

ESTIMACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE TANINOS HIDROLIZABLES Y CONDENSADOS EN PLANTAS MELASTOMATÁCEAS

RESUMEN

En la búsqueda de técnicas analíticas sencillas para la caracterización de materiales vegetales ricos en polifenoles, se estandarizó una técnica para estimación espectrofotométrica de taninos hidrolizables y taninos condensados. La técnica se aplicó al análisis de las hojas de 14 especies de plantas melastomatáceas. Las hojas secas y molidas se extrajeron con *i*-PrOH-Agua (65:35) para luego ser hidrolizadas en una mezcla *i*-PrOH-HCl (65:35). Los taninos condensados se cuantificaron por interpolación en una curva de calibración de malvidín y los hidrolizables en una curva de calibración con ácido elágico. De las 14 especies estudiadas, 7 contienen taninos hidrolizables (TH), 4 contienen taninos condensados (TC) y 2 contienen los dos tipos de taninos.

PALABRAS CLAVES Melastomataceae, taninos hidrolizables, taninos condensados, malvidín, espectrofotometría, ácido elágico.

ABSTRACT

Searching for simple analytical techniques to characterize polyphenol rich vegetable materials, a technique was standardized for spectrophotometric estimation of hydrolysable and condensed tannins. The technique was applied to the analysis of leaves of 14 species of melastomataceous plants. Dried and milled leaves were extracted with *i*-PrOH-Water (65:35) to be next hydrolysed in *i*-PrOH-HCl (65:35) mix. Condensed tannins were quantified by interpolation in a calibration curve of malvidin and hydrolysable tannins in a calibration curve with ellagic acid. Among the 14 studied species, 7 contain hydrolysable tannins (HT), 4 contain condensed tannins (CT) and 2 contain both types of tannins.

KEYWORDS: *Melastomataceae, hydrolysable tannins, condensed tannins, Malvidin, spectrophotometry, ellagic acid.*

1. INTRODUCCIÓN

Entre las más de 4500 especies de plantas melastomatáceas, agrupadas en nueve tribus [1], solo se han estudiado, desde el punto de vista fitoquímico, unas pocas pertenecientes a las tribus melastomeae [2] y miconieae [3]. Los principales metabolitos secundarios reportados para estas especies son de tipo fenólico como flavonoides glicosilados [4-6] y polifenólico como taninos hidrolizables [7]. Estos compuestos presentan una variedad de actividades biológicas tales como antioxidante [8], antibacterial [9], inhibitoria de enzimas [10], antitumoral [11] y antiviral [12]. En nutrición animal se han reportado algunos efectos antinutricionales de los taninos [13, 14], debido a sus características astringentes, lo cual causa mal sabor y la consiguiente disminución en el consumo de alimentos [15]; además, la propiedad de complejar las proteínas disminuye el rendimiento en la conversión del alimento ingerido en carne. No deben eliminarse completamente de la dieta, sino balancearse para disminuir los efectos negativos, mientras se mantienen los efectos favorables para el tracto digestivo. En este aspecto es esencial la cuantificación de fenoles totales y la discriminación de

JOSÉ HIPÓLITO ISAZA M.

Ph.D. Profesor asociado, Grupo Polifenoles UTP, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira.
jhim@utp.edu.co

LUZ ANGELA VELOZA C.

Ph.D. Profesor asistente, Grupo Polifenoles UTP, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira.
lveloza@utp.edu.co

LUZ STELLA RAMIREZ A.

Ph.D. Profesor asistente, Grupo Polifenoles UTP, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira.
luramire@utp.edu.co

CARLOS ALBERTO GUEVARA

Químico. Profesor ocasional. Grupo Polifenoles UTP, Escuela de Química Universidad Tecnológica de Pereira.
carlosguevara@utp.edu.co

taninos hidrolizables y condensados en materias primas para la industria de la nutrición animal.

La cuantificación de taninos hidrolizables por métodos colorimétricos se ha basado en la reacción del ácido elágico liberado en la hidrólisis con nitrito de sodio y ácido acético para formar la quinona oxima de color rosado; sin embargo, la reacción presenta muchas limitaciones técnicas debido a la dependencia estricta del tiempo de reacción y el uso de nitrógeno gaseoso para evitar la oxidación [17]. Por esta razón, se optó por la determinación directa del ácido elágico (A.E.) liberado (Figura 1) a 362 nm.

En un reporte previo, se presentó la determinación espectrofotométrica de fenoles totales en algunas especies de la familia melastomataceae [17]; en esta ocasión, se reporta la estandarización de dos técnicas espectrofotométricas para la estimación de taninos hidrolizables mediante la cuantificación directa de ácido elágico (Figura 1) y de taninos condensados mediante la determinación de antocianidinas liberadas (Figura 2) por hidrólisis ácida. También se reporta la aplicación de estas dos técnicas al análisis de extractos de plantas

melastomataceas utilizando un solo procedimiento de preparación de muestra.

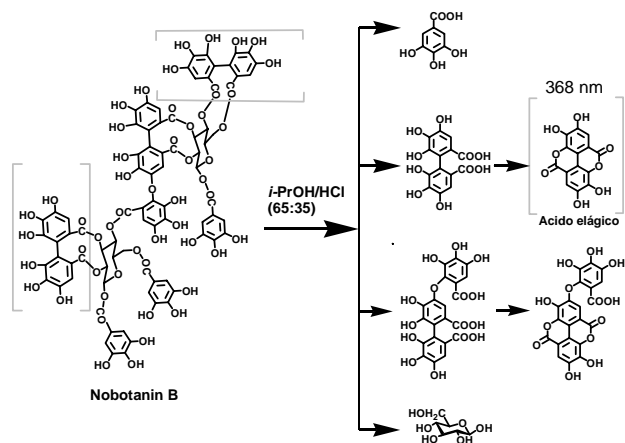


Figura 1. Hidrólisis ácida de Nobotanin B

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Instrumentación General

Los espectros ultravioleta visible se midieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 Pharmaspec de doble haz, en el rango de 250 a 600 nm.

2.2. Reactivos

HCl 37% (Carlo Erba), H₂SO₄ 98% (EM Science), Isopropanol grado analítico (EM Science), Metanol 99,8% grado analítico (EMD), Acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific), Acido Elágico 95% (Sigma), Malvidín 3-(6-*p*-coumaril-D-glucosido)-5-(2-acetilxilosido) TFA SAL, previamente aislado en este laboratorio de flores de *Tibouchina multiflora*.

2.1. Material vegetal

Las especies *Miconia trinervia* (sw), *Miconia prasina* (sw), *Miconia dolichorrhyncha* Naud, *M. minutiflora* (Bonpl) DC, fueron colectadas y determinadas por la Dra. Luz Mila Quiñones de la Universidad de la Llanos orientales (Villavicencio). *Tibouchina ciliaris*, *Tibouchina multiflora*, *Henriettella trachyphylla* Triana, colectadas en la vía Pereira- Armenia, vereda Laguneta y determinadas por los Drs. Frank Almeda de la Academia de Ciencias de California y Susanne Renner del Jardín Botánico de Missouri. *Miconia coronata* (Bonpl) D.C., *Miconia aeruginosa* Naud, colectadas en la vereda La Bananera a orillas del río Otún y clasificadas por el Dr. Carlos Parra del Herbario Nacional de Colombia. *Tococa guianensis*, *Bellucia grossularioides*, *B. pentamera*, *Aciotis purpuracens*, fueron suministradas por Fundacofán-Cenivan. Estas muestras se secaron al

ambiente por 15 días en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira, se molieron en molino de cuchillas y se almacenaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente para su posterior utilización.

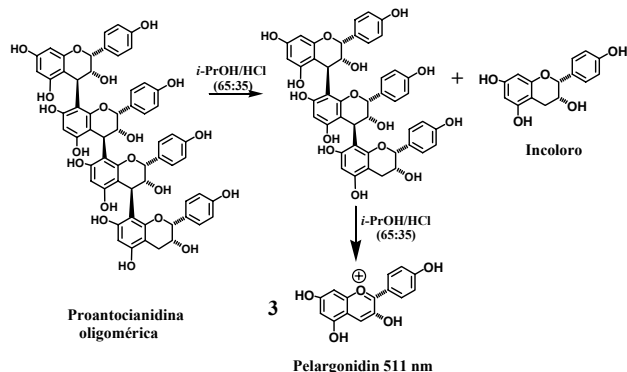


Figura 2. Hidrólisis ácida de un tetramero de pelargonidin.

2.3. Preparación de los extractos

Para todos los propósitos de éste trabajo se hicieron cuatro réplicas de cada muestra. Aproximadamente 0,5 ± 0,002 g de las hojas secas y molidas de catorce especies se extrajeron con 3 porciones sucesivas de 20 mL de *i*-PrOH-agua (65:35), en un agitador orbital a 250 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Se unieron los tres extractos, se aforaron hasta 100 mL con *i*-PrOH-Agua 63:35 y se almacenaron en frascos herméticamente cerrados a 4 °C.

2.4. Análisis cualitativo

La presencia de taninos hidrolizables se detectó mediante la reacción producida entre A.E. y el Nitrito de Sodio en medio ligeramente ácido (ácido acético) que conduce a una coloración rojiza, producida por la nitrosación de los anillos aromáticos de AE [16]. La presencia de taninos condensados en los extractos, fue determinada por la aparición del color rojo intenso característico de antocianidinas y producidas por la despolimerización de proantocianidinas en medio ácido, en presencia de *n*-BuOH y calentamiento [18].

2.5. Optimización de las condiciones de hidrólisis

2.5.1. Hidrólisis de taninos condensados

Se utilizó como modelo un extracto seco de *M. coronata* (100 ppm) disuelto en *i*-PrOH-Agua 65:35. Para seleccionar la mezcla de reacción se realizaron los siguientes tres experimentos: a) 1 mL de solución de extracto seco de *Miconia coronata* a 100 ppm, 5,8 mL de la mezcla de *i*-PrOH/HCl 65:35 y 0,2 mL de solución de Fe₂SO₄ 2% (w/v) como catalizador, se colocaron en un vial de reacción y se calentaron a 90 °C, b) Similar al

anterior, pero sin Fe_2SO_4 , c) Similar al primer procedimiento pero utilizando 6 mL de la mezcla *n*-BuOH/HCl (95:5). Los procedimientos se realizaron en periodos de 45, 90 y 120 minutos. Finalmente se tomaron espectros UV-vis y se midió la absorbancia a 524 nm.

Las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de ácido se optimizaron con la mezcla de reacción (b) de la siguiente manera: temperatura 60, 70, 80, 90 °C. El tiempo de reacción (0, 15, 30, 60, 150, 210, 270 min) y la concentración final de HCl 2, 3 y 4 N.

2.5.2. Hidrólisis de taninos hidrolizables

Se utilizó una fracción del extracto seco de *T. ciliaris* (130 ppm) en *i*-PrOH-HCl 65:35. Esta fracción se reconoció rica en taninos hidrolizables por su prueba positiva en la reacción con nitrito de sodio y ácido acético. Se mezcló 1 mL de la solución anterior con 1,05 mL de HCl 12 N y 0,95 mL *i*-propanol, (concentración final de HCl 4 N), se calentó durante 150 minutos y se midió el espectro UV-vis. Como blanco se utilizó *i*-PrOH-HCl 65:35. Se optimizaron las condiciones de Temperatura (60, 70, 80, 90 °C), Tiempo de hidrólisis (0, 15, 30, 60, 150, 210, 270 min) y la concentración de ácido clorhídrico (2, 3 y 4 N).

2.6. Análisis cuantitativo de taninos condensados

Como estándar para taninos condensados se utilizó una solución stock de malvidín (52 ppm) preparada de la siguiente manera: 10 mL de una solución de trifluoroacetato de malvidín 3-(6-*p*-coumaril-D-glucosido)-5-(2-acetilxilosido) a 150 ppm en *i*-PrOH/HCl 65:35 fue llevada a hidrólisis a 90 °C por 150 minutos, hasta obtener la aglicona (Malvidín), monitoreando por HPLC-DAD.

2.6.1. Curva de calibración para taninos condensados

A partir de la solución stock de malvidín se prepararon diluciones seriadas en el rango de 2.6 a 52 ppm en *i*-PrOH/HCl 65:35 y se midió la absorbancia a 543 nm para construir la curva de calibración. Se utilizó como blanco la mezcla *i*-PrOH/HCl 65:35.

2.6.2. Cuantificación de taninos condensados

Se analizaron por cuatro réplicas las seis muestras que dieron positiva la prueba cualitativa para taninos condensados. Por cada réplica, se mezcló 1 mL de la solución del extracto previamente preparado de la manera descrita en la sección 2.3, con 1,05 mL de HCl 12 N y 0,95 mL *i*-PrOH, (concentración final de HCl 4 N), se calentó durante 150 minutos para luego leer la absorbancia a la longitud de onda máxima característica de cada especie en el rango de 510 a 550 nm. Los valores se interpolaron en la curva de calibración anterior para

estimación como malvidín y estos valores se multiplicaron por un factor gravimétrico de 4/3, tomando como base una proantocianidina tetrámera, cuya hidrólisis ácida conduce a 3 moles de antocianina más 1 mol de la unidad inferior.

2.7. Análisis cuantitativo de taninos hidrolizables

Se utilizó ácido elágico 95% (Sigma) como estándar en solución stock de 1000 ppm en DMSO.

2.7.1. Curva de calibración para taninos hidrolizables

A partir de la solución stock anterior se prepararon diluciones de ácido elágico en el rango de 1 a 50 ppm en la mezcla *i*-PrOH-HCl 65:35. Se midió la absorbancia a 368 nm utilizando como blanco la mezcla de solventes.

2.7.2. Cuantificación de taninos hidrolizables

Las ocho especies que dieron positiva la prueba cualitativa para taninos hidrolizables se analizaron por cuadruplicado. Cada extracto preparado de la manera descrita en la sección 2.3 e hidrolizada de la manera descrita en la sección 2.6.2. El hidrolizado de cada especie se diluyó 1:5 o 1:10 según su concentración para localizar la absorbancia dentro del rango óptimo de trabajo a 368 nm. Para eliminar las interferencias por matriz (flavonoides y clorofilas), se utilizó como blanco el extracto original a la dilución correspondiente de cada especie (1:5 o 1:10).

Los valores se interpolaron en la curva de calibración para estimación como ácido elágico y estos valores se multiplicaron por un factor gravimétrico de 2.9 para estimación como taninos hidrolizables. Este factor se estableció tomando como base la masa molecular promedio (M_R 1867) entre casuarictin (monómero), nobotanin B (dímero) y nobotanin E (trímero). Cada uno de estos elagitaninos libera dos unidades de ácido elágico con (M_R 322). Con estos datos se calculó el factor gravimétrico según la siguiente ecuación:

$$\text{Facto Gravimétrico} = 1867 / (322 * 2) = 2,9$$

3. RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis cualitativo de los extractos permitió separar en tres grupos las 14 especies investigadas (Tabla 1). El primer grupo de 7 especies que contienen taninos hidrolizables (TH), el segundo grupo de 4 especies que contienen taninos condensados (TC) y un tercer grupo que contiene los dos tipos de taninos. El número de signos + indica la intensidad relativa de la coloración al final de la prueba y en la cual la *Tibouchina ciliaris* fue tomada como referencia, para los extractos ricos en TH y *Miconia coronata* para TC. De las catorce especies (Tabla 1). *Miconia prasina*(sw) y *Miconia trinervia*

dieron positiva la prueba para ambos tipos de polifenoles. *M. aeruginosa* resultó ser una especie con muy bajo contenido de taninos hidrolizables y ausencia de taninos condensados. En su lugar, esta especie presenta riqueza en flavonoides y otros compuestos fenólicos glicosilados, de acuerdo con su espectro UV-vis y su perfil cromatográfico por HPLC-DAD.

Estas pruebas preliminares son útiles para decidir el tipo de análisis cuantitativo que se aplicará a cada especie y así ahorrar recursos.

La figura 3 muestra que las mejores condiciones de hidrólisis para taninos condensados es la (b) (*i*-PrOH-HCl 65:35) por su simplicidad y claridad en la banda de absorción a 524 nm. Esta condición tiene la ventaja de utilizar el mismo alcohol que se usa en el proceso de preparación de los extractos.

Nombre de la Especie	Taninos hidrolizables	Taninos Condensados
<i>Tibouchina multiflora</i>	+++	-
<i>Tibouchina ciliaris 8A</i>	+++	-
<i>Tibouchina ciliaris 8B</i>	+++	-
<i>Miconia prassina</i>	+++	++
<i>Miconia dolichorryncha</i>	++	-
<i>Miconia minutiflora</i>	+++	-
<i>Miconia trinervia</i>	+++	++
<i>Miconia coronata</i>	-	+++
<i>Miconia aeruginosa</i>	+	-
<i>Bellucia grossularioides</i>	-	++
<i>Bellucia pentamera</i>	-	+
<i>Aciotis purpuracens</i>	-	++
<i>Tococa guianensis</i>	++	-
<i>Henrietella trachyphylla</i>	-	-

Tabla 1. Resultados de las pruebas cualitativas para taninos hidrolizables y condensados

3.1. Condiciones óptimas para el análisis de taninos condensados e hidrolizables

Se encontró que la temperatura de reacción de 90 °C es óptima para ambos tipos de polifenoles.

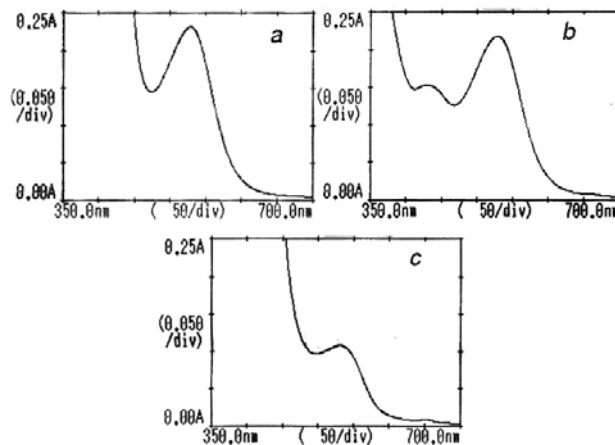


Figura 3. Comparación entre los espectros UV-vis de mezclas de reacción para taninos condensados en *M. coronata*.

A las condiciones propuestas, no se presentan diferencias de absorción entre los métodos (a) y (b), aunque se observan diferencias en los dos espectros, debidas a la complejación del Fe con los fenoles en (a). La mezcla *n*-BuOH-HCl-Fe (c) [2] es la que menor eficiencia presenta, porque no se logra homogenización del extracto con el *n*-BuOH. Como la mezcla utilizada en el método (b) es más simple, los siguientes experimentos fueron realizados a estas condiciones.

El tiempo de reacción se optimizó acorde con el estudio cinético representado en los espectros superpuestos mostrados en las figuras 4A y 4B. Aunque hay poca diferencia de absorbancia entre la hidrólisis de taninos condensados de *M. coronata* a 30 min (0.71 A) y a 150 min (0.81 A), se justifica llevar el proceso hasta este tiempo para asegurar la hidrólisis completa de los enlaces interflavano y al mismo tiempo asegurar la formación del ácido elágico en la hidrólisis de nobotanino B (Figura 4B). Es una desventaja la aparición de precipitados indeseables; sin embargo, éstos se remueven por filtración.

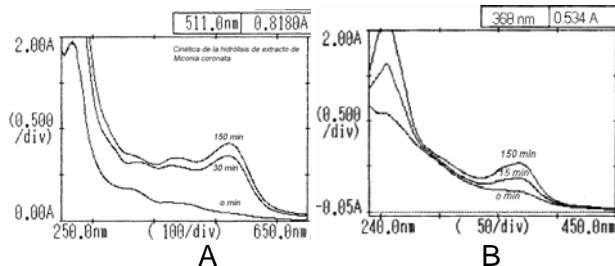


Figura 4. Espectros de los hidrolizados de taninos condensados (A) y taninos hidrolizables (B) a diferentes tiempos de reacción.

La figura 5A ilustra la curva de calibración construida con malvidin para la estimación de taninos condensados. El rango óptimo determinado por la curva de Ringbom es de 5 a 50 ppm con un coeficiente de correlación de 0.995.

La curva de calibración de ácido eláxico (Figura 5B) presenta un coeficiente de correlación de 0.996 y rango óptimo de trabajo entre 5 y 30 ppm.

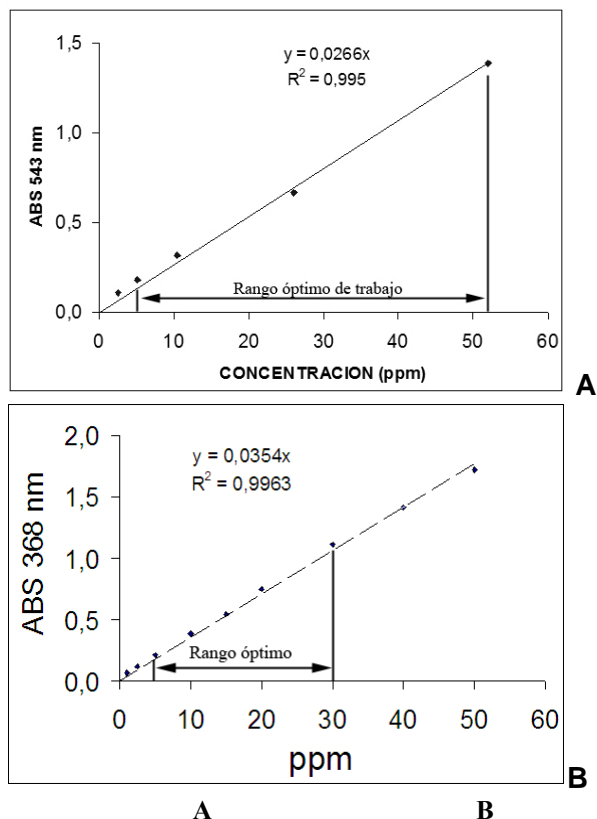


Figura 5. Curva de calibración de malvidin para estimación de taninos condensados (A) y de ácido eláxico para estimación de taninos hidrolizables (B)

Las mejores condiciones de hidrólisis fueron: temperatura 90 °C, concentración de HCl 4 N y 150 minutos para los TH y de 120 min para los TC.

3.2. Cuantificación de taninos condensados y taninos hidrolizables

Se tomaron los espectros de los extractos hidrolizados de las 14 especies a las condiciones óptimas, para determinar la longitud de onda de máxima absorción específica para la cuantificación de taninos condensados en cada extracto. Estas longitudes se resumen en la tabla 2. En el caso de los taninos hidrolizables, todas las medidas se realizaron a 368 nm.

La tabla 3 ordena las especies de plantas melastomataceas según su contenido de taninos condensados. *M. coronata* es la especie más rica en este tipo de polifenoles.

La tabla 4 muestra la estimación de taninos hidrolizables en hojas de plantas melastomataceas, donde se resaltan los máximos contenidos de elagitaninos en *Miconia*

prasina y *Tibouchina ciliaris*. En el caso de *T. ciliaris*, se nota la diferencia en dos muestras colectadas en épocas diferentes en la misma zona. Esto puede deberse a variaciones en factores climáticos durante el año y amerita una evaluación estacional.

Especie	λ_{max} nm
<i>Miconia coronata</i>	520
<i>Bellucia grossularioides</i>	536
<i>Bellucia pentamera</i>	536
<i>Miconia prasina</i> (sw)	538
<i>Miconia trinervia</i>	540
<i>Aciotis purpuracens</i>	540

Tabla 2. Longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) para la cuantificación de taninos condensados en cada extracto

Las especies *M. trinervia* y *M. prasina* contienen los dos tipos de polifenoles, pero en mayor proporción taninos hidrolizables.

Especies	% Malvidin	σ	% T.C.	σ
<i>Miconia coronata</i>	2,01	0,13	2,68	0,17
<i>Bellucia grossularioides</i>	0,72	0,16	0,96	0,21
<i>Bellucia pentamera</i>	0,4	0,08	0,53	0,11
<i>Miconia prasina</i> (sw)	0,53	0,07	0,71	0,09
<i>Miconia trinervia</i>	0,34	0,03	0,45	0,04
<i>Aciotis purpuracens</i>	0,38	0,12	0,51	0,16

Tabla 3. Porcentaje de taninos condensados estimados como malvidin y como taninos condensados en hojas secas de plantas melastomataceas.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El procedimiento estandarizado permite la cuantificación de los dos tipos de polifenoles con un solo proceso de preparación de muestra en un tiempo razonable, a bajos costos y aún en espectrofotómetros sencillos con rango espectral entre 340 y 700 nm. La utilización de *i*-PrOH en reemplazo de *n*-BuOH tiene la ventaja de servir tanto en la extracción exhaustiva de los dos tipos de polifenoles, como en la hidrólisis de los extractos para el análisis. Esta técnica será útil como criterio en la evaluación de materias primas para la formulación de piensos para alimentación animal, donde se hace necesario controlar la astringencia.

De las catorce especies estudiadas se identificaron dos, que presentan ambos tipos de taninos en concentraciones significativas.

Se hace necesario comparar y validar los resultados obtenidos, con los arrojados por otras técnicas, tales como cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) acoplado a detectores como UV-vis con arreglo de diodos.

	% A.E.	σ	% T.H.	σ
<i>Miconia minutiflora</i> (Bonpl)	2,51	0,40	7,3	1,16
<i>Miconia dolychorrhyncha</i> naud	2,97	0,49	8,6	1,42
<i>Miconia prasina</i> (sw)	5,11	0,11	14,8	0,32
<i>Miconia trinervia</i> (sw)	2,48	0,21	7,2	0,61
<i>Miconia aeruginosa</i> Naud	1,78	0,04	5,2	0,12
<i>Tibouchina ciliaris</i> 8A	4,1	0,23	11,9	0,67
<i>Tibouchina ciliaris</i> 8B	2,67	0,16	7,7	0,46
<i>Tibouchina multiflora</i>	2,47	0,22	7,2	0,64
<i>Tococa guianensis</i>	0,89	0,17	2,6	0,49

Tabla 4. Porcentaje de taninos hidrolizables estimados como ácido elágico y como taninos hidrolizables en hojas secas de plantas melastomataceas

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] CLAUSING, G. and RENNER, S. S., (2001) Molecular Phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: Implications for Character Evolution. *Am J Bot.* **88**(3):486-498.
- [2] YOSHIDA, T., ITO, H., and ISAZA M., J. H., (2005) Pentameric Ellagitannin Oligomers in Melastomataceous Plants--Chemotaxonomic Significance. *Phytochemistry.* **66**(17):1972-1983.
- [3] ISAZA, J. H., ITO, H., and YOSHIDA, T., (2004) Oligomeric Hydrolyzable Tannins from *Monochaetum Multiflorum*. *Phytochemistry.* **65**(3):359-367.
- [4] ZHANG, Z., et al., (2003) Flavanone Glycosides from *Miconia Trailii*. *J Nat Prod.* **66**(1):39-41.
- [5] LI, X. C., et al., (2001) Phenolic Compounds from *Miconia Myriantha* Inhibiting Candida Aspartic Proteases. *J Nat Prod.* **64**(10):1282-1285.
- [6] BOMFIM-PATRICIO, M. C., et al., (2001) Flavonoids of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya* (Melastomataceae) and Their Taxonomic Meaning. *Biochem Syst Ecol.* **29**(7):711-726.
- [7] YOSHIDA, T., et al., (1999) Oligomeric Hydrolysable Tannins from *Tibouchina Multiflora*. *Phytochemistry.* **52**(8):1661-1666.
- [8] MULLEN, W., et al., (2002) Ellagitannins, Flavonoids, and Other Phenolics in Red Raspberries and Their Contribution to Antioxidant Capacity and Vasorelaxation Properties. *J Agric Food Chem.* **50**(18):5191-5196.
- [9] SILVA, O., et al., (2002) In Vitro Anti-Neisseria Gonorrhoeae Activity of *Terminalia macroptera* Leaves. *FEMS Microbiol Lett.* **211**(2):203-206.
- [10] LIU, J. C., et al., (2003) Antihypertensive Effects of Tannins Isolated from Traditional Chinese Herbs as Non-Specific Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. *Life Sci.* **73**(12):1543-1555.
- [11] YOSHIDA, T., et al., (1989) Camelliin B and Nobotanin I, Macrocylic Ellagitannin Dimers and Related Dimers, and Their Antitumor Activity. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). **37**(11):3174-3176.
- [12] SAKAGAMI, H., et al., (1999) Induction of Apoptosis and Anti-Hiv Activity by Tannin- and Lignin-Related Substances. *Basic Life Sci.* **66**:595-611.
- [13] TIKKANEN, O. P. and JULKUNEN-TIITTO, R., (2003) Phenological Variation as Protection against Defoliating Insects: The Case of *Quercus robur* and *Operophtera brumata*. *Oecologia.* **136**(2):244-251.
- [14] SINGH, B. and BHAT, T. K., (2003) Potential Therapeutic Applications of Some Antinutritional Plant Secondary Metabolites. *J Agric Food Chem.* **51**(19):5579-5597.
- [15] BARAHONA, R., et al., (1997) Intake, Digestion, and Nitrogen Utilization by Sheep Fed Tropical Legumes with Contrasting Tannin Concentration and Astringency. *J Anim Sci.* **75**(6):1633-1640.
- [16] BATE-SMITH, E. C. (1972). Detection and Determination of Ellagitannins. *Phytochemistry* **11**:1153-1156.
- [17] ISAZA MARTINEZ, J.H., et al., Estimación Espectrofotométrica de Fenoles Totales en Especies de la Familia Melastomataceae. *Actualidades Biológicas*, 2005. **27**(Supl. 1):75-79.
- [18] MAKKAR, H.P.S., GAMBLE, G. and BECKER, K. (1999) Limitation of the Butanol-Hydrochloric Acid-iron Assay for Bound Condensed Tannins Food Chemistry. **66**(1):129-133.