

Flavonoides de especies argentinas del género *Tripodanthus* (Eichl.) Tiegh. (Loranthaceae)

Marcelo L. Wagner^{1*}, Rafael A. Ricco¹, Fernando G. Ranea^{1,2} y
Alberto A. Gurni^{1,2}

¹ Cátedra de Farmacobotánica, Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

² Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez". Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (1113) Buenos Aires. República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. Correo electrónico: mlwagner@ffyb.uba.ar.

Resumen

Tripodanthus acutifolius (Ruiz & Pav.) Tiegh. y *Tripodanthus flagellaris* (Cham. & Schlecht.) Tiegh. –Loranthaceae– son plantas hemiparásitas utilizadas en la medicina popular por sus supuestas propiedades hipotensoras. El objetivo de este trabajo es caracterizarlas mediante su composición de flavonoides. Se estudiaron hojas y tallos de ejemplares que crecen sobre diferentes hospedantes. Para el aislamiento y la caracterización de los flavonoides se recurrió a métodos estándares. Los estudios fitoquímicos revelaron la síntesis de quercetina-3-O-arabinofuranósido y catequina-4 β -ol en hojas y tallos de *T. acutifolius*, y quercetina-3-O-ramnosilglucósido y proantocianidinas diméricas B6 y B8 en *T. flagellaris*. Estos resultados aportan parámetros anatómicos y fitoquímicos que pueden ser utilizados para el control de calidad de estas especies.

Flavonoids from Argentine species of *Tripodanthus* (Eichl.) Tiegh. (Loranthaceae)

Summary

Tripodanthus acutifolius (Ruiz & Pav.) Tiegh. and *Tripodanthus flagellaris* (Cham. & Schlecht.) Tiegh. –Loranthaceae– are hemiparasitic plants used in folk medicine by their putative hypotensives properties. The aim of this work is to characterize them studying their flavonoid composition. Standard procedures for flavonoid isolation and characterization have been used. Phytochemical analysis revealed quercetin-3-O-arabinofuranoside and catechine-4 β -ol synthesis in leaves and stems of *T. acutifolius*, and quercetin-3-O-rhamnosylglucoside and dimeric proanthocyanidins B6 and B8 in *T. flagellaris*. These results propose anatomical and phytochemical parameters which can be used for quality control of those species.

Introducción

Tripodanthus (Eichl.) Tiegh. es uno de los cinco géneros que conforman la familia Loranthaceae en la República Argentina (Abbiatti, 1946). Esta

familia, junto con Viscaceae y Eremolepidaceae principalmente, comprende un gran grupo de plantas –aproximadamente 1.400 especies– a las que se les llama, en forma generalizada, “muérdagos”. Son plantas hemiparásitas, semileñosas, que se

Palabras clave: estudios fitoquímicos - flavonoides - hemiparásitas - Loranthaceae - *Tripodanthus* - medicina popular.

Key words: Phytochemical study - flavonoids - hemiparasites - Loranthaceae - *Tripodanthus* - folk medicine.

desarrollan sobre otros árboles o arbustos y se distribuyen en hábitats tropicales, subtropicales y también en zonas templadas.

En la Argentina se desarrollan dos especies del género *Tripodanthus*: *T. acutifolius* (R. & P.) Tiegh. y *T. flagellaris* (Cham. & Schlecht.) Tiegh (Abbiatti, 1946).

T. acutifolius se encuentra distribuida en la región septentrional de la Formación del Monte y del Parque Chaqueño (22° a 30° S, 64° a 68° O) (Cabrera, 1994). Los pobladores de las provincias de Salta y Jujuy le dan el nombre popular de “corpus”; también se la conoce como “liga” y “yerba del pajarito” (Abbiatti, 1946; Lombardo, 2003). Es una planta hemiparásita de especies de Leguminosas, Anacardiáceas, Sapindáceas, Zigofiláceas y también frutales. Es un arbusto erecto o subtrepador, con raíces aéreas vigorosas. Las hojas son opuestas, coriáceas o subcoriáceas, aovado-lanceoladas, pecioladas y penninervadas. Las flores son blancas o blanco-amarillentas, muy fragantes y dispuestas en tríades pediceladas. Los frutos son bayas aovadas y negruzcas (Castellón, 1998) (Figura 1).

Figura 1.- *Tripodanthus acutifolius*



T. flagellaris se distribuye en la Formación del Monte y el Parque Mesopotámico o selva paranaense. Se la conoce con el nombre popular de “liga blanca” (Abbiatti, 1946); en algunas comarcas, los pobladores la denominan “corpo”, “liga” o “pupusa” (Ulibarri, 1987). Parasita diversas especies de *Acacia* y *Prosopis*. Es una planta trepadora, de ramas flexuosas y con raíces aéreas delgadas. Las hojas son alternas, sésiles o subsésiles, linear-agudas, subcoriáceas y con la nervadura media apenas visible. Las flores son blancas o amarillentas, dispuestas en tríades pediceladas. Los frutos son bayas obovoides, negruzcas (Abbiatti, 1946) (Figura 2). Ambas especies son utilizadas en medicina popular por su supuesta acción hipotensora que se atribuye a las semejanzas –en su hábito hemiparásito– con el muérdago europeo (*Viscum album* L. –Viscaceae–) (Domínguez, 1928).

Debido a su empleo como hipotensor en medicina popular, y a su posible utilización en la terapéutica antitumoral, se abordó este estudio a fin de caracterizar los flavonoides de ambas especies no solo

Figura 2.- *Tripodanthus flagellaris*



para diferenciarlas entre sí, sino también, de otros muérdagos; además, fue objetivo del estudio establecer parámetros que se puedan aplicar a su control de calidad.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material estudiado se encuentra depositado en el Herbario del Museo de Farmacobotánica “Juan Aníbal Domínguez” (BAF), de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Los ejemplares se determinaron mediante el uso de claves sistemáticas y la comparación con material de herbario. Se analizaron las hojas y los tallos de los siguientes materiales:

Tripodanthus acutifolius: - JUJUY: Tumbaya, Leg. Vignale, D. y P. Domenech n° 811, 26-IV-1996, sobre *Salix sp* (Salicaceae); Lozano, Leg. Gurni, A. s. n., 17-III-1999, sobre *Salix humboldtiana* Willd. (Salicaceae). - SALTA: Faldeo Cerro San Bernardo, Leg. Gurni, A. s. n., 20-IX-1985, (3 ejemplares), sobre hospedante indeterminado. - TUCUMÁN: El Cadillal, Leg. Gurni, A. s. n., 2-V-1981, sobre Fabaceae.

Tripodanthus flagellaris: - CATAMARCA: a 33 km. antes de El Rodeo, Leg. Gurni, A. y Wagner, M. n° 31, 16-II-1997, sobre *Prosopis sp* (Fabaceae). - Cn., II-1983, sobre *Acacia caven* (Mol.) Molina (Fabaceae). - ENTRE RÍOS: Ñandubaysal, Gualeguaychú, Leg. Gurni, A. n° 3, 16-III-1985, sobre hospedante indeterminado.

Obtención de los extractos

Se tomaron 10 g de cada órgano desecado y molido, a los cuales se les agregaron 100 ml de metanol-agua (80:20) a temperatura ambiente durante tres días, con cambio diario del solvente hasta obtener un volumen de 300 ml. Cada extracto así obtenido se llevó a sequedad a presión reducida en evaporador rotatorio. Se preparó de cada extracto una solución al 20%.

Estudio de los flavonoles

Con cada uno de los extractos se realizaron cromatografías bidimensionales en capa fina de celulosa normal (TLC) o de alta resolución (HPTLC).

Se utilizó TBA (ter butanol-ácido acético-agua, 3:1:1) como primera dimensión y ácido acético (AcOH) 15 % como segunda dimensión (Mabry y col., 1970). Los cromatogramas se observaron a la luz UV antes y después de ser expuestos a vapores de amoníaco. También se realizó una aspersión con tricloruro de aluminio en metanol (solución al 5%) y con AEDBE (Naturstoffreagenz A), para obtener el patrón de distribución de los compuestos en el material estudiado.

El aislamiento y la purificación se llevaron a cabo por cromatografía descendente en papel Whatman 3MM, y se empleó AcOH 15% como solvente. Cada banda fue eluida con metanol y se realizó otra cromatografía descendente en BAA (n butanol-ácido acético-agua, 6:1:2) (Mabry y col., 1970; Waterman y Mole, 1994). Los compuestos obtenidos fueron eluidos en metanol. A cada compuesto aislado se lo sometió a una hidrólisis ácida con una solución acuosa de ácido clorhídrico 2 N durante 1 h a 100 °C, para estudiar los aglicones y los azúcares (Markham, 1982). La identificación de los glicósidos y de los aglicones se realizó por procedimientos estándares (Mabry y col., 1970; Markham, 1982; Waterman y Mole, 1994). Para la caracterización se utilizaron testigos de quercetina, quercetina-3-O-glucósido y rutina provistos por Sigma-Aldrich.

La identificación de los azúcares de cada compuesto se realizó mediante cromatografía en capa delgada (TLC) con azúcares de referencia y con isopropanol-agua (4:1) como solventes de corrida, y se detectaron con anilina-difenilamina-acetona-ácido fosfórico al 80% (4 ml: 4 g: 200 ml: 30 ml) (Hansen, 1975).

Estudio de las proantocianidinas

Se analizó cada extracto mediante cromatografía bidimensional en capa fina de celulosa (TLC); se utilizó como solventes sec butanol-ácido acético-agua (sBAA, 14:1:5) para la primera dimensión, y AcOH 6 % para la segunda dimensión (Haslam, 1975). Se desarrollaron dos cromatogramas: a uno se lo reveló con solución de HCl al 1% en metanol y luego fue colocado en estufa a 100 °C durante 15 min. El flavan-3,4-diol y las proantocianidinas se convirtieron en antocianidinas (Gurni y Wagner, 1982); al segundo

cromatograma se le realizó una aspersión con el reactivo de vainillina-HCl (solución etanólica de vainillina al 5%-HCl cc; 4:1). Las manchas coloreadas corresponden a leuco y a proantocianidinas (Haslam, 1975). La caracterización de los compuestos fue realizada mediante procedimientos estándares (Haslam, 1975; Porter, 1994; Sun y col., 1998, 1999; Vovk y col., 2005). Se utilizaron testigos de (+) catequina, (-) epicatequina y procianidina B1 y B2, provistos por Sigma-Aldrich, y de procianidinas B6 y B8 que fueron extraídas de la corteza y de las hojas del roble europeo (*Quercus robur* (Ehrh.) DC.-Fabaceae-) (Vivas y col., 2006).

Resultados

Los resultados obtenidos de la caracterización fitoquímica de flavonoides realizada sobre muestras de hojas y de tallos de *T. acutifolius* como *T. flagellaris* indican que: ambas especies producen quercetina libre, quercetina-3-O-glucósido y quercetina-3-O-rutinósido. Sin embargo, *T. flagellaris* presenta, además, el triglicósido 3-O- β -glucosil-(1 \rightarrow 2)-O-[α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-D-glucosa], y *T. acutifolius*, por su parte, presenta el 3-O-arabofuranósido.

Las dos especies acumulan (+) catequina y (-) epicatequina. *T. flagellaris* se diferencia de *T. acutifolius* porque produce procianidinas diméricas (B6 y B8); en cambio, *T. acutifolius* acumula flavan-3,4-diol (leucocianidina) (Figura 3) (Tabla 1).

Figura 3.- Estructura de los compuestos aislados

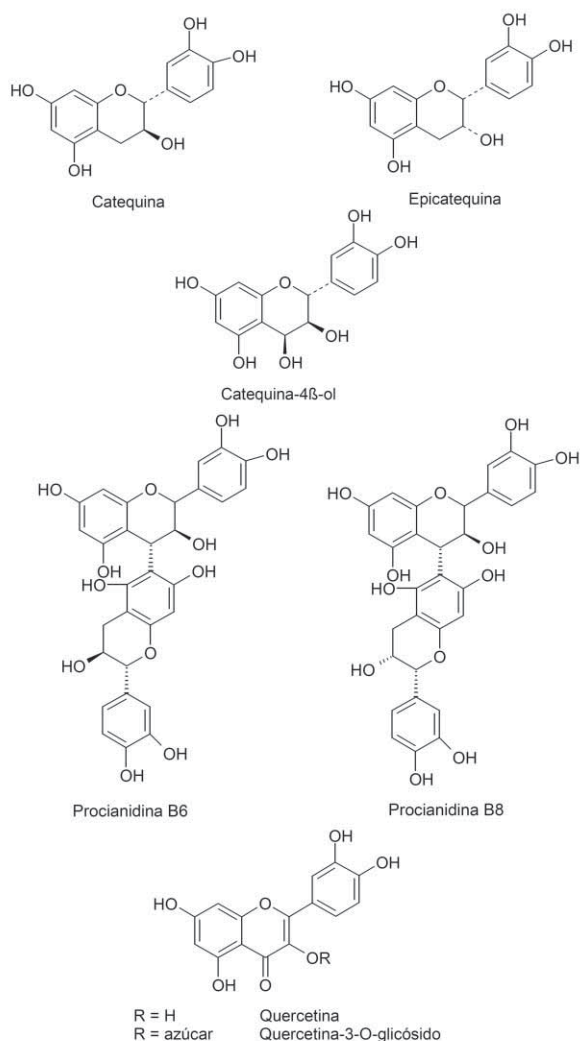


Tabla 1.- Polifenoles de *T. acutifolius* y *T. flagellaris*

Compuesto	<i>T. acutifolius</i>	<i>T. flagellaris</i>
Flavonoles	Quercetina	Quercetina
	Quercetin-3-O-glucósido	Quercetin-3-O-glucósido
	Quercetin-3-O-ramnosilglucósido (Rutina)	Quercetin-3-O-ramnosilglucósido (Rutina)
	Quercetin-3-O-arabofuranósido	Quercetin-3-O-glucoramnosilglucósido
Flavan-3-ol	(+) Catequina	(+) Catequina
	(-) Epicatequina	(-) Epicatequina
Flavan-3,4-diol	Catequin-4 β -ol (leucocianidina)	ND
Proantocianidinas	ND	B6: [catequina (4 α \rightarrow 6)-catequina]
		B8: [catequina (4 α \rightarrow 6)-epicatequina]

ND: No detectado.

Tabla 2.- Distribución de los flavonoides en los diferentes órganos de las especies de *Tripodanthus*

Especies	Órgano	Compuestos									
		Q	QG	QA	QGR	QGRG	C	E	C4βol	B6	B8
<i>T. acutifolius</i>	tallo	+	+	+	ND	ND	+	+	+	ND	ND
	hojas	+	+	+	+	ND	+	(+)	+	ND	ND
<i>T. flagellaris</i>	tallo	+	+	ND	++	++	+	(+)	ND	ND	ND
	hojas	+	+	ND	++	++	+	+	ND	+	+

Q: quercetina; QG: quercetin-3-O-glucósido; QA: quercetin-3-O- α -L-arabofuranósido; QGR: rutina; QGRG: quercetin-3-O-glucoranosilglucósido; C: catequina; E: epicatequina; C4 β ol: catequina-4 β -ol; B6 y B8: dímeros de proantocianidinas. Presencia. ++ : alta; + : intermedia; (+) : baja; ND: no detectado.

Los datos fisicoquímicos de los compuestos aislados se detallan a continuación:

Quercetina. Rf en Forestal 0,42; en BAA 0,73; en CAA 0,15; en TBA 0,57; en HOAc 60% 0,30. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 370; + NaOMe 248, 322 (desc.); + AlCl₃ 270, 334, 456 y + HCl 265, 360, 426; + NaOAc 274, 390 (desc.) y + H₃BO₃ 262, 388.

Quercetina-3-O-glucósido. Rf en BAA 0,58, en H₂O 0,08, en HOAc 15% 0,33. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 357; + NaOMe 272, 320, 404; + AlCl₃ 274, 428 y + HCl 270, 364, 400; + NaOAc 270, 300, 382 y + H₃BO₃ 262, 378. Hidrólisis: quercetina y glucosa.

Quercetina-3-O- α -L-arabofuranósido (Avicularina). Rf en BAA 0,85; en H₂O 0,17; en HOAc 15% 0,30. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 257, 357; + NaOMe 271, 324, 403; + AlCl₃ 272, 404 y + HCl 269, 354, 395; + NaOAc 270, 320, 376 y + H₃BO₃ 260, 299, 367. Hidrólisis, quercetina y arabinosa.

Quercetina-3-O-rutinósido. Rf en BAA 0,46; en H₂O 0,22; en HOAc 15% 0,44. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 257, 356; + NaOMe 270, 324, 410; + AlCl₃ 274, 300, 430 y + HCl 268, 300, 364, 395; + NaOAc 270, 320, 414 y + H₃BO₃ 266, 304, 402. Hidrólisis, quercetina, ramnosa y glucosa.

Quercetina-3-O-glucoranosilglucósido. Rf en BAA 0,39; en H₂O 0,77; en HOAc 15% 0,82. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 255, 353; + NaOMe 270, 322, 402; + AlCl₃ 272, 300, 432 y + HCl 270, 384, 420; + NaOAc 264, 378 y + H₃BO₃ 259, 370. Hidrólisis parcial (5 min), **quercetina-3-O-glucoranosilglucósido** y glucosa; hidrólisis total, quercetina, glucosa y ramnosa.

Quercetina-3-O-glucoranosilglucósido. Rf en BAA 0,45; en H₂O 0,23; en HOAc 15% 0,51. Propiedades espectrales $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 256, 356; + NaOMe 270, 324, 410; + AlCl₃ 274, 300, 430 y + HCl 268, 300, 364, 396; + NaOAc 270, 320, 414 y + H₃BO₃ 266, 304, 402. Hidrólisis: quercetina, glucosa y ramnosa.

Cianidina. Rf en BAA 0,65; en Fórmico 0,28; en Forestal 0,47; en HOAc 15% 0,60. Propiedades espectrales, $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH-HCl 536; + AlCl₃ 552. $E_{440}/E_{\text{máx}}\%$ = 19.

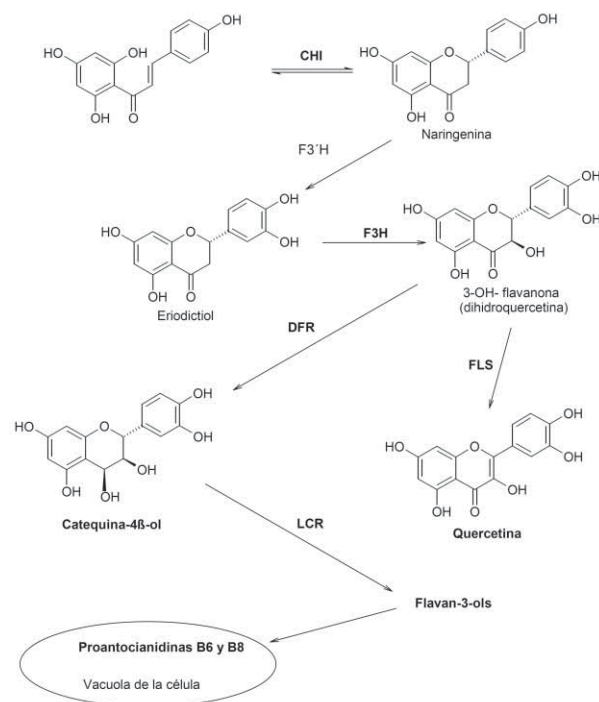
Sistemas de solventes: BBA (nbutanol-AcOH-H₂O; 6:1:2); CAA (cloroformo-AcOH; 2:1 saturado con H₂O); Fórmico (ácido fórmico-AcOH-H₂O; 9:2:3); Forestal (HCl_{cc}-AcOH-H₂O; 3:30:10).

La tabla 2 indica la distribución de los flavonoides en las hojas y en los tallos de las dos especies analizadas.

Discusión

Desde el punto de vista fitoquímico, las especies estudiadas de *Tripodanthus* pueden transformar la dihidroquercetina por dos vías. Una de ellas es la oxidación de la dihidroquercetina por la enzima flavonol sintasa y la generación de quercetina (Heller y Forkmann, 1994; Winkel-Shirley, 2002); parte de este compuesto sufre glicosidaciones en el OH del carbono 3 por la enzima 3-O-glicosiltransferasa. La otra vía es la reducción del carbonilo de la dihidroquercetina por la enzima 3-hidroxi-flavona-4-reductasa NADPH dependiente que origina leucocianidina (catequina-4 β -ol) (Heller y Forkmann, 1994; Winkel-Shirley, 2002), y que puede acumularse en *T. acutifolius*, o puede ser

Figura 4.- Rutas metabólicas probables para las especies estudiadas de *Tripodanthus*



CHI: chalcona isomerasa; F3H: flavonoide-3-hidroxilasa; F3'H: flavonoide-3'-hidroxilasa; FLS: flavonol sintasa; DFR: dihidroflavonol-4-reductasa; LCR: leucoantocianidina reductasa.

transformada por la 3,4-cis-dioles-reductasa (o leucocianidina reductasa) NADPH dependiente en (+) catequina y (-) epicatequina (Winkel-Shirley, 2002; Marles y col., 2003) como ocurre en ambas especies. *T. flagellaris* produce la condensación de las leucoantocianidinas y, en consecuencia, se acumula proantocianidinas (B6 y B8), pero hasta el presente no ha podido ser dilucidado el mecanismo de la condensación (Marles y col., 2003; Dixon y col., 2005; Xie y col., 2005) (Figura 4).

Del estudio comparativo de ambas especies se infiere que *T. flagellaris* se caracteriza por presentar una mayor complejidad en la glicosidación, probada por la presencia de quercetina-3-O-glucoramnoglucósido, compuesto poco común en la naturaleza. Además, acumula las proantocianidinas diméricas B6 y B8 que caracterizan a la especie. En cambio, *T. acutifolius* no produce triglicósidos ni

proantocianidinas, pero produce quercetina-3-O-arabofuranósido y catequina-4β-ol (Tabla 1).

Al comparar los tallos de ambas especies, se observó que *T. acutifolius* presentaba mayor complejidad en las rutas que llevan a la síntesis de proantocianidinas, pero menor diversidad de los 3-O-glicósidos de quercetina que *T. flagellaris* (Tabla 2).

En las hojas, en cambio, *T. acutifolius* presentó un metabolismo de los flavonoides menos complejo que *T. flagellaris*, probado por la presencia de las proantocianidinas B6 y B8 (Tabla 2).

Cuando se compararon los órganos estudiados en ambas especies, se observó que las hojas presentaban mayor diversidad de compuestos que los tallos. En *T. acutifolius*, la acumulación de rutina en las hojas, las diferenciaron de los tallos. En *T. flagellaris* la diferencia está dada por la presencia de proantocianidinas en las hojas (Tabla 2).

Como conclusión, existen diferencias interespecíficas entre ambas especies en la producción de los flavonoides. *T. flagellaris* se diferencia por presentar el triglicósido 3-O-β-glucosil-(1→2)-O-[α-L-ramnosil-(1→6)-D-glucosa] y, *T. acutifolius*, por su parte, presenta el 3-O-arabofuranósido. Además, *T. flagellaris* se diferencia de *T. acutifolius* porque produce procianidinas diméricas (B6 y B8); en cambio, *T. acutifolius* acumula flavan-3,4-diol (leucocianidina).

Estos resultados aportan parámetros fitoquímicos diagnósticos que pueden ser empleados en la autenticación y en el control de calidad de las dos especies estudiadas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires el otorgamiento del subsidio al proyecto UBA120, en el marco del cual se realizó este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Abbiatti, D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Revista del Museo de la Plata VII* (sección Botánica) 18: 1-110.
- Cabrera, A.L. (1994). "Regiones fitogeográficas argentinas". *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, II, Fasc. 1, ACME, Buenos Aires: 75.

- Castellón, A. (1998). "Loranthaceae" en Flora del Valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta, Serie Flora* 5(2): 1-15.
- Dixon, R.A., Xie, D-Y. and Sharma, S.B. (2005). "Proanthocyanidins: a final frontier in flavonoid research?". *New Phytologist* 165: 9-28.
- Domínguez, J. A. (1928). *Contribuciones a la Materia Médica Argentina*, Peuser, Buenos Aires: 260-264.
- Gurni, A.A. and Wagner, M.L. (1982). "Apigeninidin as a Leucoderivative in *Ephedra frustillata*". *Phytochemistry* 21: 2428-2429.
- Hansen, S.A. (1975). "Thin-layer chromatographic method from identification of mono-, di- and trisaccharides". *Journal of Chromatography* 107: 224-6.
- Haslam, E. (1975). "Natural Proanthocyanidins", in: Harbone, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H. (Eds.), *The Flavonoids*, Academic Press, New York-London, Vol. 1: 505-559.
- Heller, W. and Forkmann, G. (1994). "Biosynthesis of flavonoids", in: Harbone, J.B. (Eds.), *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, Boca Raton: 499-535.
- Lombardo, A. (1970). "Contribución al mejor conocimiento de las plantas indígenas" [en línea] <<http://www.uruguay.com/jardinbotanico/lombardo/con68/index>> [Consulta: 28/10/03].
- Mabry, T.J.; Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1976). *The Systematic Identification of the Flavonoids*, Springer-Verlag, Berlin and New York: 1-175.
- Markham, K.R. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London: 1-113.
- Marles, M.A.S.; Ray H. and Gruber, M.Y. (2003). "New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation". *Phytochemistry* 64: 367-383.
- Porter, L.J. (1994). "Flavans and Proanthocyanidins", en: Harbone, J.B. (Ed.), *The Flavonoids. Advances in Research since 1986*, Chapman and Hall/CRC, London, New York: 23-56.
- Sun, B.; Belchior, P.; Ricardo da Silva, J.M. and Spranger, M. I. (1999). "Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds". *Journal of Chromatography A* 841: 115-121.
- Sun, B.; Leandro, C., Ricardo da Silva, J.M. and Spranger, M.I. (1998). "Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins according to their degree of polymerization". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 1390-1396.
- Ulibarri, E. (1987). "Loranthaceae" en *Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina)*, Col. Cient. I.N.T.A., Buenos Aires, 6 (III):106-121.
- Vivas, N.; Nonier, M.F.; Pianet, I.; Vivas de Gaulejac, N. and Fouquet, E. (2006). "Proanthocyanidins from *Quercus petraea* and *Q. robur* heartwood: quantification and structures". *Comptes Rendus Chimie* 9(1): 120-126.
- Vovk, I.; Simonosvska, B. and Vuorela, H. (2005). "Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates". *Journal of Chromatography A* 1077: 188-194.
- Waterman, P.G. and Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell Scientific Publication, Oxford: 1-238.
- Winkel-Shirley, B. (2002). "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress". *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 218-223.
- Xie, D-Y. and Dixon, R. A. (2005). "Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?". *Phytochemistry* 66: 2127-2144.