

ESTUDIO QUIMICO DE *Piper steerni*¹

Rafael Posso O.*, Pedro P. Diaz y Aura M. P. de Diaz**

*Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

**Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Keywords: *Piper Steerni*; Piperaceae; N-(4-hydroxyphenylethylene) cinnamamide; Flavanones; C₆-C₁ compounds.

RESUMEN

Del extracto clorofórmico de las hojas de *Piper steerni* se aislaron por métodos cromatográficos 5,7-dihidroxyflavanona, 5-hidroxi-7-metoxiflavona y β-sitosterol; el extracto en acetato de etilo del tallo del mismo vegetal presentó iguales constituyentes que las hojas junto con bases nitrogenadas de las cuales se identificó N-(4-hidroxifeniletilen) cinamamida como un nuevo compuesto en la familia Piperaceae.

Los metabolitos secundarios mayoritarios del aceite esencial de las hojas de *P. steerni* fueron caracterizados como benzaldehido, alcohol bencílico y benzoato de etilo. Las estructuras de los compuestos fueron establecidas por métodos químicos y espectroscópicos y por correlaciones con sustancias conocidas.

ABSTRACT

From the chloroformic extract of the leaves of *Piper steerni* were isolated by chromatographic methods 5,7-dihydroxyflavanone; 5-hydroxy-7-methoxyflavanone and β-sitosterol. The ethyl acetate extract of the stem of *P. steerni* presented the same constituents that the leaves and nitrogenated bases from which was characterized the N-(4-hydroxyphenylethylene) cinnamamide, a new compound in the Piperaceae family. The major constituents from the essential oil of the leaves were characterized as benzaldehyde, benzyl alcohol and ethyl benzoate. The structures of the compounds were established by chemical and spectroscopic means and by correlation with previously known substances.

¹ Basado en la tesis de Magister Sc. presentada por R. P. O., a la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (1994).

INTRODUCCION

Piper steerni (Piperaceae) es una especie nueva oriunda del Cañón de Río Claro, departamento de Antioquia (Colombia).

Entre los compuestos aislados de *P. steerni*, además del β -sitosterol de reconocida acción antipirética y anti-inflamatoria (1), se encontraron dos sustancias con núcleo estructural 2-fenilbenzopirán-4-ona identificadas como 5,7-dihidroxi-flavanona (Pinocebrina) y 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (Pinostrobina) importantes biogénicamente por ser intermediarios en la formación de flavonoides más evolucionados (2) y por estar relacionados con inhibición de crecimiento, preservación de maderas y toxicidad contra hongos (3).

Benzaldehído, alcohol bencílico y benzoato de etilo son los constituyentes mayoritarios del aceite esencial de las hojas de *P. steerni*; estos compuestos han sido usados en la industria de perfumes (4,5).

En esta planta se encuentran bases nitrogenadas de las cuales fue identificada N-(4-hidroxifeniletile) cinamamida, la cual se reporta aquí por primera vez en la familia Piperaceae.

RESULTADOS Y DISCUSION

El **Compuesto II**, presenta en su espectro de IR absorciones fuertes en 3218 cm^{-1} (-OH), 1631 cm^{-1} (carbonilo conjugado) y entre $1604\text{-}1467\text{ cm}^{-1}$ (aromaticidad); la hidroxilación es evidente por las señales en δ 9.85 y en δ 12.13 presentes en el espectro RMN ^1H las cuales desaparecen al adicionar D_2O al compuesto y por el desplazamiento batocrómico de 47 nm de la banda en λ 287 nm en el espectro UV al adicionar MeONa a la muestra; los carbonos que soportan los grupos -OH pueden asociarse con las señales en ppm 167.78 y ppm 165.66 en el espectro de RMN ^{13}C y el grupo carbonilo con la señal en ppm 197.01 en el mismo espectro.

Mediante el análisis de los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y EM, se propone la fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ para el compuesto II, la cual puede detallarse en $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_2 \cdot 2\text{OH}$ correspondiente a un flavonoide. El espectro de EM por impacto electrónico exhibe un ión molecular en m/z 256 (100%) y fragmentos propios de un reordenamiento retro Diels-Alder con fisión del anillo **C**, en m/z 152 (78%) y m/z 104 (20%) indicando la presencia de dos grupos OH en el anillo **A**. Esta sustancia puede clasificarse como flavanona por su espectro de UV (6), por la interpretación mecanística del espectro de EM y por los espectros de RMN. El espectro de RMN ^1H presenta una señal doble de doble en δ 5.58 ($J=1.5$ y 4.5 Hz) atribuible al protón oximetínico en C-2, las constantes de acoplamiento de la anterior señal correspon-

den a la interacción de este protón con los localizados sobre el carbono 3 los cuales están representados por las dos señales doble de doble en δ 2.80 ($J = 16.0$ y 4.5 Hz) y δ 3.05 ($J = 16.0$ y 11.5 Hz). En este espectro se observa también una señal simple ancha en δ 5.98 que integra para dos protones y una señal múltiple en δ 7.56 que integra para cinco hidrógenos.

La localización de un -OH sobre C-5 puede sustentarse por la señal en δ 12.13 en RMN ^1H y por el desplazamiento batocrómico de la banda en λ 287 nm a λ 310 nm al adicionar AlCl_3 a la muestra. El hidroxilo restante puede localizarse sobre el C-7 de acuerdo a la biogénesis de estos compuestos (2) y al desplazamiento diamagnético de dos protones aromáticos en el espectro de RMN ^1H . Información adicional sobre la sustitución en el anillo **A**, fue obtenida a partir del análisis de los espectros de su derivado acetilado III que presenta en su espectro de IR una banda característica del grupo carbonilo de un ester fenólico (1776 cm^{-1}); en el espectro de RMN ^1H desaparecen las señales de hidrógenos lábiles y aparecen dos señales simples en δ 2.15 y en δ 2.29 correspondientes a protones de grupos acetilo; en este espectro aparecen diferenciados los protones sobre C-6 en δ 6.70 (d, $J = 2.5$ Hz) y sobre C-8 en δ 6.45 (d, $J = 2.5$ Hz) con un desplazamiento paramagnético de δ 0.72 y δ 0.47 respectivamente con relación a la sustancia original II. El espectro en EM muestra un ión molecular en m/z 340 (4.6%) el cual representa un aumento de 84 u. m. a. con respecto al peso molecular de II. El compuesto II corresponde a 5,7-dihidroxi flavanona (Pinoembrina) reportado anteriormente en la familia Piperaceae como constituyente de *Piper hostmannianum* (7).

El compuesto IV presenta características espectroscópicas similares a las del compuesto II. El espectro de RMN ^1H de ambos compuestos incluye señales típicas para protones del anillo **C** de flavanonas representadas en IV por dobles dobletes en δ 5.42 ($J = 12.0$ y 3.5 Hz), en δ 2.78 ($J = 17.0$ y 3.5 Hz) asignada al protón metilénico ecuatorial de C-3 y por la señal doble de doble en δ 3.0 atribuida al protón metilénico axial sobre C-3. En este espectro los protones aromáticos están representados por una señal múltiple en δ 7.40 que integra para cinco protones y en δ 6.03 que integra para dos hidrógenos. A diferencia del compuesto II, la sustancia IV presenta en su estructura un solo hidroxilo fenólico (δ 12.0) y un grupo metoxilo (δ 3.80). El espectro de EM de IV presenta un ión molecular en m/z 270 (100%) y fragmentos originados por una ruptura retro Diels-Alder en m/z 166 (72%) y en m/z 104 (15%) que muestran la existencia de un -OH y un metoxilo en el anillo **A**. La ubicación del hidroxilo sobre C-5 en el compuesto IV se evidencia por la señal simple en δ 12.0 en su espectro de RMN ^1H la cual desaparece al adicionar D_2O a la muestra y por el desplazamiento batocrómico de 63 nm de la banda en λ 290 nm en el espectro UV al adicionar AlCl_3 a la muestra. El derivado acetilado de esta sustancia presenta en su espectro de EM un aumento de 42 u. m. a. ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$) y en su espectro de RMN ^1H una señal simple en δ 2.25 que integra para tres protones del grupo acetilo, además aparecen señales dobles en δ 6.35 ($J = 2.5$ Hz) para el protón sobre C-6 y δ 6.19 ($J = 2.5$ Hz) para el protón en C-8; estos últimos valores muestran un desplazamiento

paramagnético de δ 0.32 y δ 0.16 respectivamente con respecto a la sustancia original. Al analizar los datos anteriores y el espectro de RMN ^{13}C se concluye que IV corresponde a 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (Pinostrobin) (8).

El compuesto VI es una sustancia que posee carácter aromático (IR: 3071, 1610-1464, 772, 706 cm^{-1} ; UV: 222, 275 nm) y presenta en su espectro de RMN ^1H una señal múltiple en δ 7.55 la cual integra para cinco protones y señales con un patrón de acoplamiento AA' BB' característico de compuestos aromáticos disustituídos en para [δ 6.70 (J= 8.0 Hz); δ 7.10 (J= 8.0 Hz)].

VI posee también dos hidrógenos lábiles (IR: 3442, 3270 cm^{-1}) los cuales se asocian en el espectro de RMN ^1H con las señales en δ 2.95 y δ 8.29 las cuales desaparecen al adicionar D_2O a la muestra; una de estas señales corresponde a un hidrógeno amídico ya que esta función es evidente por la banda intensa en el espectro de IR en 1680 cm^{-1} (RMN ^{13}C : ppm 168.0), por el espectro de EM y por el análisis de los espectros de RMN los cuales son similares a los reportados para cinamamidas (9-11). La unidad estructural proveniente del ácido cinámico está sustentada por la señal múltiple en δ 7.55 en RMN ^1H y por dos señales dobles en el mismo espectro en δ 7.60 y en δ 6.68 con constantes de acoplamiento de J= 16.0 Hz (10); estos hidrógenos están unidos a los carbonos cuyas señales en RMN ^{13}C aparecen en ppm 122.2 y en ppm 140.6 respectivamente; el espectro de EM confirma esta unidad por los picos en m/z 131 (92%), 103 (40%), 77 (28%) (11). Según el espectro de EM el ion molecular M^+ es de m/z 267 (4%) y teniendo en cuenta los espectros de RMN, la segunda unidad estructural es la amínica ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}$) la cual consta de dos pares de protones metilénicos no equivalentes representados en RMN ^1H por una señal triple en δ 2.78 (J= 8.0 Hz, protones bencílicos) y por una señal cuádruple ancha en δ 3.50 (J= 8.0 Hz) que se asigna a protones metilénicos no bencílicos, vecinos a un -NH- con cuyo protón interactúan para producir la multiplicidad observada (9); con estos datos y teniendo en cuenta los protones aromáticos del benceno para sustituido se propone la estructura IV para el compuesto en estudio. La confirmación de la estructura se hizo con la acetilación del mismo la cual dio como resultado el compuesto VII de M+309 (25%) indicando monoacetilación; en el IR de VII aparece una banda en 1754 cm^{-1} y desaparece la banda en 3442 cm^{-1} del compuesto original; en el espectro de RMN ^1H desaparece la señal en δ 8.29 y aparece una nueva señal simple en δ 2.28 del grupo acetilo, igualmente los protones vecinos al -OH en el sistema AA' BB' sufren un desplazamiento paramagnético de δ 0.28 después de la acetilación.

La asignación de las señales correspondientes a cada uno de los C (RMN ^{13}C) en VI, se hizo por comparación con datos reportados en la literatura para un compuesto similar (11), figura 1.

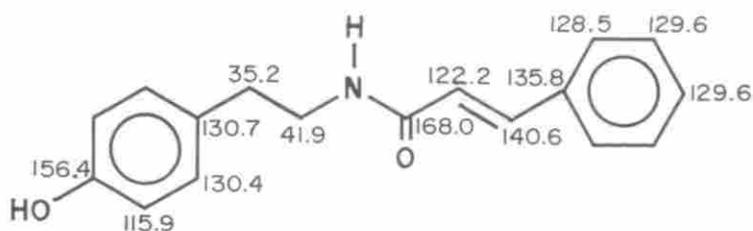
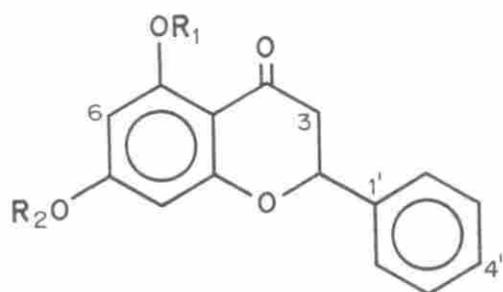
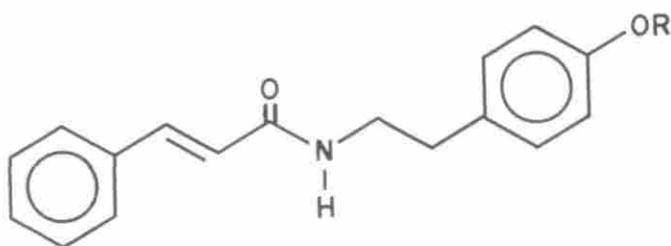


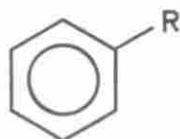
Figura 1.
ASIGNACION RMN¹³C DE VI



- II: $R_1 = R_2 = H$
 III: $R_1 = R_2 = Ac$
 IV: $R_1 = H; R_2 = Me$
 V: $R_1 = Ac; R_2 = Me$



- VI: $R = H$
 VII: $R = Ac$



- VIII: $R = CHO$
 IX: $R = CH_2OH$
 X: $R = COOC_2H_5$

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL VEGETAL

El material usado en esta investigación fue recolectado en el Cañón del Río Claro, municipio de San Luis, Departamento de Antioquia y determinado botánicamente como una especie nueva por el botánico Dr. A. Cogollo; un espécimen completo fue depositado en el herbario "Joaquín Antonio Uribe", Medellín (JAUM 2194).

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.

Tallo seco y molido (1Kg) fue sometido a extracción en soxhlet por 72 horas con etanol; el extracto etanólico (23 g) se fraccionó en solventes de polaridad creciente para obtener los extractos en cloroformo (4.5 g) y en acetato de etilo (7.2 g). El extracto en acetato de etilo (7.2 g) fue sometido a columna cromatográfica usando sílica gel (100 g) como adsorbente; elución con tolueno dio ésteres de ácidos grasos (950 mg) y β -sitosterol I; elución con tolueno-acetona (8:2), pinocembrina II (200 mg); elución con tolueno-acetona (7:3), pinostrobrina IV (105 mg); elución con tolueno-acetona (1:1), N-(4-hidroxifeniletile) cinamamida VI (55 mg) y tolueno-acetona (3:7) dio **mezcla de bases nitrogenadas** (28 mg).

Hojas secas (1 Kg) fueron sometidas a extracción exhaustiva en soxhlet con etanol; el extracto etanólico (82 g) se fraccionó en éter de petróleo (30 g) y cloroformo (25 g). A partir del extracto en éter de petróleo (6 g) sometido a fraccionamiento en columna cromatográfica sobre sílica gel (80 g) se obtuvieron ácidos grasos (800 mg), β -sitosterol (1200 mg) y mezcla compleja de difícil separación (950 mg) usando como eluentes éter de petróleo y cloroformo puros y en mezcla. El extracto cloroformico (10 g) fraccionado sobre sílica gel (130 g) en columna cromatográfica permitió el aislamiento de ácidos grasos (900 mg) y β -sitosterol (350 mg) usando como eluente éter de petróleo; elución con éter de petróleo-acetato de etilo en proporciones (8:2) y (7:3) permitió el aislamiento de **Pinocembrina II** (80 mg) y Pinostrobrina IV (60 mg) respectivamente.

Destilación por arrastre con vapor de agua, de hojas frescas de *P. steerni*, dio un rendimiento de 0.6% (P/V) de **aceite esencial** (η_{25} 1.502).

El aceite esencial (1.8 g) fue separado en sus componentes mayoritarios por fraccionamiento sobre columna cromatográfica usando sílica gel (60 g) como adsorbente y éter de petróleo y diclorometano puros y en mezclas como eluentes; las fracciones que presentaron un compuesto en mayor proporción por cromatografía en capa fina, fueron sometidas a cromatografía en capa fina preparativa

usando n-hexano como eluente; de esta manera se separaron benzaldehído VIII, alcohol bencílico IX y benzoato de etilo X cuyas estructuras fueron elucidadas por análisis espectroscópico (IR, RMN ^1H Y EM) y por comparación con muestras auténticas.

DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE LOS CONSTITUYENTES Y DE SUS DERIVADOS

β -SITOSTEROL I:

Cristales blancos, pf 138-140 °C (CHCl_3); IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3380, 2890, 2860, 1650, 1625, 1450, 1050, 1025, 950, 820. Su identificación se hizo por comparación con una muestra auténtica.

5,7-DIHIROXIFLAVANONA (Pinocembrina) II:

Cristales blancos, pf 201-203 °C (MeOH), [lit. 193-194 °C (12)]; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -24.9^\circ$ (c.0.0077, CH_3COCH_3); IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3218, 3020, 2926, 2856, 2754, 2643, 1631, 1604, 1584, 1489, 1467, 1438, 1360, 1304, 1257, 1090, 1016, 977, 890, 769, 714; UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 227, 287, 330. hombro (27.648, 38.840, 8732); λ_{max} (MeOH + MeONa) nm: 223, 247, 324; λ_{max} (EtOH) nm: 212, 290, 337 hombro; λ_{max} (EtOH + AlCl_3/HCl) nm: 206, 310, 370; EM (70 eV), m/z (int. rel.): 256 (100) [M^+], 179 (76), 152 (78), 124 (46), 104 (20), 77 (22). RMN ^1H (90 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : ver Discusión. RMN ^{13}C (22.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) ppm: 80.27 (C-2), 44.05 (C-3), 197.01 (C-4), 165.66 (C-5), 97.39 (C-6), 167.78 (C-7), 96.32 (C-8), 164.46 (C-9), 103.60 (C-10), 127.62 (C-2', 6'), 129.74 (C-3', 5'), 129.83 (C-4').

5,7-diacetoxiflavanona (Diacetato de Pinocembrina) III:

Cristales blancos, pf 143-145 °C (EtOH); IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3092, 3066, 3036, 1776, 1692, 1618, 1576, 1499, 1455, 1369, 1285, 1261, 1188, 1074, 905, 701; EM (70 eV), m/z (int. rel.): 340 (4.6), 298 (100), 256 (78), 179 (95), 152 (90), 124 (27); RMN ^1H (90 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 5.40 (dd, J= 11.5 y 4.5 Hz, H-2), 2.78 (dd, J= 16.0 y 4.5 Hz, H-3), 3.05 (dd, J= 16.0 y 11.5 Hz, Ha-3), 6.70 (d, J= 2.5 Hz, H-6), 6.45 (d, J= 2.5 Hz, H-8), 7.35 (m, H-2'-6'), 2.29 (s, 3H), 2.15 (s, 3H).

5-HIDROXI-7-METOXIFLAVANONA (Pinostrobin) IV:

Cristales blancos, pf 101-102 °C (MeOH) [Lit 112-113 °C (12)]; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5.2^\circ$ (c.0.0036, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3035, 2970, 2914, 2847, 1632, 1572, 1513, 1449, 1378, 1342, 1296, 1202, 1189, 1156, 1082, 1060, 1030, 1001, 983, 820, 660; UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 225, 290, 337. (31.860, 32.400, 11.691);

λ_{max} . (MeOH + MeONa) nm: 225, 290, 335 hombro; λ_{max} . (MeOH + AlCl_3/HCl) nm: 225, 245, hombro; 290, 353; EM (70 eV), m/z (int. rel.): 271 (18) [$\text{M}^+ + 1$], 270 (100), 269 (54), 252 (7), 242 (5), 193 (89), 167 (19), 166 (72), 138 (44), 115 (7), 104 (15); RMN ^1H (90 MHz, CDCl_3) δ : 5.42 (dd, J= 12.0 y 3.5 Hz, H-2), 2.78 (dd, J= 17.0 y 3.5 Hz, H-3), 3.00 (dd, J= 17.0 y 12.0 Hz, Ha-3), 6.03 (s ancho, H-6,8), 7.40 (m, H-2'-6'), 12.0 (s, -OH), 3.80 (s. OCH_3). RMN ^{13}C (22.4 MHz, CDCl_3) ppm: 79.20 (C-2), 43.34 (C-3), 195.74 (C-4), 164.14 (C-5), 95.14 (C-6), 167.99 (C-7), 94.27 (C-8), 162.77 (C-9), 103.13 (C-10), 138.40 (C-1'), 126.13 (C-2',6'), 128.85 (C-3', 4', 5'), 55.66 (- OCH_3).

5-ACETOXI-7-METOXIFLAVANONA (Acetato de pinostrobin) V:

Cristales blancos, pf 125-127 °C (EtOH); IR ν_{max} . (KBr) cm^{-1} : 3093, 3035, 1771, 1681, 1621, 1499, 1406, 1067, 1032, 1010, 985, 918, 894, 836, 752, 702; EM (70 eV), m/z (int. rel.): 312 (5), 271 (9), 270 (67), 269 (39), 193 (81), 166 (33), 138 (6), 104 (8), RMN ^1H (90 MHz, CDCl_3) δ : 5.38 (dd, J= 16.0 y 5.0 Hz, H-2), 2.79 (dd, J= 16.0 y 5.0 Hz, H-3), 3.00 (dd, J= 16.0 y 11.0 Hz, Ha-3), 6.19 (d, J= 2.5 Hz, H-6), 6.35 (d, J= 2.5 Hz, H-8), 7.38 (s ancho, H-2'-6'), 2.25 (s, 3H).

N-(4-HIDROXIFENILETILEN)CINAMAMIDA VI:

Cristales amarillentos, pf 198 °C ($\text{CH}_3)_2\text{CO}$); IR ν_{max} . (KBr) cm^{-1} : 3442, 3270, 3071, 2983, 2960, 1680, 1630, 1610, 1595, 1530, 1508, 1464, 1380, 1338, 1274, 1124, 1041, 979, 831, 772, 706; UV λ_{max} . (MeOH) (ϵ): 222, 275 (23.666, 29.994); λ_{max} . (MeOH + NaOH) nm: 210, 230 hombro. 248 hombro, 276; EM (70 eV), m/z (int. rel.): 267 (4), 148 (53), 131 (92), 121 (10), 120 (100), 103 (40), 77 (28); RMN ^1H (90 MHz, CDCl_3) δ : 2.78 (t, J= 8.0 Hz, Ar- CH_2 -), 3.50 (q, J= 8.0 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 2.95 (s, ancho, -NH-), 6.68 (d, J= 16.0 Hz, Ar- $\text{CH}=\text{}$), 7.60 (d, J= 16 Hz, CO- $\text{CH}=\text{}$), 7.55 (m, 5H), 7.10 (d, J= 8.0 Hz, 2H), 6.70 (d, J= 8.0 Hz, 2H), 8.29 (s ancho, OH); RMN ^{13}C (22.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) ppm: Ver figura 1.

N-(4-ACETOXIFENILETILEN) CINAMAMIDA VII:

Cristales amarillentos, pf 150-152 °C ($\text{CH}_3)_2\text{CO}$); IR ν_{max} . (KBr) cm^{-1} : 3273, 3084, 3029, 2871, 2856, 1754, 1666, 1613, 1562, 1440, 1373, 1045, 974, 832, 767, 679; EM (70 eV), m/z (int. rel.): 310 (5), 309 (25), 162 (57), 131 (100), 121 (19), 120 (100), 103 (83), 77 (59); RMN ^1H (90 MHz, CDCl_3) δ : 2.82 (t, J= 8.0 Hz, Ar- CH_2 -), 3.58 (q, J= 8.0 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$ -), 6.15 (s ancho, -NH-), 6.38 (d, J= 16.0 Hz, Ar- $\text{CH}=\text{}$), 7.60 (d, J= 16.0 Hz, CO- $\text{CH}=\text{}$), 7.40 (m, 5H), 7.18 (d, J= 8.0 Hz, 2H), 6.98 (d, J= 16.0 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H).

AGRADECIMIENTOS

Al programa BID- COLCIENCIAS - UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA (1101-05-002-92).

BIBLIOGRAFIA

1. Gupta, M. B.; Nath, R.; Srivastava, N.; Shanker, K.; Kishor, K.; Bhargava, K. P. *Planta Médica*. **1980**, 39, 157.
2. Geissman, T. A.; Crout, D. H. G. "*Organic Chemistry of Secondary Plant metabolism*". Freeman, Cooper & Company, San Francisco, **1969**.
3. Bruce, A. B. in "*The Flavonoids*" (Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Marby, H., eds). Chapman & Hall, London, **1975**, 561.
4. Clark, G. S. *Perfum. Flavor*, **1992**, 17, 45.
5. Lawrence, B. M. *Perfum, Flavor*. **1992**, 17, 15.
6. Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. "*The Systematic Identification of Flavonoids*". Springer-Verlag, New York, **1970**.
7. Díaz, P. P.; Arias, T.; Joseph, -Nathan, P. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 809.
8. Gonzalez, A. G.; Aguiar, Z. E.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G.; Dominguez, X. A. *Phytochemistry*. **1989**, 28, 2871.
9. Adesina, S. K., Reisch, J. *Phytochemistry*. **1989**, 28, 839.
10. Simeray, J.; Chaumont, J.; Bebalot, F.; Vaquette, J. *Phytochemistry*. **1985**, 24, 2720.
11. Hussain, S. F.; Gozler, B.; Shamma, M.; Gozler, T. *Phytochemistry*. **1982**, 21, 2979.
12. Geissman, T. A. (de.), "*The Chemistry of Flavonoid Compounds*". Pergamon Press, Oxford, **1962**.