

TANINOS

Carmen Alvarez A., Olga Lock de Ugaz*

INTRODUCCION

Es indudable la importancia que los taninos vegetales han adquirido a través de los años, conforme se ha profundizado su conocimiento y encontrado aplicaciones tan variadas.

Quizás la aplicación más antigua es en la industria del cuero, para el proceso del curtido, aprovechando su capacidad de precipitar proteínas; esta propiedad fue también aplicada a los tejidos vivos, constituyendo la base para su acción terapéutica, empleándolos en medicina en tratamientos del tracto gastrointestinal y para las escoriaciones y quemaduras de la piel. En este último caso, las proteínas forman una capa protectora antiséptica bajo la cual se regeneran los tejidos.

En los últimos años, en los que ha sido posible el aislamiento y determinación estructural de muchos de estos taninos, ha aumentado la investigación de sus actividades biológicas en base a las diferencias estructurales presentes. Dichas actividades, algunas de las cuales se mencionarán más adelante, dependen en muchos casos de los tipos de taninos y concentraciones empleadas; esto nos indica la necesidad de su identificación y análisis estructural, como paso previo a la investigación de sus posibles aplicaciones.

* PUCP, Dpto. de Ciencias, Secc. Química, Lima.

Qué entendemos por taninos?

Se denominan así a un grupo de sustancias complejas que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, en casi todas las familias.

Pueden encontrarse en todos los órganos o partes de la planta: tallos, madera, hojas, semillas y cúpulas, pero con particular abundancia en las excreciones patológicas provocadas por ciertos insectos, conocidas comúnmente con el nombre de agallas; cuando se presentan en cantidades considerables, suelen localizarse en determinadas partes, como las hojas, frutos, corteza o tallos. Es común que en las plantas herbáceas se presenten localizados en una cantidad considerable en las raíces, disminuyendo mucho la concentración cuando se trata de plantas anuales. En las plantas leñosas, tanto la localización como la abundancia son variadas [1].

Son sus principales características las siguientes:

- a) compuestos químicos no cristalizables cuyas soluciones acuosas son coloidales, de reacción ácida y sabor astringente.
- b) precipitan con gelatina, albúmina y alcaloides en solución.
- c) con las sales férricas dan coloraciones negro azuladas o verdosas.
- d) producen un color rojo intenso con ferricianuro de potasio y amoníaco.
- e) precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a la enzimas proteolíticas. Esta propiedad, denominada astringencia, fue mencionada anteriormente.

CLASIFICACION

Dado que estos compuestos se han investigado durante más de 100 años, se diseñaron diferentes clasificaciones de acuerdo con el nivel del conocimiento que de éstos se tenía en los diferentes períodos de tiempo.

La clasificación de Freudenberg, que actualmente es empleada, tiene su fundamento en el tipo de estructura base del tanino. Es así que los agrupa en dos grandes clases: taninos hidrolizables y taninos condensados [1], con las siguientes características:

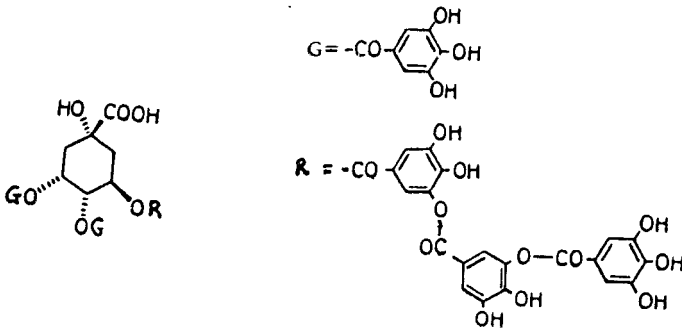
1. Taninos hidrolizables

- se hidrolizan con facilidad por la acción de los ácidos, bases o enzimas, en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del tipo de ácido que se produce por la reacción se subdividen en: galotaninos

(ácido gálico) y elagitaninos (ácido elágico o dilactona estable del ácido hexahidroxiidifénico).

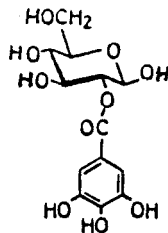
- los núcleos bencénicos están unidos por medio de átomos de oxígeno.
- dan coloración azul con FeCl_3 .
- no precipitan con soluciones de bromo.

Como ejemplos de taninos hidrolizables, del subgrupo de galotaninos, podemos mencionar al que se obtiene de los frutos de *Caesalpinia tinctoria* (nombre común "tara"). Este tanino es fácilmente hidrolizable por la acción de la enzima tanasa. Esto permitió asignar la estructura de un éster poligaloilo del ácido quínico a dicho tanino, con un peso molecular aproximado de 800 [2,3]:



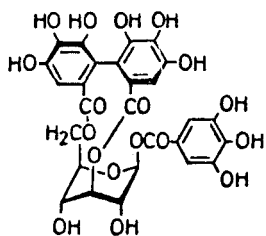
Tanino de Tara

La glucogalina, obtenida del ruibarbo (*Rheum officinale*), y cuya estructura es la que se muestra a continuación, ha sido también identificada por cromatografía de papel en muestras de tara, eucalipto, entre otras [3].



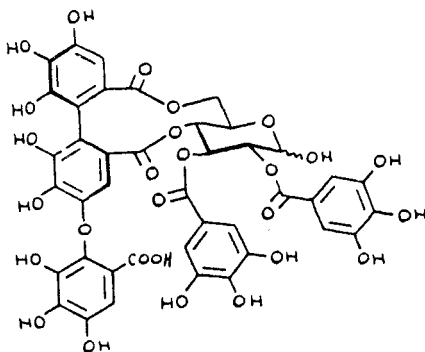
Glucogalina

Dentro de los elagitaninos, podemos poner como ejemplo al corilagin, primer tanino aislado de este tipo, de *Caesalpinia coriaria* (nombre común "divi-divi") y *Terminalia chebula* (nombre común "mirabolano") [4].



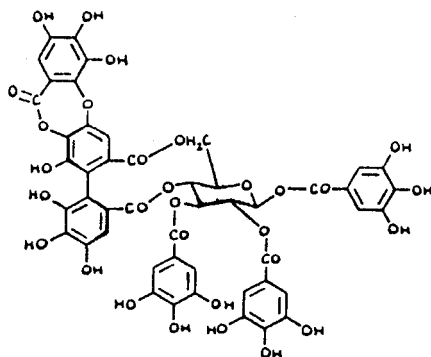
Corilagin

El isorugosin B, aislado de *Liquidambar formosana*, es otro ejemplo [5].



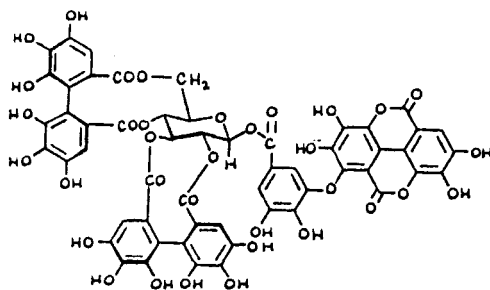
Isorugosin B

Otros elagitaninos, prostratin A, B y C, fueron aislados de *Euphorbia prostrata* [6].

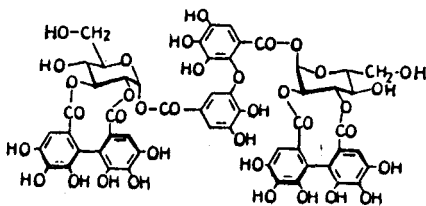


Prostratin C

De dos especies de *Rosa*, se aislaron 4 elagitaninos: davuriciin M_1 , de *R. davurica* [7]; y los dímeros laevigatin E, F y G, de *R. laevigata* [8].



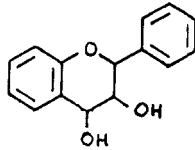
Davuriciin M_1



Laevigatin E

2. Taninos condensados

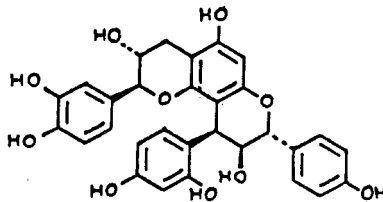
- son derivados de unidades de flavan-3,4-dioles (leucoantocianidinas o proantocianidinas monómeras), conocidos actualmente también como proantocianidinas condensadas.



Flavan-3,4-diol

- al ser tratados con ácidos en caliente, se origina una polimerización progresiva hasta dar taninos amorfos, llamados flobafenos o taninos rojos.
- en ellos, los núcleos bencénicos están unidos por átomos de carbono (por ejemplo C-4 a C-8, C-4 a C-6).
- dan coloración verde con FeCl_3 .
- precipitan con soluciones de bromo.

Ejemplos de este tipo de taninos los encontramos en la corteza de mimosa (*Acacia mollissima* Willd.), en la madera de quebracho (*Schinopsis lorenzii*, Engl.), en la corteza de mangle (*Rhizophora mangle*), en las hojas de lentisco (*Pistacia lentiscus*), en la madera del castaño (*Castanea sativa*), entre otros [9]; de *Julbernardia globiflora* se ha aislado el tanino condensado que se muestra a continuación [10]:



Tanino de *J. globiflora*

FUNCIONES ATRIBUIDAS EN LA PLANTA

Dentro de las funciones que desempeñan en la planta, se les atribuye, entre otras, las que a continuación se mencionan [11]:

- contribuyen a la formación del súber.
- son imprescindibles en la formación de sustancias vegetales, como aceites esenciales, resinas, lignina, etc.
- juegan un papel protector, evitando el ataque de insectos y hongos, de allí que se les atribuya propiedades fungicidas y bacteriostáticas.
- cumplen un papel moderador de los procesos de oxidación y de acciones antiférmentos.
- se les considera sustancias de reserva, y por otro lado, materiales de desecho; en este último caso, luego de proteger a la planta en ciertas etapas del crecimiento, finalmente se destruyen o depositan como producto del metabolismo en ciertos tejidos muertos de la planta madura, como el súber externo, el leño y las agallas.

ALGUNAS DE LAS FUENTES ACTUALES DE TANINOS

En el cuadro I se señalan una serie de recursos que se usan mundialmente como fuentes de taninos [12]. En este cuadro también hemos indicado algunas especies de la flora peruana que podrían ser aprovechadas. En ese sentido, en 1980 se reportó el uso de *Stryphnodendron guianense*, *Schizolobium* sp. (ambas conocidas comúnmente con el nombre de "pashaco"), *Heisteria pallida* (nombre común "chuchuhuasha") y *Acacia polyphyla* (nombre común "pashaco negro") como materias curtientes; y también propusieron como posibles fuentes de materias tánicas a las cortezas del nogal y mangle, de nombres científicos *Juglans regia* y *Rhizophora* sp., respectivamente [14].

APLICACIONES

Ambos tipos de taninos, hidrolizables y condensados, se emplean en la industria del cuero, por su gran poder curtiente, permitiendo obtener una amplia variedad de cueros, que se diferencian en flexibilidad y resistencia.

Los taninos condensados se usan principalmente en la fabricación de adhesivos y resinas. Por ejemplo, aquéllos que han sido aislados de especies de *Acacia*, han servido para desarrollar adhesivos en frío y termofraguados [15], por tratamiento con úrea-formaldehído [16], o con copolímeros fenol-formaldehído, estos últimos usados en la fabricación de enchapes de madera a prueba de agua [17,18].

También se menciona su empleo como precipitantes para suspensiones de arcilla [15].

CUADRO 1. Recursos vegetales usados como fuentes de taninos

PARTE USADA	NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO	ESPECIES EXISTENTES EN NUESTRO PAIS [13]	TIPO DE TANINO
Madera	catecu	Acacia catecu	A. farnesiana, A. huarango A. glomerosa, A. loretensis, etc	condensado
	urunday	Astrononium balusae	A. graveolens	
	castaño	Castanea sativa	C. vulgaris	
	algarrobo	Ceratonía siliqua	C. siliqua	
	myrtan	Eucalyptus wandoo	E. globulus, E. camaldulensis	
	encina	Quercus iiex	Q. robur, Q. suber	
	alcornoque	Quercus suber		
	roble	Quercus pedunculata, Quercus sessiliflora		
quebracho	ticera	Rhus pentaphylla	Toxicodendron striatum	condensado
	quebracho	Schinopsis balansac	S. peruviana	condensado
Corteza	abeto	Abies pectinata	ver catecu	condensado
	acacia	Acacia arabica		condensado
	mimosa	A. mollisima	A. jorulensis	hidrolizable
	aliso	Ainus glutinosa, A. incana		
	abedul	Betula verrucosa, B. alba		condensado
	casia	Cassia auriculata, C. fistula	C. fistula, C. alata, C. biflora, C. hirsuta, etc.	condensado
	eucalipto	Eucalyptus sp.	ver myrtan	condensado
	maleto	E. astringens		
	pino	Pinus halepensis	P. radiata	

CUADRO 1. (continuación)

	encina	Quercus ilex		condensado
	roble	Quercus pedunculata	Q. robur, Q. suber	hidrolizable
	alcornoque	Quercus suber		hidrolizable
	mangle	Rhizophora mangle	R. brevistyla, R. samoensis	condensado
	sauce	Salix sp.	S. babylonica, S. chilensis, S. martiana	condensado
	tsuga	Tsuga canadensis		condensado
Hojas	gayuba	Arcstaphylos uva-ursi		hidrolizable
	roldó	Coriaria myrtifolia	C. thymifolia	
	mirto	Myrtus communis		hidrolizable
	gambier	Nauclea gambir		condensado
	lentisco	Pistacia lentiscus		condensado
	zumaque	Rhus coriaria	ver ticera	hidrolizable
Frutos y Vainas	babul	Acacia arabica	ver catecu	
	aliso	Alnus glutinosa	A. jorulensis	hidrolizable
	algarrobilla	Caesalpinea brevifolia	C. spinosa, C. bonduc, C. gilliesi, C. paipai, C. pulcherrima, etc.	hidrolizable
	divi-divi	C. coriaria		hidrolizable
	tara	C. spinosa		hidrolizable
	granada	Punica granatum	P. granatum	hidrolizable
valonea	Quercus sp.	Q. robur, Q. suber		
	mirabolano	Terminalia sp.	T. amazonica, T. oblonga, T. catappa	hidrolizable
Raíces	badan	Saxifraga sp.	S. magellanica	hidrolizable
	ratania	Krameria triandra	K. triandra	condensado

Los taninos hidrolizables encuentran amplia aplicación debido a sus propiedades antioxidantes y su habilidad para formar complejos solubles e insolubles con las proteínas. Por ello se emplean en las industrias de alimentos, farmacéutica y en cervecería. En este último campo, por ejemplo, se usan como estabilizadores de la cerveza: en el producto que no ha sido recientemente preparado, las proteínas se combinan con los polifenoles para formar complejos que son responsables de la presencia de turbidez. Al agregar los taninos, el nivel de proteínas es disminuído a un valor apropiado y se aumenta así el tiempo de almacenamiento de la cerveza [2]. En la industria farmacéutica, se emplean para contraatacar el efecto de los alcaloides y el envenenamiento por sales de metales, inactivándose éstos por precipitación. En la industria de alimentos se puede, por ejemplo, remover impurezas proteínicas por precipitación con taninos [19]; emplearlo en la preservación y maduración de alimentos, aprovechando sus propiedades antisépticas y antioxidantes [20]; así como en la clarificación del vino blanco [21].

Es interesante encontrar una serie de investigaciones donde se reportan actividades biológicas de los taninos aislados así como de los extractos vegetales que los contienen; quisiéramos mencionar algunas de estas actividades por considerar que contribuyen a profundizar el conocimiento acerca de la aplicabilidad de estos compuestos.

Así, se reporta para los taninos aislados de las siguientes especies: la raíz de ratania (*Krameria triandra*), efectos antimicrobiales [22]; las especies de *Rubus*, *Cornus*, *Lespediza*, *Calycogonium*, *Potentilla* y *Geranium*, entre otras, efecto antitumoral contra un tipo de carcinoma [23,24,25,26,27,28]; las yemas de *Syzygium* y la raíz de *Paeonia*, actividad antiherpética (antiviral) [29]; además de los efectos: tóxico contra *Phytophthora infestans* [30], de inhibición hepatotóxica [25] y del proceso de peroxidación de lípidos [31], antiulceroso [32]; y recientemente se mencionan ensayos con taninos en la investigación del virus del SIDA [33,34,35], con buenos resultados.

En cuanto a los extractos de taninos se señala, entre otros, el efecto cariostático (inhibidor de caries), de especies de *Schinopsis* y *Acacia* [36,37]; el efecto inhibidor para el crecimiento de diversos virus, del ácido tánico y del extracto de té [38]; la actividad hemostática y antiinflamatoria, en formulaciones basadas en taninos [39].

Su aplicación en otros campos está orientada, por ejemplo, a la extracción de Pb, Fe, Ca, Ba y Ra presentes en soluciones, por coprecipitación con

gelatina y taninos [40]; al efecto anticorrosivo en superficies de Fe, expuestos al medio ambiente [41]; al empleo en la elaboración de tintas [42]; como recubrimiento protector de cinc y aleaciones del mismo metal [43].

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL CONTENIDO DE TANINOS

Para el análisis cuantitativo de taninos se han propuesto muchos procedimientos, algunos de aplicación general, y otros aplicables a casos particulares. Dentro de los primeros existen tres que pueden considerarse como clásicos: el método de polvo de piel, el método de KMnO_4 y añil o de Löwenthal, y el método de Denis-Folin.

El método de polvo de piel [44] permite determinar por pesada las sustancias absorbidas por el cuero, incluyendo en ellas a las materias colorantes, los ácidos y otras sustancias que no pueden considerarse en realidad como taninos. A pesar de ser un método relativamente simple, requiere un gran tiempo de análisis y gran cantidad de muestra.

El método de Löwenthal [45] es volumétrico. Su fundamento es la oxidación del tanino por KMnO_4 en presencia del añil sulfonado, sirviendo éste como indicador y como regulador de la reacción. Como el ácido gálico y otros compuestos que están presentes se oxidan del mismo modo que el tanino, es preciso realizar una segunda valoración después de separar el tanino, calculando éste por diferencia. Para efectuar dicha operación puede usarse el polvo de piel, o se puede añadir una solución recién preparada de gelatina.

El método de Denis-Folin [46] aprovecha la reacción positiva entre compuestos fosforúngsticos-fosfomolibdicos con el ácido tánico y pirogalol, para su determinación colorimétrica.

Entre los otros métodos cuantitativos que se usan podemos citar: la hemólisis de la sangre, en que se cuantifican por colorimetría en el líquido sobrenadante de la mezcla de taninos y sangre hemolizada, requiriendo en este caso una pequeña cantidad de muestra y corto tiempo para el análisis [47]; la precipitación de taninos de hojas de Hamamelis, raíces de Krameria y Tormentila con $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ [48]; oxidación de una solución de taninos del extracto de té con exceso de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ [49]; la determinación titrimétrica de taninos tratando la muestra con solución de ZnO , ZnCl_2 ó ZnSO_4 y titulando la solución resultante con EDTA [50]; el empleo de solución de molibdato de amonio y medición de la absorbancia a 364 nm [51]; la precipitación de muestras de

CUADRO 2. Condiciones para el análisis cuantitativo por HPLC de taninos vegetales

MUESTRA	COLUMNA	FASE MOVIL	DETECTOR	REF.
Taninos de <i>Rhus semialata</i> , <i>R. coriaria</i> , <i>R. typhina</i> , <i>Quercus infectoria</i>	Corasil II (Waters) 2 x 500 mm	solvente A = hexano solvente B = THF:MeOH:HOAc (25:100:1) Gradiente: 4 % A a 0 % A por 35 min Estándar interno: hidroquinona Flujo: 2 mL/min	UV 280 nm	[54]
Taninos de <i>Rhus semialata</i> , <i>R. coriaria</i> , <i>Caesalpinea spinosa</i> , <i>Quercus infectoria</i>	ROSiL 5µm (Alltech-RSL) 4.6 x 250 mm	solvente A = hexano solvente B = MeOH:THF (3:1) + 0.25 % ácido cítrico Gradiente: 1) 80% A a 50% A (15min) 2) 50% A a 35% A (30 min) Flujo: 1 mL/min	UV 280 nm	[2]
	ROSiL C-18, 5µm (Alltech-RSL) 4.6 x 150 mm	Gradiente: 10 % MeOH a 100 % MeOH + 0.5 % H ₃ PO ₄ por 30 min	UV 280 nm	[2]

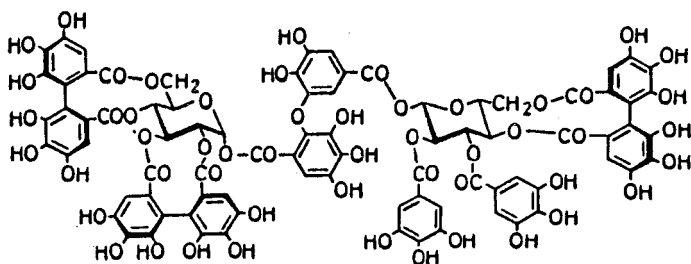
ácido tánico y taninos de sorgo con proteínas, adición de FeCl_3 y medición de la absorbancia a 510 nm [52]; la determinación del ácido tánico en plantas, con solución de tartrato de sodio y potasio con FeSO_4 , titulando con NH_4OAc y evaluando, ya sea por colorimetría a 540 nm ó por absorción ultravioleta a 276 nm [53].

Se han reportado métodos más recientes en los que se hace uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que en los métodos como el de polvo de piel, por ejemplo, también se determinan los no-taninos en los extractos, y se obtienen porcentajes que no reflejan el verdadero contenido de taninos. Debido a su importancia, se presenta en el cuadro 2 las condiciones de algunos de los métodos aplicados en muestras vegetales.

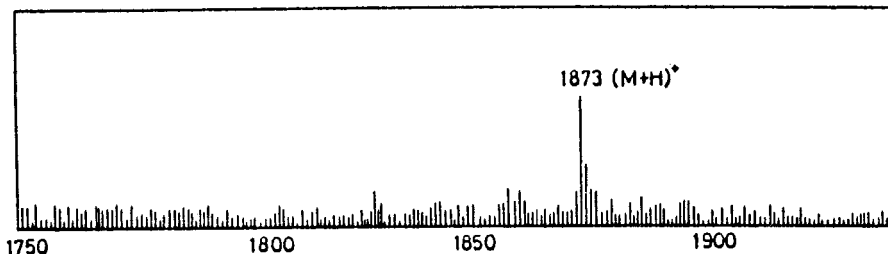
DETERMINACION ESTRUCTURAL

Los estudios estructurales de taninos han sido posibles, no sólo con la ayuda de reacciones de degradación química como la hidrólisis completa con ácido, parcial con agua o enzimas, sino en los últimos años con el desarrollo de técnicas como la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN).

En el campo del análisis por MS, se han estudiado últimamente, entre otros, los taninos que son altamente polares y térmicamente lábiles, de pobre volatilidad, usando las técnicas de FAB (bombardeo acelerado de electrones) y FD (desorción de campo). Un ejemplo del uso de la técnica FAB aplicable a un tanino hidrolizable dímero, lo constituye la determinación del peso molecular del compuesto gemin A [33].



Gemin A



Espectro de Masas FAB de Gemin A

Como se ha observado que en los espectros de masas de taninos hidrolizables que no están derivatizados se presentan frecuentemente aparte del ión $[M+H]^+$ los iones $[M+Na]^+$ y/o $[M+K]^+$ debido a la pequeña cantidad de impurezas inorgánicas como NaCl ó KCl, se ha procedido a añadir pequeñas cantidades de haluros de Na ó K, para la detección de este tipo de picos.

En lo referente a la espectroscopía RMN de 1H y ^{13}C , para el tipo de taninos hidrolizables que poseen un núcleo de glucosa en su estructura, y teniendo como complemento los resultados de la hidrólisis ácida, usualmente se puede obtener información acerca de la naturaleza y número de grupos polifenólicos, esto es, galofilos, hexahidroxidifenilos (HHDP), entre otros. Estos grupos se reconocen en el espectro RMN de 1H como singulete para 2 hidrógenos (galofilo), 2 singuletes de 1 hidrógeno cada uno (HHDP) [33].

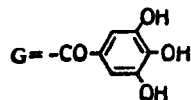
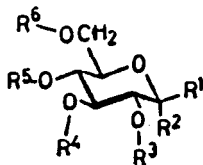
En el cuadro 3 se indican los valores de desplazamiento químico de ^{13}C para la glucosa, en diferentes moléculas de estos taninos [33].

CUADRO 3. Valores de desplazamiento de RMN- ^{13}C del anillo de glucosa en taninos hidrolizables (50 MHz, TMS)

Compuesto ^(a)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
1,2,3,4,6-penta-O-galofíl-glu ^(b)	93.4	71.9	73.5	69.5	74.1	62.9
1,2,3,6-tetra-O-galofíl-glu	93.5	71.9	76.0	69.5	76.1	63.7

1,2,4,6-tetra-	93.4	73.8	73.3	71.7	74.0	63.1
1,2,3-tri-	94.2	72.5	76.7	69.8	79.2	62.4
corilagin	94.2	68.8	70.4	62.2	75.5	64.3

(a) medido en Me₂CO-d₆
 (b) glu =β-D-glucopiranososa



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
1,2,3,6-tetra-O-galoil-glu	O-G	H	G	G	H	G
1,2,4,6-tetra-O-galoil-glu	O-G	H	G	H	G	G
1,2,3-tri-O-galoil-glu	O-G	H	G	G	H	H

REFERENCIAS

1. Yagüe Gil, A., Los Taninos Vegetales, Instituto Forestal de Investigación y Experiencias, Madrid, 1969, p.48.
2. Verzele, M.(1986), *J. Chromatogr.* **362**, 363-74.
3. Ref. [1], p.57.
4. Ref. [1], p.60.
5. Hatano, T.(1989), *Nat. Prod. Upd.* No. 1, 5305.
6. Yoshida, T.(1991), *Nat. Prod. Upd.* No. 6, 11707.
7. Yoshida, T.(1989), *Phytochem.* **28**(8), 2177-81.

8. Yoshida, T.(1989), *Phytochem.* **28**(9), 2451-54.
9. Ref. [1], p. 67-73.
10. Steynberg, P.J.(1990), *Nat. Prod. Upd.* No. 7, 9233.
11. Ref. [1], p.43.
12. Ref. [1], p.77-115.
13. Soukup, J., Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana, Editorial Salesiana, Lima-Perú, 1986.
14. Aquino, D., Determinación del contenido tánico de la corteza de 5 especies forestales de la Amazonía Peruana, Tesis-UNA, Lima-Perú, 1980.
15. Roux, D.(1972), *Phytochem.* **11**, 1219-30.
16. CA **91**, 5753m (1979), Pizzi, A., *J. Appl. Polym. Sci.* 1979, **23**(9), 2777-92.
17. CA **85**, 145082t (1976), Zoolagud, S., *IPIRI J.* 1975, **5**(2), 59-63.
18. CA **86**, 91182a (1977), George, J., *IPIRI J.* 1976, **6**(2), 69-73.
19. CA **91**, 73146r (1979), Suginami, K.
20. CA **83**, 191631c (1975), Leonte, M.
21. CA **78**, 70162p (1973), Shinohara, T., *Nippon Joro Kyokai Zasshi* 1972, **67**(11), 957-60.
22. Scholz, E.(1989), *Nat. Prod. Upd.* No. 10, 7364.
23. Fong, H.(1972), *J. Pharm. Sci.* **61**(11), 1818.
24. CA **82**, 149249t (1975), Amirova, M.N., *Zdravookr. Kaz.* 1974, **8**, 36-38.
25. Kakiuchi, N.(1985), *J. Nat. Prod.* **48**(4), 614-21.
26. Yoshida, T.(1990), *Nat. Prod. Upd.* No. 4, 8891.
27. Yoshida, T.(1990), *Nat. Prod. Upd.* No. 11, 10174.
28. Yoshida, T.(1991), *Nat. Prod. Upd.* No. 11, 12800.
29. Takechi, M.(1985), *Phytochem.* **24**(10), 2245-50.
30. CA **72**, 63944t (1970), Sokolova, V.E., *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 1969, **5**(6), 649.
31. Kimura, Y.(1985), *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 2028.

32. CA 88, 266h (1978), Tani, S., *Yakugaku Zasshi* 1976, 96(5), 648-52.
33. Okuda, T.(1989), *J. Nat. Prod.* 52(1), 1
34. Nishizawa, M.(1989), *J. Nat. Prod.* 52(4), 762-68.
35. Nonaka, G.I.(1990), *J. Nat. Prod.* 53(3), 587-95.
36. Stralfors, A.(1967), *Archs. Oral Biol.* 12, 321-32.
37. Sakanaka, S.(1990), *Nat. Prod. Upd.* No. 1, 8025.
38. CA 91, 33423x (1979), John, T., *Indian J. Med. Res.* 1979, 69(4), 542-45.
39. CA 89, 135858u (1978), Tomic, D.
40. CA 58, 1949b (1963), Keshishyan, G., *Zh. Prikl. Khim.* 1962, 35, 205.
41. Ref. [1], p. 31.
42. Kirk Othmer, *Enciclopedia de Tecnología Química*, Editorial UTEHA, México, Vol. 15.
43. CA 87, 139969n (1977), Matsushima, Y.
44. Ref. [1], p. 177-88.
45. Barua, D.N.(1940), *Biochem. J.* 34, 1524-31.
46. Rosenblat, M.(1941), *J. Assoc. Agr. Chem.* 24(1), 170.
47. Bate-Smith, E.C.(1973), *Phytochem.* 12(4), 907-12.
48. CA 78, 40100z (1973), Blazej, A., *Cesk. Farm.* 1972, 21(7), 306-10.
49. CA 82, 110362v (1975), Kapel, M., *Analyst* 1974, 99, 1183.
50. CA 93, 163979 (1980), Belikov, V., *Otkrytiya, Izobret., Prom., Obraztsy, Tovarnye Znaki* 1980, 22, 232.
51. CA 83, 110721g (1975), Kemertelidze, E. 1973, 12, 15-18.
52. Hagerman, A.J.(1978), *Agric. Food Chem.* 26(4), 809-12.
53. CA 104, 221581 (1986), Gu, R., *Linchan Huaxue Yu Gongye* 1985, 5(4), 12-23.
54. Beasley, T.H.(1977), *Anal.Chem.* 49(2), 238.