

TANINOS O POLIFENOLES VEGETALES

RESUMEN

El término tanino se acuñó históricamente por el uso empírico que se daba a algunos extractos vegetales para el proceso de tanaje o conversión de las pieles de animales en cuero desde hace más de cien años. El desarrollo de las modernas técnicas instrumentales para la elucidación estructural de sustancias orgánicas, permitió el inicio científico en el área de polifenoles vegetales, término sugerido por el doctor Edwin Haslam en lugar de taninos. En esta revisión se discuten algunos hechos históricos, definiciones, técnicas de aislamiento y elucidación estructural, clasificación y aplicaciones de estos compuestos, desde la curtiembre hasta la industria alimenticia.

PALABRAS CLAVES Polifenoles, Fenoles, Taninos hidrolizables, Taninos condensados, Florotaninos, Ácido gálico, Ácido elágico, Catequina, Epigallocatequina

ABSTRACT

The term tannin was historically coined by the empirical use that occurred to some vegetal extracts for the process of tanning or conversion of the animal skins to leather more than one hundred years ago. The development of the modern instrumental techniques for the structural elucidation of organic substances, allowed to the scientific beginning in the area of vegetable polyphenols, term suggested by doctor Edwin Haslam instead of tannins. In this revision some historical facts, definitions, techniques of isolation and structural elucidation, classification and applications of these compounds are discussed, from the tannery to the nutritional industry.

KEYWORDS: *Polyphenols, Phenolics, hydrolysable tannins, condensed tannins, , Phlorotannins, Gallic acid, ellagic acid Catechin, Epigallocatechin,*

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de conversión de las pieles animales en cueros durables utilizando extractos de plantas en regiones mediterráneas data de al menos 2000 años atrás. Este proceso se conoce como curtiembre (tanning), con lo cual se popularizó y estableció el uso del término “tanino” en la literatura científica. Hace más de cien años atrás, Trimble comentó: “los taninos ocupan una parte de la línea fronteriza en ciencias entre la botánica y la química”. Aunque la importancia de los taninos vegetales en diversas disciplinas científicas ha sido reconocida, no es fácil dar una definición firme. Probablemente la definición mas simple, concisa y aceptable sigue siendo la de Bate-Smith y Swain (1962)^[1]: “*Compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000, que además de dar las reacciones fenólicas usuales, tienen propiedades especiales tales como la habilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas.*”

Muchos aún prefieren el término taninos vegetales, simplemente debido a su falta de precisión. Sin embargo, terminológica y científicamente, se recomienda el término “**polifenoles vegetales**” como descriptor para estos metabolitos secundarios de plantas superiores, si se

JOSÉ HIPÓLITO ISAZA M.
Ph.D. Profesor Titular, Grupo Polifenoles UTP-CENIVAM, Facultad de Tecnología, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira. La Julita, A.A. 097 Pereira, Colombia
jhim@utp.edu.co
jhisaza@gmail.com

quieren interpretar seriamente sus diversas características y aplicaciones a nivel molecular^[1].

Propiedades estructurales y clasificación

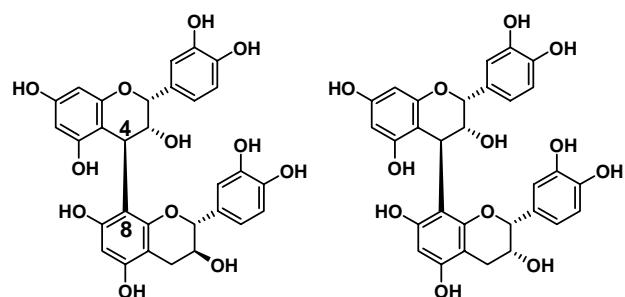
Ahora es posible describir en términos amplios la naturaleza de los polifenoles vegetales. Son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en varios sectores del reino de las plantas superiores, especialmente en las familias Leguminosae^[2, 3], Rosaceae^[4, 5], Polygonaceae^[6], Fagaceae^[7], Rhyzophoraceae, Myrtaceae^[8] y Melastomataceae^[9, 10]. Se distinguen por las siguientes cinco características generales: a) solubilidad en agua, b) masa molecular entre 500 y 3000^[11]-5000^[9], c) estructura y carácter polifenólico (12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa), d) complejación intermolecular (astringencia) y e) características estructurales (dos motivos estructurales mayores, proantocianidinas o taninos condensados y taninos hidrolizables, mas un tercer grupo minoritario, los florotaninos).

Los tres grupos estructurales se producen por tres vías biosintéticas diferentes. Los taninos hidrolizables se producen por una derivación de la vía del ácido shikímico que conduce a la producción de ácido gálico^[11]

(unidad monomérica fundamental), los florotaninos derivan por la vía de la malonilCoA que produce el bloque de construcción floroglucinol^[12]; mientras los taninos condensados derivan por biosíntesis mixta de las dos rutas anteriores que producen flavan-3,4-dioles (unidades monoméricas) que luego polimerizan por condensación^[13, 14].

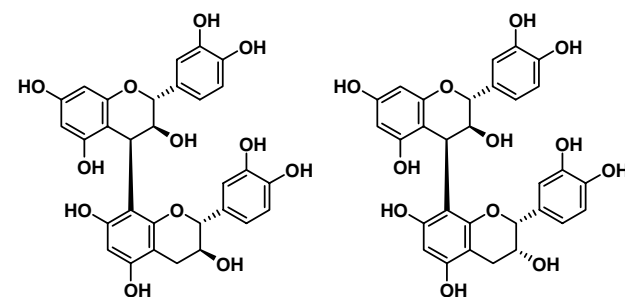
PROANTOCIANIDINAS O TANINOS CONDENSADOS

También denominadas inicialmente leucoantocianinas, existen como oligómeros solubles, con 2 a 6 núcleos fenólicos flavan-3-ol (Catequina, epicatequina, epigallocatequina o epigallocatequina 3-O-galato), o como polímeros insolubles. Las unidades flavan-3-ol se polimerizan por enlaces carbono-carbono entre las posiciones 4→8 o 4→6, vía sustitución aromática electrofílica de carbocationes flavan-4-il (o sus equivalentes), derivados de flavan-4-oles y/o flavan-3,4-dioles, y los centros nucleofílicos de los anillos A oxigenados de nucleófilos flavan-3-oles^[15]. Los progresos reales y sustanciales en química de las proantocianidinas comenzaron en los años 60, siguiendo los trabajos pioneros de Klaus Weinges^[16, 17] y colaboradores en Heidelberg. Este grupo fue el primero en aislar y caracterizar plenamente las cuatro procianidinas dímeras principales (B-1, B-2, B-3 y B-4) como sus peracetatos.



Procianidina B-1

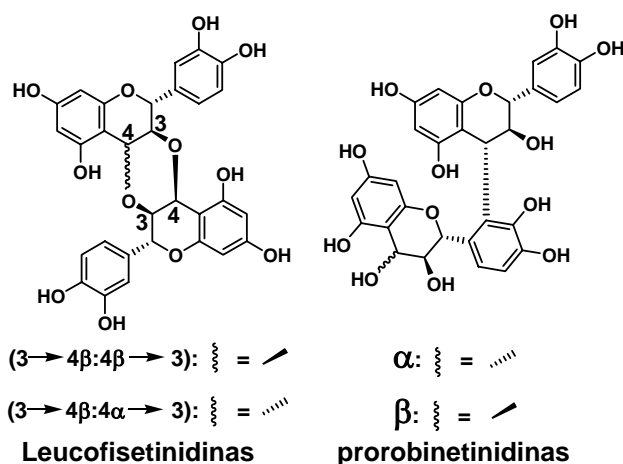
Procianidina B-2



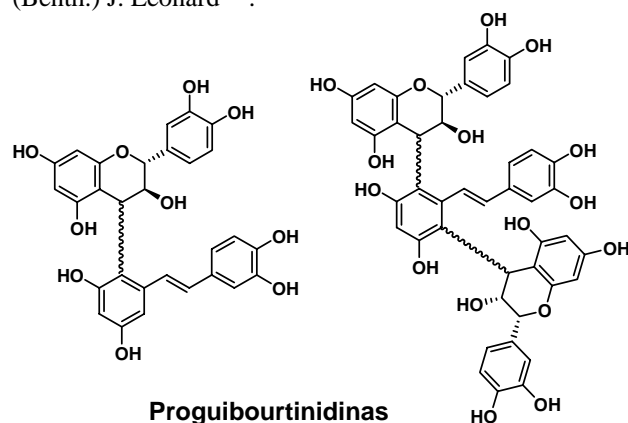
Procianidina B-3

Procianidina B-4

También se han aislado trímeros y con grados mayores de polimerización, hasta nueve como en el caso de *Arabidopsis thaliana*^[18]. A pesar del predominio de las uniones C-C (4→8 y 4→6), se ha demostrado también



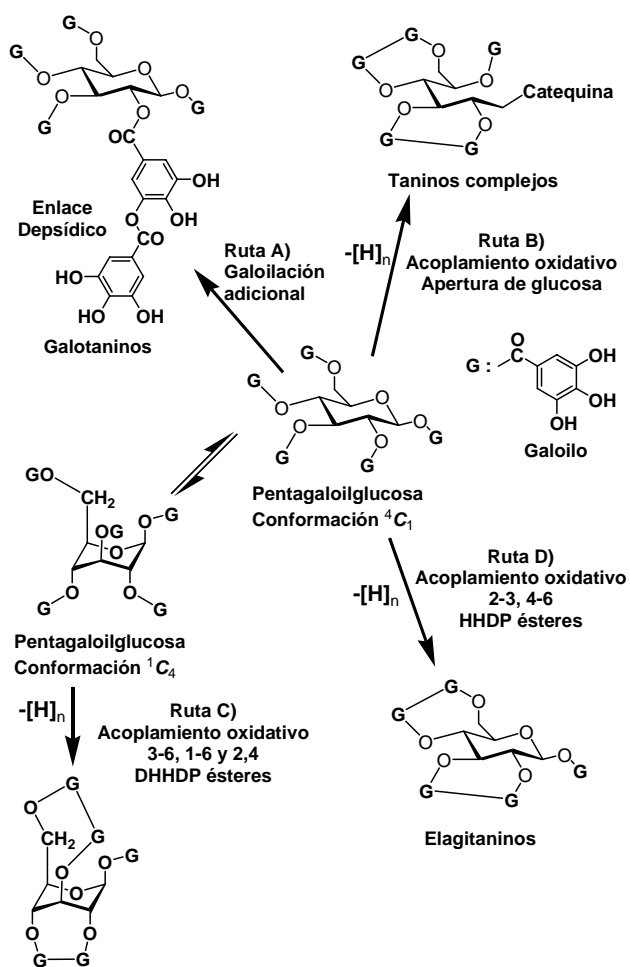
una diversidad de uniones, con la participación de centros nucleófilos alternativos, que han conducido a dímeros con uniones dioxano, como las leucofisetinidinas epímeras (3→4β:4β→3) y (3→4β:4α→3) aisladas de *Acacia mearnsii* De Wild, a enlaces C-4→C-2' como en los prorobinetinidinas α- y β- aislados de *Robinia pseudacacia* L., o a unidades de estilbeno terminales o intermedias como en el caso de las proguibourtinidinas dímeras y trímeras aislada de *Guibourtia coleosperma* (Benth.) J. Léonard^[19].



TANINOS HIDROLIZABLES O PIROGÁLICOS.

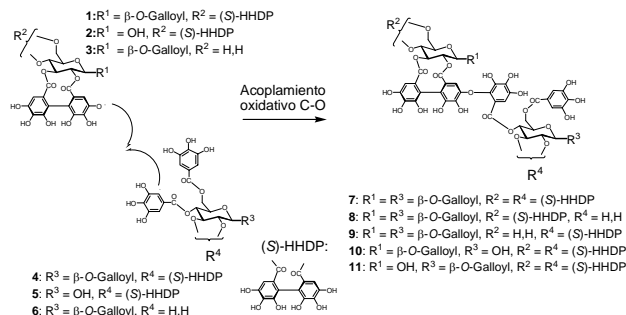
Este grupo ha tenido un espectacular avance en química y bioquímica desde 1989 con los trabajos de los grupos de Haslam, Okuda y Yoshida, de manera que hoy se han elucidado las estructuras de más de 750 nuevos taninos hidrolizables. Todos ellos son ésteres de ácidos fenólicos (ácido gálico y elágico) con un azúcar (generalmente glucosa) o un polialcohol^[20]. Todos ellos derivan su parte fenólica por la vía shikímica a partir de la forma enol del ácido 3-dehidroshikímico, el cual se transforma en el precursor, ácido gálico, por acción de la enzima dehidroshikimato deshidrogenada^[11]. La porción de glucosa la proporciona el UDP-glucosa para producir la primera esterificación sobre el carbono anomérico que produce el donador de acilo, -glucogalin; el cual conduce secuencialmente a las 1,6-di-, 1,2,6-tri-, 1,2,3,6-tetra- y 1,2,3,4,6-pentagalactoglucosas^[21-23], en su conformación más estable ⁴C₁, conformando el subgrupo

de los ésteres simples. A partir de éstos, se derivan tanto los gallotaninos como los elagitaninos, mediante cuatro rutas biogénicas principales: A) Galoílaciones adicionales hasta 10 u 11 resíduos galoílo, que producen los galotaninos o ácido tánico, caracterizados por la presencia de uno o más enlaces *m*-digaloil depsídicos, como se ilustra en la estructura hexagaloilglucosa, 2-*O*-digaloil-1,3,4,6-tetra-*O*-galol- β -D-glucopiranosas; B) Acoplamiento oxidativo con apertura de la glucosa y condensación con flavan-3-oles, para dar los taninos complejos, seguida de acoplamiento oxidativo para dar los ésteres DHHDP de 1C_4 glucopiranosas y D) Acoplamiento oxidativo C-C para producir los éteres HHDP de 4C_1 glucopiranosas, seguido de acoplamiento oxidativo C-O que produce los elagitaninos oligoméricos^[24, 25].

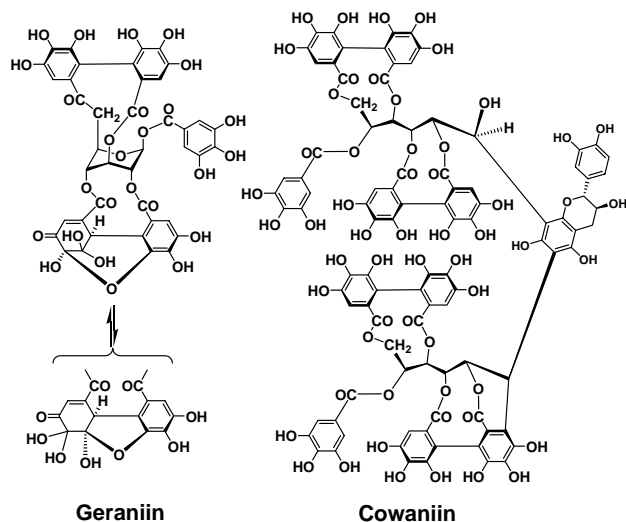


La ruta D, por acoplamiento oxidativo C-C de dos unidades galoilo vecinas, se producen las unidades hexahidroxidifenilo (HHDP) entre las posiciones 2-3 y/o 4-6 para producir las dos familias de elagitaninos monoméricos, la del casuarictin (1), pedunculagin (2), strictinin (3) e isostrictinin y de otra parte la del pterocaryanin (4), praecoxin (5) y 1,4,6-trigaloil- β -D-glucopiranosas (6)^[26]. Por acoplamiento oxidativo C-O entre monómeros alternativos de cada familia, se

producen los elagitaninos oligoméricos dimeros, nobotanan B (7), G (8), O (9)^[26, 27], malabatin C (10)^[28] y nobotanan H (11) junto con otros di- a tetrameros, nobotananos A-W^[10] y la nueva serie de pentámeros, melastoflorinos A-D^[9], cuya masa molecular relativa alcanza los 4526 Da. En todos estos la conformación de la glucosa es la más estable 4C_1 .



El otro gran grupo lo constituyen los elagitaninos con conformación 1C_4 , los cuales han sufrido oxidaciones adicionales en los grupos HHDP, como en geraniin y sus congéneres^[29] aislados de *Geranium thunbergii*. Otro grupo importante es el de los taninos complejos, elagitaninos basados en glucosa de cadena abierta, enlazados con catequina u otro flavan-3-ol a través de enlace C-C, como en el dímero cowaniin, aislado recientemente de hojas y tallos de *Cowania mexicana* (Rosaceae)^[30].

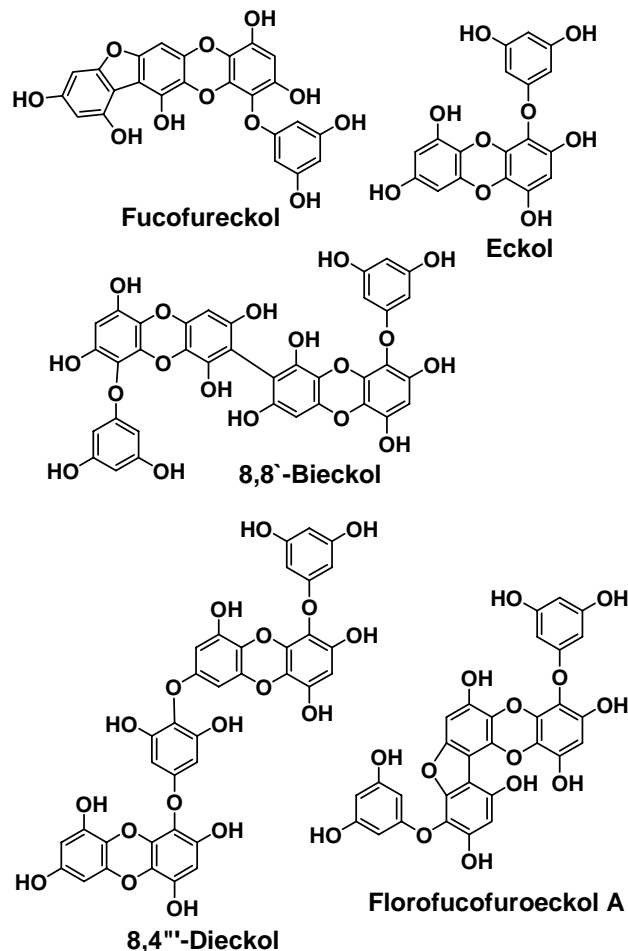


Los ésteres de ácido caféico con ácido quínico, ácidos clorogénicos, son tratados como taninos hidrolizables y algunos los llaman cafetaninos.

FLOROTANINOS

Recientemente se han descubierto nuevos polifenoles aislados de varias especies de algas pardas de los géneros *Ecklonia* y *Eisenia*^[31], *Palmaria*, *Laminaria*, *Macrocystis*, *Nereocystis*^[32], *Sargassum*^[33], *Fucus*^[34], *Cystophora*^[35], *Carpophyllum*^[36], cuyas estructuras están constituidas por unidades floroglucinol ligadas por

enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno. A este grupo de compuestos se les conoce como florotaninos caracterizados por el esqueleto dibenzo-1,4-dioxina^[31]. Ejemplos de ellos son el fucofurecktol, obtenido de *Eisenia arborea*^[1], eckol, 8,8'-bieckol, 8,4'''-dieckol y florofucufureckol A, aislados de *Ecklonia cava*^[37].



ANÁLISIS ESTRUCTURAL

Por su carácter polar, los polifenoles se han extraído generalmente con mezclas de alcoholes con agua en diversas proporciones. Sin embargo, la mezcla más frecuentemente usada es acetona-agua (70:30)^[10, 38, 39] y en nuestro grupo se ha cambiado por isopropanol-agua (65:35) utilizando ultrasonido en cuatro extracciones. Después de eliminar el solvente orgánico por destilación a presión reducida, es costumbre hacer partición líquido-líquido de la fase acuosa en la secuencia, éter etílico o diclorometano, acetato de etilo (EtOAc) y *n*-butanol (*n*-BuOH). Las fracciones en EtOAc, *n*-BuOH y acuosa se someten primero a cromatografía en columna sobre DIAION HP-20 con gradiente agua-MeOH (100:0 a 30:70), luego se hace separación de las fracciones sobre Toyopearl HW-40C y la purificación final sobre MCI-Gel CHP-20 y/o ODS. Cada etapa de separación se monitorea por espectrofotometría UV (280 nm) y por

HPLC-DAD. Las fracciones con perfiles cromatográficos similares se juntan y se someten a la siguiente etapa^[40, 41].

La caracterización y elucidación estructural empieza con el ángulo de rotación óptica específica ($c=1\%$), los espectros UV ($c=0.001\%$) y dicroísmo circular ($c=0.01\%$). Éste último es necesario para determinar la configuración (*R*) o (*S*) de las unidades quirales HHDP y valoneoilo, ya que los polifenoles no cristalizan para determinarla por difracción de rayos X. El único tanino que se ha logrado cristalizar es el geranín.

Los espectros de masas se han medido por HPLC-MS, utilizando técnicas de ionización suaves como FAB, MALDI y ESI con analizador de tiempo de vuelo (TOF). En ESI, se usa una solución de acetato de amonio al 1% en MeOH 50%. La relación MeOH:agua puede variarse para favorecer la formación de entidades doblemente cargadas $[M+2NH_4]^{2+}$ para aquellos taninos de mayor masa molecular como los melastoflorinos A-D^[9]. Varios florotaninos han sido identificados como sus peracetatos^[36, 42].

La técnica más ampliamente usada es la resonancia magnética nuclear 1D (¹H-NMR, ¹³C-NMR) y experimentos bidimensionales, generalmente disolviendo la muestra en acetona-*d*₆ con dos gotas de D₂O para intercambiar los protones fenólicos. Así, se pueden contar los protones aromáticos y saber cuantos grupos galoilo, HHDP y valoneoilo tiene la molécula. En la región alifática, la primera señal que se busca es el doblete del protón anomérico. Las demás señales del azúcar se asignan por combinación de los experimentos ¹H-¹H COSY y TOCSY. En algunos casos se hace necesario corroborar con *J*-resolv. El espectro de carbono 13 permite contar los grupos carbonilo de los ésteres par confirmar el número de sistemas aromáticos. En la región de los carbonos fenoxi-, se diferencian los que intervienen en enlace éter separados de los demás a ~146 ppm. Los carbonos anoméricos de los azúcares dan una idea de la sustitución en 2 y 3. La asignación total de las señales se realiza por combinación de los experimentos HMQC o HSQC y HMBC. Este último permite la asignación inequívoca de los carbonos carbonilo por las correlaciones a tres enlaces observadas desde el protón del azúcar y el protón aromático^[20, 43, 44].

Aplicaciones de los polifenoles vegetales

Los polifenoles o taninos han acompañado la vida humana desde sus comienzos, como componentes comunes e inevitables en alimentos y bebidas de origen vegetal, a los cuales contribuyen en el sabor y palatabilidad por su astringencia. En la industria marroquinera todavía se usan taninos de castaño (*Castanea sativa* L.) de roble (*Quercus robur* L.), quebracho (*Schinopsis* spp), zumaqués (*Rhus* spp.), acacias (*Cassia* spp.), dividivi y tara (*Caesalpinia* spp.), algarrobilla (*Balsamocarpon* sp.) y mirobalanos (*Terminalia* spp.). El curtido consiste en el establecimiento de enlaces entre las fibras de colágeno de

la piel, lo que le confiere resistencia al agua, calor y abrasión. Esta capacidad de complejarse con macromoléculas explica la astringencia, al precipitar las glicoproteínas ricas en prolina que contiene la saliva. Los taninos vegetales se usan también en la producción de colorantes y tintas o como tratamiento versátil en medicina tradicional, particularmente en el este de Asia^[45]. Otras aplicaciones se dan en la industrias del vino y la cerveza, te y cacao. En farmacia solo se cuenta con antidiarreicos, a pesar de las notables actividades como antioxidantes^{[31, 46] [33]}, y otras actividades biológicas como antitumorales, antibacteriales^{[47, 48] [43, 49] [50]}, antivirales^[37] e inhibidores de enzimas, agentes hepatoprotectores^[51], receptor de angiotensina II AT I^[52], inhibición de peroxidación lipídica^[53], vasodilatación dependiente de óxido nítrico^[54]

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Haslam, E., *Practical Polyphenols: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. 1998, Cambridge: Cambridge University Press, .
- [2] Kandil, F.e., *et al.*, (1999). *Phenolics and flavonoids from Haematoxylon campechianum*. *Phytochemistry*, **51**(1): 133-134.
- [3] Harborne, J.B., (1997). *Chemotaxonomie der pflanzen. volume XIb-1, Leguminosae, Part 2 : by and , Birkhauser, Basle, 1996, 512 pp., [pound sign]244. ISBN 3-7643-5165-9*. *Phytochemistry*, **44**(8): 1596-1454.
- [4] Oszmianski, J., *et al.*, (2007). *Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots*. *Food Chemistry*, **100**(2): 579-583.
- [5] Vrhovsek, U., *et al.*, (2006). *Concentration and mean degree of polymerization of Rubus ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis*. *J Agric Food Chem*, **54**(12): 4469-4475.
- [6] Balza, F., *et al.*, (1989). *Identification of proanthocyanidin polymers as the piscicidal constituents of Mammea siamensis, Polygonum stagninum and Diospyros diepenhorstii*. *Phytochemistry*, **28**(7): 1827-1830.
- [7] Meyers, K.J., Swiecki, T.J., and Mitchell, A.E., (2006). *Understanding the native Californian diet: Identification of condensed and hydrolyzable tannins in tanoak acorns (Lithocarpus densiflorus)*. *J Agric Food Chem*, **54**(20): 7686-7691.
- [8] Okuda, T., *et al.*, (1980). *Ellagitannins of the casuarinaceae, stachyuraceae and myrtaceae*. *Phytochemistry*, **21**(12): 2871-2874.
- [9] Yoshida, T., Ito, H., and Isaza Martínez, J.H., (2005). *Pentameric ellagitannin oligomers in melastomataceous plants--chemotaxonomic significance*. *Phytochemistry*, **66**(17): 1972-1983.
- [10] Isaza, J.H., Ito, H., and Yoshida, T., (2004). *Oligomeric hydrolyzable tannins from Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry*, **65**(3): 359-367.
- [11] Ossipov, V., *et al.*, (2003). *Gallic acid and hydrolyzable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**(1): 3-16.
- [12] Samappito, S., *et al.*, (2002). *Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from Cassia alata*. *Planta*, **216**(1): 64-71.
- [13] Xie, D.-Y. and Dixon, R.A., (2005). *Proanthocyanidin biosynthesis - still more questions than answers?* *Phytochemistry*, **66**(18): 2127-2144.
- [14] Stafford, H.A., (1983). *Enzymic regulation of procyanidin biosynthesis; lack of a flav-3-en-3-ol intermediate*. *Phytochemistry*, **22**(12): 2643-2646.
- [15] Ferreira, D., Marais, J.P.J., and Slade, D., (2005). *Heterogeneity of the interflavanyl bond in proanthocyanidins from natural sources lacking C-4 (C-ring) deoxy flavonoid nucleophiles*. *Phytochemistry*, **66**(18): 2216-2237.
- [16] Weinges, K. and Schick, H., (1995). *Dodecaacetylprodelfphinidin B3 from the dried leaves of Ziziphus spina-christi*. *Phytochemistry*, **38**(2): 505-507.
- [17] Weinges, K., (1964). *The occurrence of catechins in fruits*. *Phytochemistry*, **3**(2): 263-266.
- [18] Routaboul, J.M., *et al.*, (2006). *Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **224**(1): 96-107.
- [19] Ferreira, D., Marais, J.P., and Slade, D., (2005). *Heterogeneity of the interflavanyl bond in proanthocyanidins from natural sources lacking C-4 (C-ring) deoxy flavonoid nucleophiles*. *Phytochemistry*, **66**(18): 2216-2237.
- [20] Okuda, T., Yoshida, T., and Hatano, T., (1995). *Hydrolyzable tannins and related polyphenols*. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Progress in the chemistry of organic natural products*, **66**: 1-117.
- [21] Gross, G.G., (1983). *Partial purification and properties of UDP-glucose:vanillate 1-O-glucosyl transferase from oak leaves*. *Phytochemistry*, **22**(10): 2179-2182.
- [22] Hagenah, S. and Gross, G.G., (1993). *Biosynthesis of 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-[beta]-D-glucose*. *Phytochemistry*, **32**(3): 637-641.
- [23] Niemetz, R. and Gross, G.G., (1998). *Gallotannin biosynthesis: purification of [beta]-glucogallin: 1,2,3,4,6-pentagalloyl-[beta]-D-glucose galloyltransferase from sumac leaves* *In honour of professor G. H. Neil Towers 75th birthday*. *Phytochemistry*, **49**(2): 327-332.
- [24] Niemetz, R. and Gross, G.G., (2005). *Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis*. *Phytochemistry*, **66**(17): 2001-2011.
- [25] Grundhofer, P., *et al.*, (2001). *Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins*. *Phytochemistry*, **57**(6): 915-927.
- [26] Yoshida, T., *et al.*, (1999). *Oligomeric hydrolyzable tannins from Tibouchina multiflora*. *Phytochemistry*, **52**(8): 1661-1666.

- [27] Yoshida, T., *et al.*, (1989). *Camelliin B and nobotanin I, macrocyclic ellagitannin dimers and related dimers, and their antitumor activity*. Chemical & pharmaceutical bulletin, **37**(11): 3174-3176.
- [28] Yoshida, T., *et al.*, (1992). *Dimeric hydrolysable tannins from melastoma Malabathricum*. Phytochemistry, **31**(8): 2829-2833.
- [29] Okuda, T., *et al.*, (1979). *[Isolation of geraniin from plants of Geranium and Euphorbiaceae (author's transl)]*. Yakugaku Zasshi, **99**(5): 543-545.
- [30] Ito, H., *et al.*, (2007). *Cowanin, a C-glucosidic ellagitannin dimer linked through catechin from Cowania mexicana*. Chemical & pharmaceutical bulletin, **55**(3): 492-494.
- [31] Shin, H.C., *et al.*, (2006). *An antioxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from Ecklonia cava*. Archives of pharmacal research, **29**(2): 165-171.
- [32] Yuan, Y.V. and Walsh, N.A., (2006). *Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds*. Food and Chemical Toxicology, **44**(7): 1144-1150.
- [33] Nakai, M., *et al.*, (2006). *Phlorotannins as radical scavengers from the extract of Sargassum ringgoldianum*. Marine biotechnology (New York, N.Y., **8**(4): 409-414.
- [34] Koivikko, R., *et al.*, (2005). *Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga Fucus vesiculosus, with implications on their ecological functions*. Journal of chemical ecology, **31**(1): 195-212.
- [35] Glombitza, K.-W. and Hauperich, S., (1997). *Phlorotannins from the brown alga Cystophora torulosa*. Phytochemistry, **46**(4): 735-740.
- [36] Li, S.-M. and Glombitza, K.-W., (1991). *Carmalols and phlorethofuhalols from the brown alga Carpophyllum maschalocarpum*. Phytochemistry, **30**(10): 3417-3421.
- [37] Ahn, M.J., *et al.*, (2004). *Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga Ecklonia cava*. Biological & pharmaceutical bulletin, **27**(4): 544-547.
- [38] Maksimovic, Z., Malencic, D., and Kovacevic, N., (2005). *Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts*. Bioresource technology, **96**(8): 873-877.
- [39] Sivakumaran, S., *et al.*, (2006). *Variation of proanthocyanidins in Lotus species*. Journal of chemical ecology, **32**(8): 1797-1816.
- [40] Seeram, N., *et al.*, (2005). *Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry*. Separation and Purification Technology, **41**(1): 49-55.
- [41] Fan, P.H. and Lou, H.X., (2004). *[Isolation and structure identification of grape seed polyphenols and its effects on oxidative damage to cellular DNA]*. Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica, **39**(11): 869-875.
- [42] Koch, M. and Gregson, R.P., (1984). *Brominated phlorethols and nonhalogenated phlorotannins from the brown alga Cystophora congesta*. Phytochemistry, **23**(11): 2633-2637.
- [43] Yoshida, T., Hatano, T., and Ito, H., (2000). *Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights*. BioFactors (Oxford, England), **13**(1-4): 121-125.
- [44] Natsume, M., *et al.*, (2000). *Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, **64**(12): 2581-2587.
- [45] Haslam, E., (1996). *Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action*. Journal of natural products, **59**(2): 205-215.
- [46] Kang, H.S., *et al.*, (2003). *A new phlorotannin from the brown alga Ecklonia stolonifera*. Chemical & pharmaceutical bulletin, **51**(8): 1012-1014.
- [47] Machado, T.B., *et al.*, (2003). *In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. International journal of antimicrobial agents, **21**(3): 279-284.
- [48] Nagayama, K., *et al.*, (2003). *Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga Ecklonia kurome on red tide microalgae*. Aquaculture, **218**(1-4): 601-611.
- [49] Nishizawa, K., *et al.*, (1990). *Some biologically active tannins of Nuphar variegatum*. Phytochemistry, **29**(8): 2491-2494.
- [50] Hatano, T., *et al.*, (2005). *Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Phytochemistry, **66**(17): 2047-2055.
- [51] Kim, Y.C., *et al.*, (2005). *Hepatoprotective constituents of the edible brown alga Ecklonia stolonifera on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells*. Archives of pharmacal research, **28**(12): 1376-1380.
- [52] Caballero-George, C., *et al.*, (2002). *In vitro inhibition of [3H]-angiotensin II binding on the human ATI receptor by proanthocyanidins from Guazuma ulmifolia bark*. Planta medica, **68**(12): 1066-1071.
- [53] Okuda, T., (2005). *Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants*. Phytochemistry, **66**(17): 2012-2031.
- [54] Fumagalli, F., *et al.*, (2006). *From field to health: a simple way to increase the nutraceutical content of grape as shown by NO-dependent vascular relaxation*. J Agric Food Chem, **54**(15): 5344-5349.