoras e inmunomoduladoras (Saeidnia, Manayi, Gohari & Abdollahi, 2014). Adicionalmente, este compuesto cuenta con una actividad antimicrobiana comparable al antibiótico Gentamicina (Sen, Dhavan, Shukla, Singh, & Tejovathi, 2012).

## CONCLUSIÓN

En la especie *Picramnia* sp. se encontraron dos metabolitos secundarios presentes en otras especies de plantas de la familia Picramniaceae, los cuales cuentan con múltiples propiedades medicinales reportadas. En futuras investigaciones se espera analizar la actividad biológica de los extractos para aislar y caracterizar metabolitos secundarios de una forma bioguiada.

En el lugar de colecta se encuentran *P. magnifolia*, *P. hirsuta* y *P. sellowii*. Mediante claves botánicas y la comparación con muestras de herbarios, se descartó que *P. sellowii* correspondiera a la especie de estudio en este trabajo, por lo que es posible realizar estudios comparativos entre las dos especies restantes.

## AGRADECIMIENTOS

A la Ing. Roxana Llive por su colaboración en la ejecución de experimentos en la Universidad Regional Amazónica Ikiam. A la Srta. Linda Jácome por su aporte en el trabajo de

campo, y al Ministerio del Ambiente del Ecuador por extender el permiso de investigación para este proyecto bajo el Contrato Marco MAE-DNB-CM-2017-0062-IKIAM.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Alves, I. A., Miranda, H. M., Soares, L. A., & Randau, K. P. (2014). Simaroubaceae family: botany, chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(4), 481-501. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.021>
- Andoque, H., Andoque, D., Andoque, M., & Andoque, H. (2009). *Plantas medicinales de la Gente de Hacha*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Amazonia.
- Aponte, J. C., Vaisberg, A. J., Rojas, R., Caviedes, L., Lewis, W. H., Lamas, G., Hammond, G. B. (2008). Isolation of Cytotoxic Metabolites from Targeted Peruvian Amazonian Medicinal Plants. *Journal of Natural Products*, 71(1), 102–105. <https://doi.org/10.1021/np070560c>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Balderrama, L., Braca, A., Garcia, E., Melgarejo, M., Pizza, C., & De Tommasi, N. (2001). Triterpenes and anthraquinones from *Picramnia sellowii* Planchon in Hook (Simaroubaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(3), 331-333.

- Cabrera-Carrión, J. L., Jaramillo-Jaramillo, C., Dután-Torres, F., Cun-Carrión, J., García, P. A., & Rojas De Astudillo, L. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleífera* Lam en función de su edad y altura. *Bioagro*, 29(1), 53–60.
- Cooposamy, R. M., & Magwa, M. L. (2006). Antibacterial activity of chrysophanol isolated from *Aloe excelsa* (Berger). *African Journal of Biotechnology*, 5(16), 1508–1510. <https://doi.org/10.4314/ajb.v5i16.43147>
- Diaz, F., Chai, H. B., Mi, Q., Su, B. N., Vigo, J. S., Graham, J. G., ... Kinghorn, A. D. (2004). Anthrone and Oxanthrone C-Glycosides from *Picramnia latifolia* Collected in Peru. *Journal of Natural Products*, 67(3), 352–356. <https://doi.org/10.1021/np030479j>
- Guo, S., Feng, B., Zhu, R., Ma, J., & Wang, W. (2011). Preparative isolation of three anthraquinones from *Rumex japonicus* by high-speed counter-current chromatography. *Molecules*, 16(2), 1201–1210. <https://doi.org/10.3390/molecules16021201>
- Harborne, J. B. (1984). *Phytochemical Methods* (Second).
- Hatano, T., Uebayashi, H., Ito, H., Shiota, S., Tsuchiya, T., & Yoshida, T. (1999). Phenolic constituents of cassia seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. <https://doi.org/10.1248/cpb.47.1121>
- Hernandez-Medel, M. D. R., Ramirez-Corzas, C. O., Rivera-Dominguez, M. N., Ramirez-Mendez, J., Santillan, R., & Rojas-Lima, S. (1999). Diastereomeric C-glycosyloxanthrones from *Picramnia antidesma*. *Phytochemistry*, 50(8), 1379-1383. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(98\)00354-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(98)00354-9)
- Hernandez-Medel, M., Lopez-Marquez, O., Santillan, R., & Trigos, A. (1996). Mayoside, an oxanthrone from *Picramnia hirsuta*. *Phytochemistry*, 43(1), 279–282. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00160-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00160-4)
- Jacobs, H. (2003). Comparative phytochemistry of *Picramnia* and *Alvaradoa*, genera of the newly established family Picramniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(1), 773–783. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00268-5)

- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(2), 345-358. <https://doi.org/10.1002/cppb.20024>
- Khan, M. a, & Armes, S. P. (1999). Synthesis and characterization of micrometer-sized poly(3,4 ethylenedioxythiophene)-coated polystyrene latexes. *Langmuir*, 15(16), 3469–3475.
- Locatelli, M. (2011). Anthraquinones: analytical techniques as a novel tool to investigate on the triggering of biological targets. *Current Drug Targets*, 12(3), 366-380. <http://dx.doi.org/10.2174/138945011794815338>
- Luengo, M. T. L. (2002). Flavonoides. *Offarm: farmacia y sociedad*, 21(4), 108-113.
- McCarthy, F. O., Chopra, J., Ford, A., Hogan, S. A., Kerry, J. P., O'Brien, N. M., Maguire, A. R. (2005). Synthesis, isolation and characterisation of  $\alpha$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol oxide derivatives. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(16), 3059–3065. <https://doi.org/10.1039/b505069c>
- dos Santos RN, Silva MGV, de Freitas RM (2011) Crysophanol Effects on Lipid Peroxidation Levels and Catalase Activity in Mice Hippocampus after Pilocarpine-induced Seizures. *J Cell Sci Ther* 2:104. <https://doi.org/10.4172/2157-7013.1000104>
- Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R., & Abdollahi, M. (2014). The story of beta-sitosterol-a review. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(5), 590-609. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2014/7764>
- Sen, A., Dhavan, P., Shukla, K. K., Singh, S., & Tejavathi, G. (2012). Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of  $\beta$ -Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. *Sci Secure J Biotech*.
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6), e1403. doi: 10.7759/cureus.1403