

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA



* 5 3 0 9 5 4 4 0 7 6 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ESTUDIO DE LA COMPOSICION TANICA
DE MADERA, CORTEZA Y HOJAS DE
EUCALYPTUS CAMALDULENSIS, *E. GLOBULUS* y *E. RUDIS***

TESIS DOCTORAL

que, para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

presenta

ESTRELLA CADAHIA FERNANDEZ

Licenciada en Ciencias Químicas

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología
Agraria y Alimentaria

Madrid 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

**ESTUDIO DE LA COMPOSICION TANICA
DE MADERA, CORTEZA Y HOJAS DE
EUCALYPTUS CAMALDULENSIS, *E. GLOBULUS* y *E. RUDIS***

TESIS DOCTORAL

que, para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

presenta

ESTRELLA CADAHIA FERNANDEZ

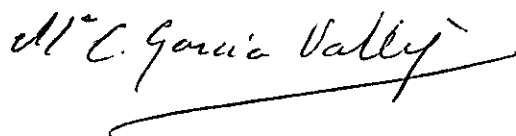
Licenciada en Ciencias Químicas

Autora



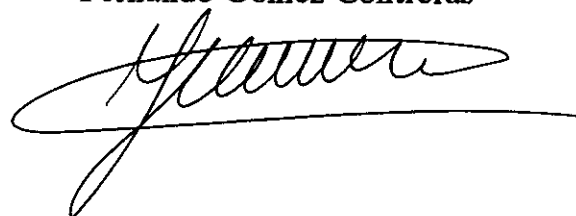
Directora:

M^a Concepción García Vallejo



Tutor:

Fernando Gómez Contreras



Instituto Nacional de Investigación y Tecnología
Agraria y Alimentaria

Madrid 1995

A mis hijos

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. M^a Concepción García Vallejo, Investigadora del Area de Industrias Forestales del CIFOR-INIA, por la dirección de esta Tesis Doctoral, así como por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, y por su apoyo y colaboración.

A la Dra. Elvira Conde Arias-Camisón, por su inestimable ayuda constante en la realización del trabajo experimental, su colaboración en los análisis numéricos de los datos y los consejos en la redacción de esta memoria.

A la Dra. M^a Brígida Fernández de Simón por la orientación y valiosos consejos, en particular en la redacción de esta memoria.

Mi gratitud también al Dr. Fernando Gómez Contreras, Profesor del Dpto. de Química Orgánica de la Facultad de CC. Químicas de la Universidad Complutense, por la tutoría de esta Tesis.

A todos mis compañeros del Area de Industrias Forestales, en especial a Antonio Sánchez por su colaboración en el trabajo de mecanografía de la Memoria, a Rafael Díez-Barra por sus consejos en los trabajos estadísticos y a Alicia Moral, Ramón Pérez, Juan Carlos Villar y Esteban Revilla por las facilidades y apoyo que me han brindado durante el desarrollo del trabajo experimental de esta Tesis.

Mi agradecimiento también al INIA, Institución que desde 1976 ha sido la sede de mi actividad investigadora.

Por último, el reconocimiento a mi familia por su apoyo, paciencia y ayuda constante, tan necesarios y que han hecho mucho más facil la realización de este trabajo.

INDICE

I. OBJETIVOS	1
II. INTRODUCCION	6
1. Clasificación botánica y descripción morfológica de las especies de <i>Eucalyptus</i> estudiadas	7
1.1 Clasificación botánica	7
1.2 Morfología	8
2. Taninos	19
2.1 Definición y clasificación	19
2.2 Estructura química	21
2.2.1 Taninos hidrolizables	21
2.2.1.1 Taninos hidrolizables oligoméricos	25
2.2.2 Taninos condensados	30
2.2.2.1 Variaciones estructurales en las proantocianidinas oligoméricas	31
2.3 Propiedades químicas	36
2.3.1 Taninos hidrolizables	36
2.3.2 Taninos condensados	37
2.3.2.1 Reacciones en el anillo A de las proantocianidinas	38
2.3.2.2 Reacciones en el anillo B de las proantocianidinas	43
2.3.2.3 Reacciones en el enlace interflavánico de las proantocianidinas	46
2.4 Complejación de los taninos	52
2.4.1 Interacción con proteínas	53
2.5 Biosíntesis	56
2.5.1 Ruta biosintética de los ácidos siquímico y corísmico	57
2.5.2 Ruta del ácido <i>p</i> -cumárico vía fenilalanina y tirosina	58
2.5.3 Biosíntesis de los galotaninos	60
2.5.4 Biosíntesis de elagitaninos y estructuras relacionadas	62
2.5.5 Biosíntesis de taninos condensados	63

2.6	Significación biológica de los taninos	66
2.6.1	Funciones de los taninos en las plantas	67
2.6.1.1	Regulación del crecimiento	67
2.6.1.2	Inhibición de depredadores, parásitos y competidores	68
2.6.1.3	Resistencia a enfermedades	70
2.6.1.4	Respuesta a estrés	71
2.7	Aplicaciones en la industria química y farmacéutica	72
2.8	Análisis de los taninos	75
2.8.1	Análisis cuantitativo	76
2.8.1.1	Métodos químicos	76
2.8.1.2	Métodos basados en la complejación con proteínas	79
2.8.2	Análisis cualitativo. Métodos cromatográficos	80
2.8.3	Análisis estructural	84
2.9	Distribución de los taninos en el género <i>Eucalyptus</i>	87
2.9.1	Madera	89
2.9.2	Corteza	91
2.9.3	Hojas y frutos	91
III.	MATERIAL VEGETAL	93
1.	Selección de muestras	94
2.	Preparación de las muestras	96
2.1	Molienda y tamizado	96
2.2	Determinación de humedad	97
IV.	METODOLOGIA	98
1.	Extracción	99
1.1	Antecedentes bibliográficos	99
1.2	Método de extracción	101
2.	Análisis cuantitativo de los diferentes tipos de taninos	103
2.1	Método de determinación de fenoles totales de Folin-Ciocalteu	103
2.2	Determinación de proantocianidinas mediante el método de la vainillina-ácido	105
2.3	Método de determinación de elagitaninos	107

2.3.1	Hidrólisis ácida	107
2.3.2	Valoración de ácido elágico por CLAR	108
3.	Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	108
3.1	CLAR en fase inversa	108
3.1.1	Bases teóricas	108
3.1.2	Método empleado	110
3.1.3	Identificación directa de compuestos fenólicos por CLAR	113
3.2	Cromatografía de permeabilidad por geles (CPG)	114
3.2.1	Bases teóricas	114
3.2.2	Métodos empleados	117
3.2.2.1	Preparación de las muestras para el análisis por CPG	117
3.2.2.2	Análisis por CPG	117
4.	Caracterización de los taninos hidrolizables	118
4.1	Hidrólisis ácida	118
4.2	Análisis por CLAR de los polifenoles generados en la hidrólisis	119
4.3	Análisis de azúcares por cromatografía de gases-espectrometría de masas	120
4.3.1	Bases teóricas	120
4.3.2	Metodología empleada	123
4.3.2.1	Preparación de la muestra	123
4.3.2.2	Preparación de los trimetilsilil-derivados	125
4.3.2.3	Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas	125
5.	Caracterización de las proantocianidinas	126
5.1	Hidrólisis en n-BuOH-HCl	126
5.2	Análisis por CLAR de los productos de degradación. Antocianidinas	128
6.	Reconocimiento de glicósidos fenólicos	129
6.1	Aislamiento de los flavonoles por cromatografía en capa fina	129
6.2	Hidrólisis de los glicósidos flavonólicos	129
7.	Análisis numérico	130
7.1	Análisis descriptivo	130
7.2	Análisis univariante	130

7.3 Análisis multivariante	131
V. RESULTADOS Y DISCUSION	132
1. Estudios preliminares	133
1.1 Ajuste de las condiciones de extracción	133
2. Rendimiento de extracción y niveles de taninos de los extractos	138
2.1 Madera	139
2.1.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	142
2.1.2 <i>Eucalyptus globulus</i>	142
2.1.3 <i>Eucalyptus rudis</i>	144
2.1.4 Análisis numérico	144
2.1.5 Conclusiones	148
2.2 Corteza	149
2.2.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	149
2.2.2 <i>Eucalyptus globulus</i>	152
2.2.3 <i>Eucalyptus rudis</i>	152
2.2.4 Análisis numérico	153
2.2.5 Conclusiones	154
2.3 Hojas	157
2.3.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	157
2.3.2 <i>Eucalyptus globulus</i>	160
2.3.3 <i>Eucalyptus rudis</i>	160
2.3.4 Análisis numérico	161
2.3.5 Conclusiones	165
3. Análisis por CLAR en fase inversa	166
3.1 Optimización de los análisis por CLAR	166
3.2 Madera	171
3.2.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	182
3.2.2 <i>Eucalyptus globulus</i>	185
3.2.3 <i>Eucalyptus rudis</i>	185
3.2.4 Análisis numérico	187
3.2.5 Conclusiones	193

3.3 Corteza	194
3.3.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	201
3.3.2 <i>Eucalyptus globulus</i>	202
3.3.3 <i>Eucalyptus rudis</i>	204
3.3.4 Análisis numérico	207
3.3.5 Conclusiones	211
3.4 Hojas	212
3.4.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	213
3.4.2 <i>Eucalyptus globulus</i>	222
3.4.3 <i>Eucalyptus rudis</i>	225
3.4.4 Análisis numérico	225
3.4.5 Conclusiones	235
4. Estudio de la distribución de pesos moleculares de los taninos de <i>Eucalyptus spp.</i> , mediante CPG	237
4.1 Madera	238
4.2 Corteza	243
4.3 Hojas	250
4.4 Conclusiones	255
5. Caracterización de los elagitaninos	257
5.1 Análisis de los compuestos polifenólicos por CLAR	257
5.2 Análisis de los azúcares por cromatografía de gases-espectrometría de masas	267
5.3 Conclusiones	276
6. Caracterización de proantocianidinas	277
6.1 Conclusiones	285
7. Caracterización de otros compuestos polifenólicos presentes en los extractos de hojas de <i>Eucalyptus spp.</i>	285
7.1 Conclusiones	288
VI. CONCLUSIONES	289
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	294

I. OBJETIVOS

I. OBJETIVOS

El trabajo de investigación presentado en esta Memoria Doctoral se ha centrado en el estudio del contenido y caracterización de los compuestos polifenólicos, especialmente taninos, presentes en la madera, corteza y hojas de las especies de *Eucalyptus*: *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*.

En España se cultivan extensivamente varias especies de *Eucalyptus*, principalmente *E. globulus* y *E. camaldulensis*, en orden a su utilización como fuente de materia prima para la fabricación de pasta de celulosa y de papel. Se cultivan además en fase de experimentación en arboreto otras especies, entre las que se encuentra *E. rudis*.

Como consecuencia de los trabajos llevados a cabo en el INIA acerca de la aptitud de la madera de diversas especies de *Eucalyptus* para la obtención de pasta de celulosa, se ha llegado a establecer que la madera de *E. globulus* es la que presenta mejores propiedades para dicha industria, seguida de la de *E. camaldulensis* y *E. rudis*, aunque, por otra parte, se ha comprobado que la calidad varía considerablemente dentro de una misma especie en razón de la procedencia, e incluso se ha encontrado variabilidad a nivel de individuo dentro de una misma población (Bustamante Ezpeleta y Santos Viqueira, 1983).

La calidad de la madera, para el citado uso en la industria de la celulosa, ha sido establecida en base a ciertas propiedades químicas, como son los contenidos en humedad y cenizas, solubilidades en agua fría, en agua caliente y en sosa, el rendimiento extractivo en alcohol-benceno y los contenidos en ligninas, holocelulosas y pentosanos. Sin embargo, también la composición en productos del metabolismo secundario, tales como polifenoles, entre los que se incluyen los taninos, puede condicionar la idoneidad de la madera de una especie determinada para la fabricación de pasta de celulosa.

Se considera que, en general, la madera de *Eucalyptus spp.* contiene una importante proporción de compuestos polifenólicos no deseables para la producción de pasta de celulosa y que, en ocasiones, han sido la causa del rechazo de maderas originarias de Australia, para dicha aplicación. Una elevada cantidad de este tipo de compuestos tiene efecto negativo, no sólo porque disminuyen el rendimiento en pasta, debido a la reducción de la penetración de los reactivos de cocción aumentando así su consumo, sino porque también, al poder reaccionar por un lado con el sistema de cocción y por otro con los componentes de la pared celular vegetal, pueden afectar además del rendimiento la calidad de la pasta de celulosa. Concretamente, en relación con este último aspecto, se ha constatado que los taninos afectan considerablemente el color de la pasta, siendo su efecto superior al producido por la lignina (Hillis, 1986).

El conocimiento de los niveles y composición de los polifenoles de la madera de *Eucalyptus spp.*, y de su variación en función de la especie y el origen, proporcionaría una base muy útil a partir de la cual la industria podría llegar a determinar las causas de algunos de los numerosos problemas que se presentan al modificar los procesos de fabricación y/o la materia prima empleada.

Dada la abundancia y amplia distribución de los taninos en los vegetales y su particular naturaleza química, la cual les confiere la capacidad de complejarse con proteínas y otras moléculas celulares, y también la amplísima gama de posibles reacciones químicas en las que pueden intervenir, y dada, por otra parte, la importancia de las funciones biológicas que se les atribuyen, como son actividad reguladora del crecimiento y las acciones antidepredadora, insecticida y antimicrobiana (fungicida, bactericida, ecétera), estos compuestos son especialmente interesantes para su utilización en la industria química y farmacéutica, en muy diversos aspectos; por ejemplo, en la obtención de adhesivos para conglomerados y laminados de madera, o como productos para la protección de la madera o la conservación de alimentos. En este sentido, no sólo la madera de *Eucalyptus spp.*, sino también la corteza, hojas, ramillas y otros productos de

desecho de la industria papelera, podrían ser fuente de taninos con tales fines.

Los principales problemas inherentes a la utilización industrial y farmacológica de los taninos derivan, precisamente, de la falta de información básica sobre la diversidad de sus estructuras químicas y de las correspondientes propiedades, tanto químicas como biológicas, así como del desconocimiento acerca de los mecanismos de su biosíntesis y del papel fisiológico de estos polímeros en el vegetal. El esclarecimiento de estos y otros aspectos haría posible un mejor conocimiento de las posibilidades de sus aplicaciones industriales y farmacológicas, y la mejora y adaptación de los actuales procesos industriales de transformación, y proporcionaría al mismo tiempo criterios para la selección de las especies y de los tratamientos silvícolas apropiados, e incluso para el posible control de la biosíntesis de estos productos del metabolismo secundario del vegetal.

Así, en muchas ocasiones, las diferencias en la estructura de los taninos presentes en distintas especies vegetales se han correspondido con una considerable diferencia de reactividad, lo que es de primordial interés en la orientación de la utilización industrial de los taninos. Tal es el caso, por ejemplo, de los taninos condensados de quebracho y acacia, con anillos A de tipo resorcinólico, y los procedentes de coníferas, con anillos A de tipo floroglucinólico, los cuales presentan importantes diferencias de reactividad que condicionan su utilización y, en concreto, los procesos químicos industriales aplicados en la síntesis de adhesivos para madera.

Por otro lado, la utilización industrial de los taninos, al igual que la de cualquier otra sustancia natural, requiere una disponibilidad continuada de la materia prima y el mantenimiento de su calidad, además de otros requerimientos relativos a los costos. Por ello, la investigación, el desarrollo y, finalmente, un control estricto de la calidad, harán posible que los productos naturales sean competitivos frente a otros productos de síntesis química.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, en esta Tesis Doctoral se han establecido los siguientes objetivos.

- 1- Puesta a punto de técnicas de extracción y de análisis que permitan la valoración de los contenidos globales y de los diversos tipos de taninos en distintos tejidos vegetales, así como la caracterización de sus estructuras moleculares.
- 2- Estudio comparativo de la composición de los polifenoles poliméricos de la madera, corteza y hojas de las especies de *Eucalyptus* cultivadas en España: *E. globulus*, *E. camaldulensis* y *E. rudis*, centrándonos en el análisis de los taninos condensados o proantocianidinas y de los taninos hidrolizables o elagitaninos.
- 3- Establecimiento de perfiles de composición de los taninos, según la especie de eucalipto o incluso según taxones subespecíficos (quimiotipos), y estudio de las posibilidades que presentan estos compuestos como marcadores taxonómicos.

II. INTRODUCCION

II. INTRODUCCION

1. Clasificación botánica y descripción morfológica de las especies de *Eucalyptus* estudiadas.

1.1 Clasificación botánica.

El género *Eucalyptus* L' Her. pertenece a la familia botánica *Myrtaceae* dentro del Orden *Myrtales*. Esta familia contiene, aproximadamente, 100 géneros y alrededor de 3000 especies de diverso porte, desde matas y pequeños arbustos hasta enormes árboles como los de algunas especies de *Eucalyptus* (Heywood, 1985).

Las mirtáceas habitan, principalmente, en las áreas tropical y subtropical del planeta, con dos centros de dispersión: uno en América y otro en el este y suroeste de Australia.

Las especies agrupadas en esta familia se distribuyen en dos subfamilias: *Myrtoideae* y *Leptospermoideae* (Penfold y Willis, 1961), diferenciándose en esta última subfamilia dos tribus: *Leptospermeae* y *Chamaelaucieae*. Dentro de las *Leptospermeae*, a su vez, se reconocen seis subtribus: *Backhousiinae*, *Metrosiderinae*, *Leptosperminae*, *Calothamninae*, *Baeckeinae* y *Eucalyptinae*.

La subtribu *Eucalyptinae*, como su denominación sugiere, incluye las especies del género *Eucalyptus* y, también, las del género *Angophora*.

Los sistemas de clasificación del género *Eucalyptus*, más extendidos, se han establecido en función de la morfología de sus anteras, dado que los demás caracteres morfológicos varían tan ampliamente que no hacen posible su utilización en la taxonomía de este género.

Estas clasificaciones reconocen seis secciones principales (de A a G), alguna de ellas con diversas subsecciones, las cuales se dividen, a su vez, en series:

- A. *Renantherae*
 - a. *Alpinae*
 - b. *Brachyandrae*
- B. *Renantheroideae*
- C. *Porantheroideae*
- D. *Terminales*
- E. *Plathyantherae*
 - a. *Graciles*
 - b. *Pyriformes*
- F. *Macrantherae*
 - a. *Tereticornes*
 - b. *Longiores*
- G. *Macrantherae (Normales)*

Dos de las tres especies de *Eucalyptus* objeto de este estudio, *E. camaldulensis* y *E. rudis*, se encuadran dentro de la sección *Macrantherae*, en la subsección *Tereticornes* y serie *Exsertae*, una de las tres series que componen dicha subsección. La otra especie estudiada, *E. globulus*, se clasifica en diferente sección, *Macrantherae (Normales)*, concretamente en la serie *Globulares* que, junto con otras cinco más, constituyen esta sección.

1.2 Morfología.

Los especímenes del género *Eucalyptus* se caracterizan por presentar una enorme variabilidad en tamaño, desde los pequeños arbustos llamados "mallees" o "marlocks", hasta los grandes árboles (Penfold y Willis, 1961).

Presentan hojas simples, generalmente opuestas (algunas veces alternas), persistentes, coriáceas y enteras, sin estípulas y con punteaduras diáfanas, las cuales son debidas a la presencia de glándulas subepidérmicas, también encontradas sobre los tallos jóvenes, piezas florales y frutos y que segregan aceites esenciales (Heywood, 1985).

Sus flores son bisexuales, regulares y suelen presentarse en inflorescencias, con frecuencia cimosas unas pocas veces racemosas y también, aunque rara vez, pueden ser solitarias. Tienen, por lo general, 4 ó 5 sépalos casi siempre libres, o a veces más o menos soldados formando una caperuza que se desprende al abrirse la flor; en todo caso, suelen ser muy reducidos o, incluso, virtualmente ausentes. Los pétalos, en número de 4 ó 5, son libres, pequeños y redondos; los estambres son numerosos (rara vez se presentan en pequeño número) y libres u ocasionalmente dispuestos en manojos opuestos a los pétalos y con anteras versátiles; el ovario es, por lo general, ínfero con múltiples cavidades (a menudo 2-5), cada una con dos o más óvulos asentados sobre placentas axilares (rara vez parietales); el estilo es largo y simple y el estigma capitado (Heywood, 1985; Polunin, 1977).

El fruto es, generalmente, una baya carnosa, una cápsula o una nuez y las semillas presentan muy poco o nada de endospermo.

Madera y corteza

Los componentes de la madera de las especies leñosas se originan a partir de una capa de células, llamada *cambium*, que se extiende desde las ramas hasta las raíces. El *cambium* posee gran capacidad de división celular, siendo así capaz de producir continuamente nuevas células; las que se originan hacia dentro del tronco forman la madera o xilema, y las que se originan hacia fuera, forman la corteza interna o floema. El xilema se encarga de la conducción de agua y solutos desde las raíces hasta las hojas, y el floema, del transporte de los compuestos orgánicos, sintetizados en las hojas, al resto

de la planta. Además, dispuestos de forma radial, existen unos grupos de células conocidas con el nombre de haces medulares, que sirven para conectar horizontalmente las diferentes capas de la madera con el floema.

La madera puede considerarse constituida o dividida en:

- Albura: es la parte externa y de color más claro. Se trata de la parte viva de la madera.
- Corazón o duramen: es por el contrario la parte interna y más oscura de la madera.

La madera de los eucaliptos está clasificada dentro del grupo de las maderas de frondosas, tipo de madera que se diferencia de la de coníferas por la presencia de unos vasos o poros semejantes a las características traqueidas de éstas últimas plantas, pero que, en el caso de las frondosas, están formados por una serie de células de paredes finas en las que la pared transversal se ha roto dando lugar a un tubo más o menos continuo.

Basándose en la estructura de la madera, concretamente en la distribución del parénquima (tejido fundamental) y en el agrupamiento de los vasos, se han reconocido dos grupos de especies de *Eucalyptus* (Ingle y Dadswell, 1953); el grupo A incluye la mayoría de los eucaliptos, mientras que el grupo B incluye las series *Corymbosae-Peltatae* y *Corymbosae*.

En lo que se refiere a la composición química de la madera, hay que destacar que, junto a los dos componentes principales, lignina y celulosa, existe una gran variedad de componentes minoritarios tales como azúcares, almidón, resinas, ceras, polifenoles, aceites esenciales, minerales y "kinos" (materiales resinosos que contienen taninos).

Dentro del género *Eucalyptus* se da una gran variedad de tipos de corteza, aunque la mayor parte se pueden clasificar dentro de seis grupos principales:

- Teseladas ("Bloodwoods")
- Lisas ("Gums")
- Fibrosas ("Boxes")
- De fibra corta y estrecha ("Peppermints")
- De fibra larga ("Stringbarks")
- Oscuras, con grandes fisuras ("Ironbarks").

Hojas

En relación al desarrollo del follaje, los eucaliptos muestran dos características importantes. En primer lugar, cada árbol produce diferentes tipos de hojas en las distintas etapas de su ciclo vital. Y en segundo lugar, las hojas de la copa se originan con una inusual rapidez, lo que es debido a la presencia de brotes desnudos que capacitan al árbol para desarrollar una gran cantidad de ramas en pocas semanas. Incluso si la copa se ha destruido parcial o totalmente, el sistema de reserva de brotes permite el crecimiento de las hojas en un corto período de tiempo.

Los tipos de hojas correspondientes a las distintas etapas de evolución del árbol son, en orden a su desarrollo:

- 1) Hojas de los cotiledones
- 2) Hojas juveniles
- 3) Hojas intermedias
- 4) Hojas adultas

Durante la germinación las semillas de los eucaliptos desarrollan dos cotiledones, lo que es característico de las especies de las dos series, dentro de las que se encuadran las especies bajo estudio, y que puede pues servir como marcador de diagnóstico.

Las hojas juveniles son opuestas, ligeramente pecioladas, a menudo glaucas; en los

árboles adultos muchas veces se forman en respuesta a una lesión. El paso de hojas juveniles a adultas no suele ser brusco, sino que tiene lugar a través de una serie de formas que muestran una transición gradual y a las que se les denomina hojas intermedias.

Las hojas adultas suelen ser alternas, pecioladas, resistentes, rígidas, con una vena intermarginal ancha.

Flores y frutos

Las flores son solitarias o agrupadas en umbelas, con pétalos y sépalos soldados, formando un casquete u opérculo sobre el botón, el cual se desprende cuando la flor se abre. Presentan numerosos estambres. El ovario tiene 2-8 lóculos, y el estilo es alargado.

El fruto se presenta en cápsula enmarcada por valvas que se describen como abiertas cuando se proyectan hacia el borde de la cápsula o cerradas cuando se dirigen hacia el centro.

Las características particulares de las especies objeto de nuestro estudio son:

Eucalyptus camaldulensis Dehnh.

Los miembros de esta especie son árboles que pueden alcanzar una altura de 40 m, con tronco corto, macizo y copa extendida. Consiguen su óptimo desarrollo en suelos profundos, fangosos con subsuelo arcilloso.

En la figura I.1 se representan los caracteres morfológicos y la distribución en España de esta especie (De La Lama Gutierrez, 1976).

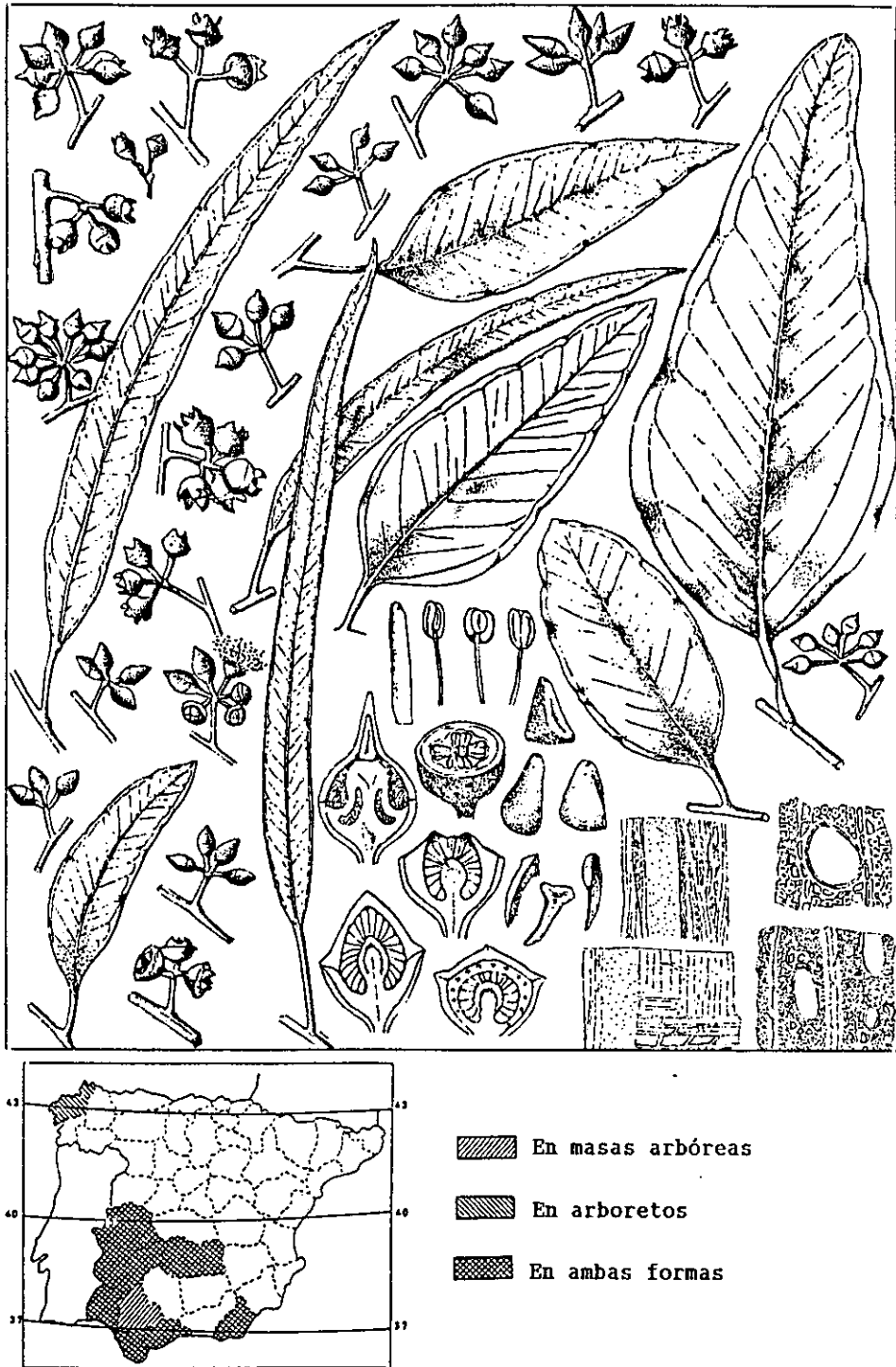


FIGURA I.1 Caracteres morfológicos y distribución en España de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (tomado de De La Lama Gutierrez, 1976).

- **Hojas juveniles.** Opuestas, 6-9 x 2,5-4 cm, desde lanceoladas anchas a ovadas, glaucas, pecioladas, sesiles, abrazadoras.

- **Hojas adultas.** Alternas, 12-22 x 0,8-1,5 cm, desde lanceoladas estrechas a lanceoladas, acuminadas.

- **Inflorescencias.** En umbelas de 5-10 flores en un pedúnculo de 6-15 mm. Brotes de 6-10 x 4-5 mm, en largos pedicelos. Opérculo rostrado o cónico.

- **Frutos.** Pedicelados, de 7-8 x 5-6 mm, hemisféricos, con valvas abiertas.

- **Corteza.** Lisa, moteada con manchas amarillas y grises. Se descortezza formando tiras o placas.

Por otra parte, *E. camaldulensis* es una especie maderera de un relativo valor comercial, que produce un excelente carbón, y está incluida en el grupo 3º de la clasificación de Bustamante Ezpeleta y Santos Viqueira (1983). Crece rápidamente y se regenera bien. Es muy ornamental, sobre todo la variedad "péndula". Tiene también gran interés apícola, porque presenta floración casi permanente y por la buena miel que produce.

***Eucalyptus globulus* Labill.**

Se trata de árboles que, en Australia, pueden alcanzar una altura de 55 m, mientras que en España sobrepasan frecuentemente los 60 m, conociéndose ejemplares de hasta 67 m.

En la figura I.2, se representan los caracteres morfológicos y la distribución de esta especie en España (Penfold y Willis, 1961; De La Lama Gutierrez, 1976).

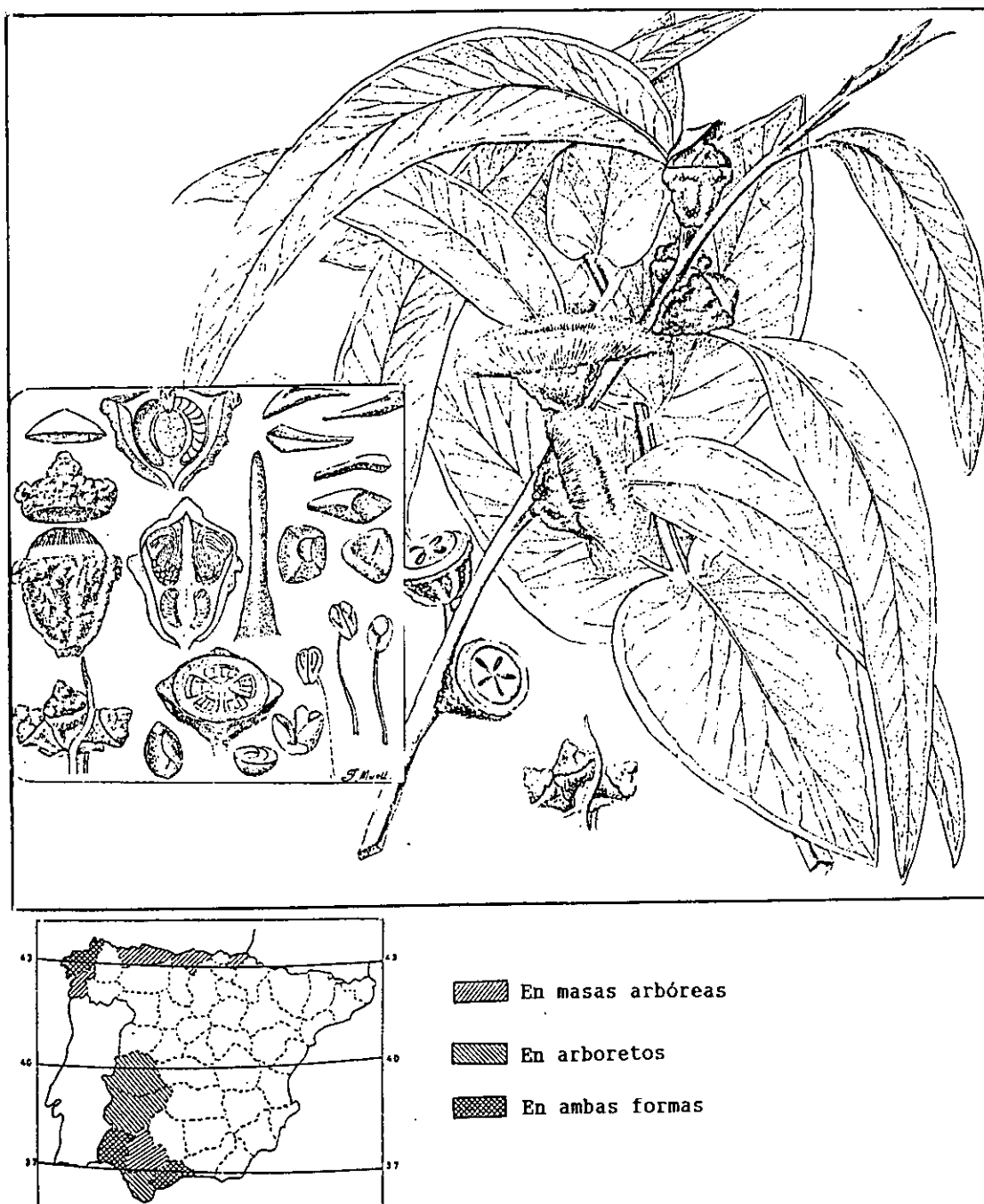


FIGURA I.2 Caracteres morfológicos y distribución en España de *Eucalyptus globulus* Labill. (tomado de Penfold y Willis, 1961, y De La Lama Gutierrez, 1976).

- Hojas juveniles. Opuestas para un gran número de pares, de 7-16 x 4-9 cm, lanceoladas anchas, ovaladas, cordiformes, glaucas y concoloras.

- Hojas adultas. Alternas, de 10-30 x 3-4 cm, falcadas, verdes oscuras, concoloras, coriáceas y pecioladas.

- Inflorescencias. Axilares, solitarias, ocasionalmente en umbelas de 3 flores, con pedúnculo corto o rudimentario. Brotes de 30 x 20 mm, glaucos. Opérculo hemisférico.

- Frutos. De 10-15 x 15-30 mm, de forma desde globular a cónica ancha, con 4 bordes principales; las valvas suelen estar cubiertas por un disco.

- Corteza. La corteza del tronco es, en un principio, blanquecina, plateada o azul-pruinosa y lisa; se torna luego grisácea, amarillenta y finalmente, pardo-grisácea. Cae anualmente en largas bandas coriáceas abarquilladas, las cuales cuelgan algún tiempo de la parte alta del tronco y del arranque de las primeras ramas. En las patillas de la cepa y en la base del tronco, la corteza es persistente, gris-oscura, aunque a veces, se hiende en placas longitudinales (Ruiz De La Torre, 1979).

La madera de esta especie se usa comercialmente. Su celulosa es la mejor entre las de los eucaliptos de Europa (grupo 1º de la clasificación de Bustamante Ezpeleta y Santos Viqueira, 1983). Su blanqueo es fácil, ya que requiere bajo consumo de cloro. Junto con algunos congéneres de maderas claras, da la mejor pasta noble (pasta química para disolver) de todas las frondosas; mucho mejor que la del haya, antaño la más utilizada. En la obtención de pasta química para papel es una madera más ventajosa que la de *E. camaldulensis* por su más fácil cocción, por la libertad de elección de proceso y por suministrar una pasta homogénea y clara y de mejores características químicas y mecánicas. *E. globulus* da un mayor porcentaje de corteza que *E. camaldulensis*, pero la de aquella puede ser incorporada, en ciertas condiciones, al proceso de obtención de

pasta sin merma de las cualidades mecánicas de la misma, y resultando superior a la de otras frondosas o a las de paja, por su fibra más larga, su mayor resistencia al desgarró, y también por su blancura. Tratadas al bisulfito, se obtienen pastas para papel de calidad y al sulfato, pastas para kraft, mezclándose siempre con pasta de coníferas. En España, se obtiene pasta blanca para textil.

Las hojas de *E. globulus* se destilan para la obtención de aceites esenciales. Esta especie se utiliza también como árbol ornamental, por los contrastes de color entre sus hojas juveniles y adultas.

Eucalyptus rudis Endl.

Es un árbol de altura aproximada a 15 m, con tronco corto y ramas extendidas.

La figura I.3 muestra los caracteres morfológicos y la distribución de esta especie en España (De La Lama Gutierrez, 1976).

- Hojas juveniles. Opuestas para 4 o más pares, de 10 x 7,5 cm, desde ovadas a orbiculares, ligeramente glaucas, con cortos peciolo.
- Hojas adultas. Alternas, de 10-15 x 1-4 cm, desde lanceoladas estrechas a anchas, falcadas, concoloras, pecioladas.
- Inflorescencias. Umbelas de 4-10 flores, con pedúnculo de 10-15 cm. Brotes de 9-12 x 5-9 mm, pedicelados. Opérculo cónico o rostrado.
- Frutos. Pedicelados, de 5-9 x 10-12 mm, hemisféricos o campanulados. 4 ó 5 valvas abiertas con disco ancho, plano o convexo.
- Corteza. Rugosa y persistente en el tronco y lisa en las ramas; fácilmente descortezable



FIGURA I.3 Caracteres morfológicos y distribución en España de *Eucalyptus rudis* Endl. (tomado de De La Lama Gutierrez, 1976).

en las ramas.

Su madera marrón-rojiza, correspondiente al grupo 4º de la clasificación de Bustamante Ezpeleta y Santos Viqueira (1983), presenta peores características que la de *E. camaldulensis*.

2. Taninos.

2.1 Definición y clasificación.

(Ribereau-Gayon, 1968; Haslam, 1989; Porter, 1989a; Hagerman, 1991)

Tal y como tradicionalmente se utiliza en química vegetal, el término tanino hace referencia a una numerosa serie de compuestos propios de las plantas, que presentan determinadas propiedades fisicoquímicas y funcionales comunes, pero no necesariamente estructuras químicas análogas.

Seguin, en 1797, fue el primero en utilizar el término tanino al designar el componente químico de la nuez de agalla capaz de transformar la piel fresca de los animales en cuero imputrescible y poco permeable. Poco después fue esclarecida la naturaleza química de aquél y otros supuestos agentes del curtido: al tratarse de sustancias susceptibles de oxidación por permanganato en frío y de coloración por sales de hierro, se incluyó, bajo dicha denominación, al numeroso conjunto de constituyentes vegetales que presentaban las reacciones propias de los fenoles, aún cuando su aptitud para el curtido de pieles, en muchos casos, no hubiera sido demostrada ni aún siquiera sometida a estudio. Así pues, si bien durante un relativamente largo periodo de tiempo los taninos fueron considerados como los extractos vegetales ricos en fenoles y útiles para el curtido de pieles, ante el descenso continuado de su uso en esta industria, y sobre todo, ante la puesta en evidencia de que muchos de los compuestos, considerados

actualmente como taninos, han resultado inadecuados o inefectivos en el proceso del curtido, el concepto de tanino ha sido a menudo sometido a revisión, y aún hoy en día persiste cierta confusión.

En repetidas ocasiones ha sido aconsejada la adopción de designaciones basadas únicamente en la naturaleza química de este tipo de compuestos, tales como la de polifenoles de plantas u otras incluso más correctas desde el punto de vista químico, aunque en ningún caso del todo satisfactorias; por ejemplo, la citada denominación de polifenoles incluiría compuestos adicionales, que no presentan las propiedades características y únicas de los taninos.

En la práctica, se sigue utilizando el término tanino en un sentido general y un tanto impreciso. Sin embargo, en sentido estricto, para que un determinado compuesto pueda ser actualmente considerado como tanino debe presentar las siguientes características químicas y funcionales: debe tratarse de una molécula oligomérica, constituida por unidades estructurales repetidas, conteniendo grupos fenólicos que en su mayoría deben de estar libres y no sustituidos. Se establece, además, un peso molecular mínimo de alrededor de 500 sin que haya sido fijado el límite superior, habiéndose descrito moléculas con valores incluso superiores a 20.000 (Williams *et al.*, 1983a).

Por otra parte, es importante señalar que entre los metabolitos de plantas de naturaleza fenólica y de alto peso molecular, sólo los taninos son capaces de complejarse con proteínas y carbohidratos, propiedad que les hace útiles tanto en la mencionada industria del curtido de pieles como en otras también de gran interés, como es la de obtención de adhesivos. Esta capacidad de los taninos, para formar complejos con tan importantes componentes celulares, constituye la base físico-química de las acciones biológicas que se les atribuyen.

Teniendo en cuenta la naturaleza química, los taninos de las plantas superiores se

han distribuido principalmente en dos grandes grupos: los "taninos hidrolizables" y los "taninos condensados". Los taninos hidrolizables son ésteres de glúcidos y ácidos fenólicos y como su propio nombre indica, son fácilmente hidrolizables en condiciones ácidas o básicas o por la acción de enzimas, (esterasas), mientras que los taninos condensados son oligómeros y polímeros de flavanoides unidos por enlaces C-C, y no son susceptibles de hidrólisis.

2.2 Estructura química.

2.2.1 Taninos hidrolizables.

(Haslam, 1989; Porter, 1989a; Hagerman, 1991; Okuda *et al.*, 1990; 1993)

Los taninos hidrolizables son ésteres oligoméricos en los que la unidad estructural básica es un poliol, normalmente D-glucosa, cuyos grupos hidroxilos están esterificados por ácidos polifenolcarboxílicos, tales como el ácido gálico⁽¹⁾, el ácido hexahidroxidifénico⁽²⁾ (fig. II.1) y/o sus análogos. A su vez estos ácidos pueden unirse oxidativamente, mediante uniones C-C y/o C-O, a otras unidades galoilo produciéndose una amplia variedad de estructuras monoméricas y oligoméricas.

Según la estructura de los monómeros que los constituyen, podemos considerar dos diferentes clases de taninos hidrolizables: los taninos que poseen sólo grupos galoilo(G) llamados galotaninos, y los que poseen el grupo hexahidroxidifenoilo (HHDP, GG ó D), llamados elagitaninos.

El tipo más común de galotaninos tiene como unidad estructural básica la β -penta-O-galoil-glucopiranosa⁽⁴⁾, en la que los cinco grupos hidroxilos de la glucosa están esterificados por el ácido gálico (fig. II.1). En estructuras mas complejas, otros grupos galoilo adicionales pueden estar esterificando en *meta* a los hidroxilos de alguno de los

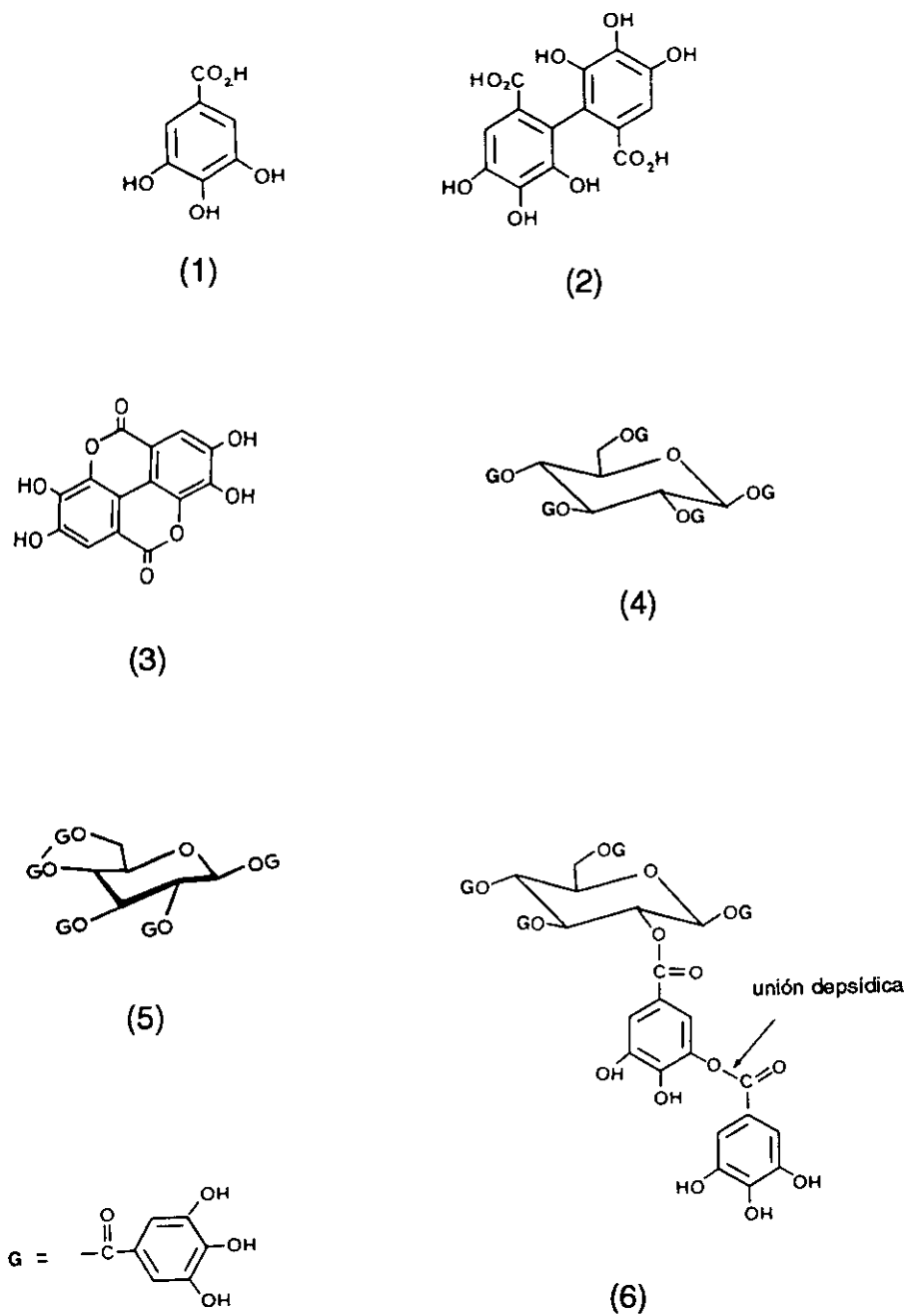


FIGURA II.1 (1) ácido gálico. (2) ácido hexahidroxdifénico. (3) ácido elágico. (4) β -penta-*o*-galoil-glucopiranososa. (5) hexahidroxdifenoil ésteres. (6) galotanino con uniones depsídicas. G=galoilo.

grupos galoilo de la citada unidad básica (uniones depsídicas), hasta llegar a una media de 6 a 9 grupos galoilo por molécula⁽⁶⁾ (fig. II.1). Una mezcla de galotaninos es precisamente el ácido tánico disponible comercialmente.

En los elagitaninos mas comunes, los grupos galoilo que esterifican hidroxilos adyacentes del polirol se unen a su vez entre sí oxidativamente mediante enlaces C-C, para formar ésteres de ácido hexahidrohidifenico⁽⁵⁾. Por hidrólisis, este tipo de elagitaninos forman ácido hexahidrohidifenico⁽²⁾, el cual, espontáneamente, se convierte en la forma lactona o ácido elágico⁽³⁾ (fig.II.1). Estas formas de elagitaninos son ésteres derivados de (α)- ó (β)-penta-O-galoil-D-glucosa que, mediante el acoplamiento oxidativo C-2/C-2 entre los grupos galoilo, pueden formar, a su vez, (R)- ó (S)-hexahidrohidifeniloil (HHDP)⁽⁵⁾ ésteres (fig. II.1).

En los elagitaninos de este tipo, los hidroxilos glucosídicos, esterificados por los grupos galoilo son, con frecuencia, los de las posiciones C-2/C-3 y/o C-4/C-6, como se puede observar en el caso de pedunculagina⁽⁷⁾ y tellimagrandina I⁽⁸⁾ (fig. II.2); pero también pueden estar esterificados los de otras posiciones.

Se han descrito, por otra parte, elagitaninos en los que la glucosa se presenta en la forma conformacional axial, en vez de la ecuatorial, y así se pueden producir acoplamientos oxidativos entre grupos galoilo de posiciones alternas en el anillo glucosídico, por ejemplo C-2/C-4 y C-3/C-6, como ocurre en la geraniina⁽⁹⁾ (fig. II.2).

La mayoría de los taninos hidrolizables son elagitaninos de los tipos hasta aquí descritos. Sin embargo, existen también otros tipos, como son los dehidroelagitaninos y los taninos C-glicosídicos. Los dehidroelagitaninos presentan el grupo dehidrohexahidrohidifeniloil (DHHDP) en su molécula. Como ejemplo, podemos considerar la geraniina⁽⁹⁾ (fig. II.2) que, como se desprende de su estructura molecular, es tanto un dehidroelagitanino como un elagitanino.

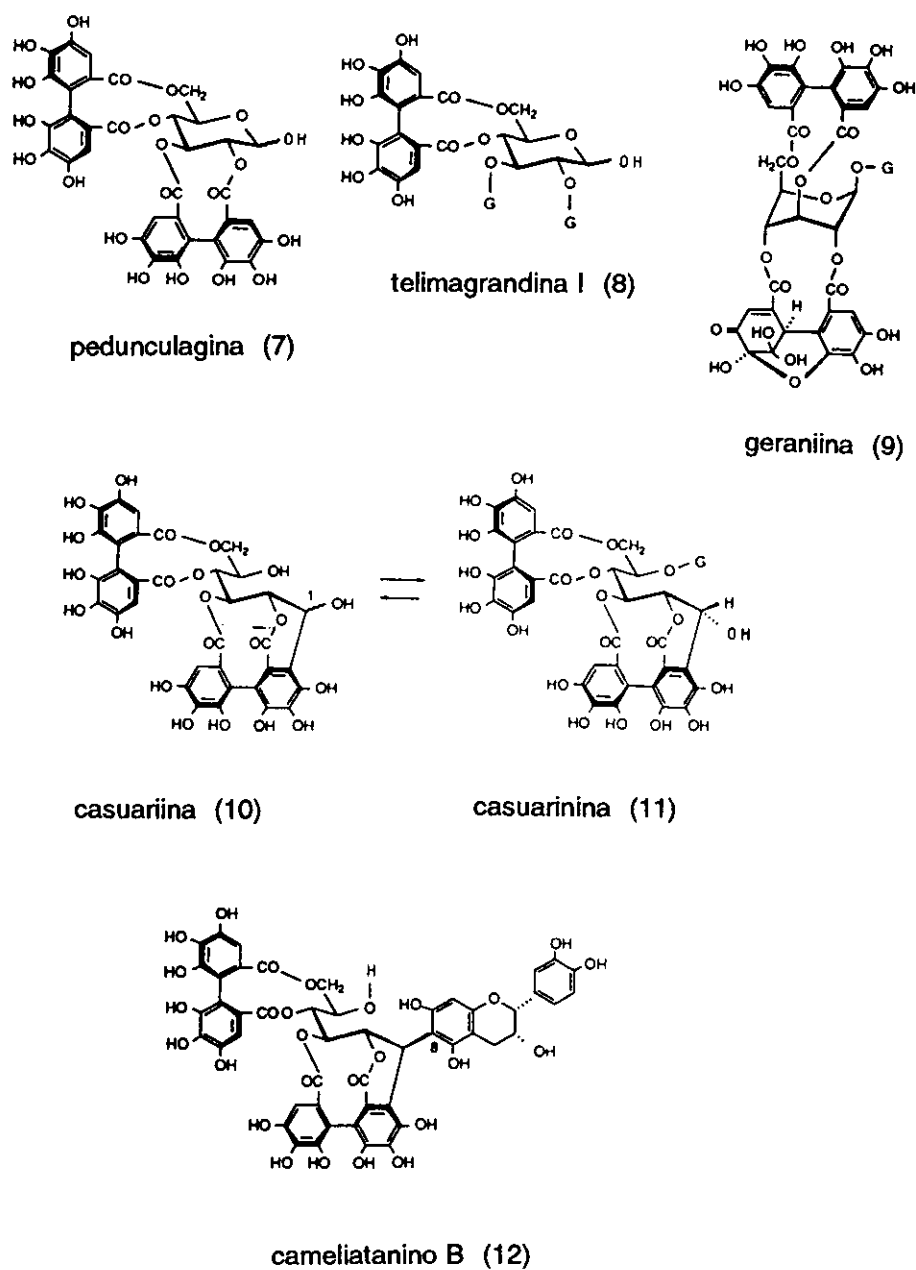


FIGURA II.2 Estructura de diferentes tipos de elagitaninos frecuentes en la naturaleza. G=galoilo.

En cuanto a los elagitaninos C-glucosídicos, éstos se forman por la apertura del anillo de la glucosa y posterior C-glucosilación. La casuaniina⁽¹⁰⁾, la casuarinina⁽¹¹⁾ y otros ampliamente distribuidos en Fagáceas, Mirtáceas, Rosáceas y otras familias de dicotiledóneas, son posiblemente biosintetizados a partir de pedunculagina⁽⁷⁾ (fig. II.2).

Por último, se consideran los "taninos complejos" que son polifenoles constituidos por una unidad de tanino hidrolizable (frecuentemente de tanino C-glucosídico) y otra de tanino condensado, unidas entre sí mediante enlaces C-C, formados entre el C-1 del anillo de glucosa de la unidad de tanino hidrolizable, y el C-8 ó el C-6 del flavan-3-ol de la unidad estructural básica del tanino condensado (Okuda *et al.*, 1993). Un ejemplo de dicha clase de taninos es el cameliatanino B⁽¹²⁾ (fig. II.2).

2.2.1.1 Taninos hidrolizables oligoméricos.

La mayoría de los numerosos taninos hidrolizables que han sido descritos hasta ahora son monómeros, de estructura química diversa, u oligómeros constituidos por la repetición de unidades básicas, que alcanzan pesos moleculares en el rango entre 2.500 y 5.000.

Desde el punto de vista biosintético, los taninos hidrolizables diméricos son productos del acoplamiento oxidativo entre uno de los hidroxilos fenólicos de un monómero y un carbono del anillo aromático del otro monómero; y los oligómeros superiores, el producto de la repetición de dicho acoplamiento oxidativo. Cuando tales uniones se dan dentro de una misma molécula, pueden también formarse estructuras macrocíclicas.

Atendiendo a la estructura molecular de la parte de los monómeros que participa en el acoplamiento oxidativo, los oligómeros aislados hasta ahora han sido clasificados en cinco tipos diferentes, los cuales son expuestos en la figura II.3 (Okuda *et al.*, 1990).

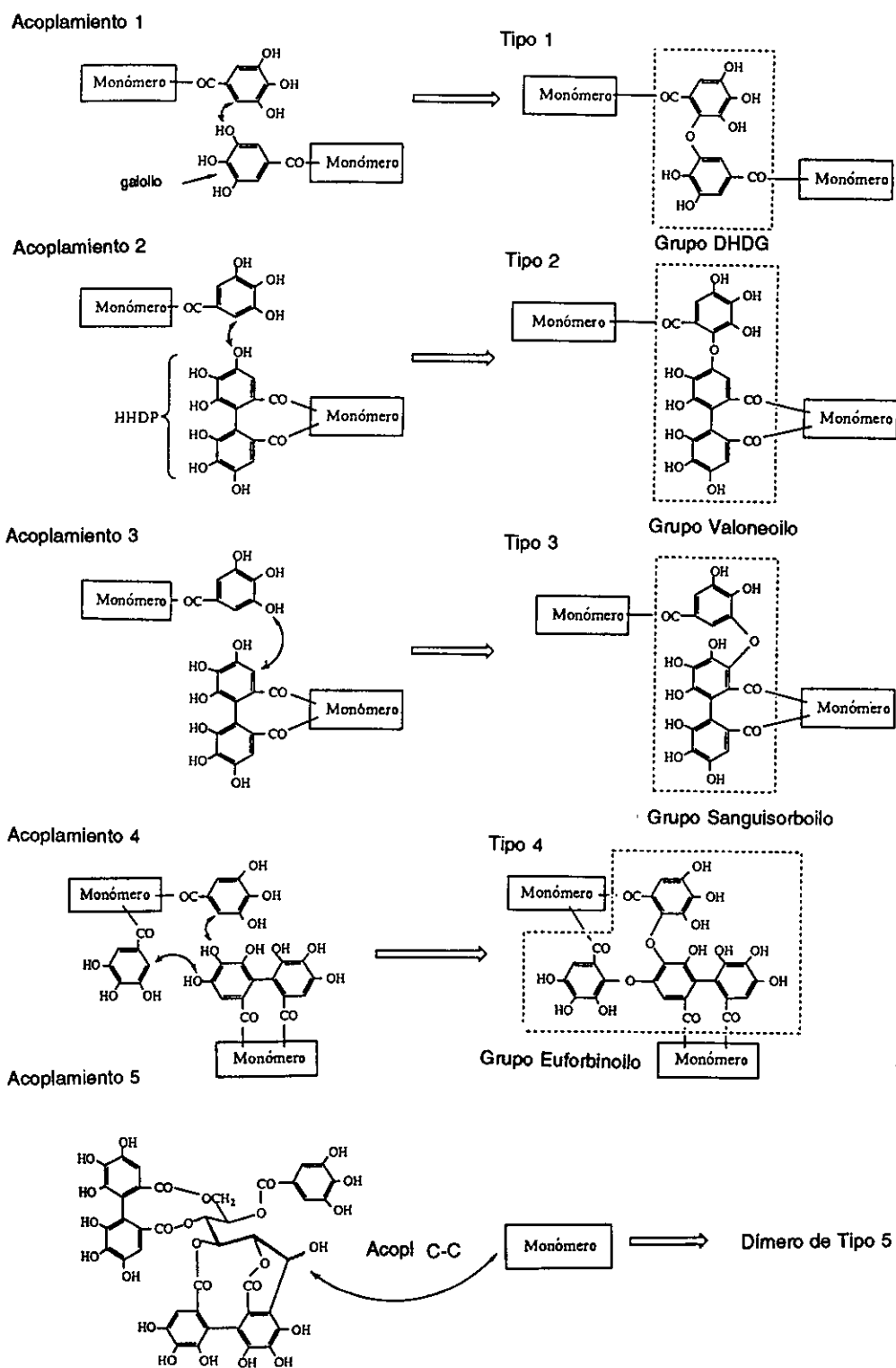


FIGURA II.3 Clasificación de los elagitaninos oligoméricos. G=galoilo, F=Flavan-3-ol, HHDP=D=hexahidroxidifenilo, DHDG=dehidrodigaloilo (Okuda *et al.*, 1990).

* Oligómeros del tipo GOG y GOGOG (tipo 1). La unidad estructural básica de estos tipos de oligómeros es bien un grupo dehidrodigaloilo (DHDG), o bien un grupo helinoilo, constituidos, respectivamente, a partir de dos o tres grupos galoilo (G) unidos mediante enlace éter (fig. II.3). Dicho enlace éter puede realizarse entre un hidroxilo en posición *meta* o *para* de uno de los grupos galoilo y el carbono en *orto* de otro galoilo, pudiéndose pues originar oligómeros *meta* o *para*. Los de tipo *m*-GOG con grupos dehidrodigaloilo en su molécula, son los más frecuentemente encontrados, y en ellos los grupos DHDG están esterificados generalmente por el hidroxilo del carbono anomérico (C-1) de los dos anillos de glucosa, como sucede con la agrimoniina⁽¹³⁾ (tipo *m*GOG(1-1')), compuesto identificado en algunas Rosáceas (fig. II.4). Se han descrito también elagitaninos en los que los hidroxilos de la glucosa que esterifican al grupo DHDG ocupan otras posiciones diferentes. Un ejemplo es la tamarixinina A⁽¹⁴⁾ (tipo *m*-GO-*m*-GOG(1,2-2')), identificada en flores de *Tamarix pakistanica* (fig. II.4), en la que los hidroxilos en posición 1 y 2 de una glucosa y el hidroxilo 2' de la otra son los participantes de las uniones éster.

* Oligómeros del tipo DOG (tipo 2). Son aquellos que presentan un grupo valoneoilo o tergaloilo en su unidad estructural básica, según se trate de los tipos *m*- o *p*-DOG respectivamente. Biosintéticamente son considerados como productos del acoplamiento oxidativo entre un oxígeno del grupo hexahidroxidifenoilo (HHDP, GG ó D) de uno de los monómeros y un carbono del grupo galoilo del otro monómero (fig. II.3). Se ha descrito una amplia gama de subtipos, según las posiciones de los hidroxilos de los anillos de glucosa esterificados por los grupos galoilo y HHDP. Como ejemplo de elagitanino del tipo *m*-DOG consideramos el nobotanino B⁽¹⁵⁾ (*m*-DOG(3,2-4')) (fig. II.4), en el que el HHDP está esterificando los hidroxilos en posición 3 y 2 de una molécula de glucosa y el grupo G, el hidroxilo en posición 4 de otra glucosa. La eucalbanina C⁽¹⁶⁾ (fig. II.4), aislada de frutos de *Eucalyptus alba* es del tipo *p*-DOG(4,6-2'), ya que el grupo HHDP esterifica los hidroxilos de las posiciones 4 y 6 de una glucosa y el grupo G, el C-2 de la otra molécula de glucosa.

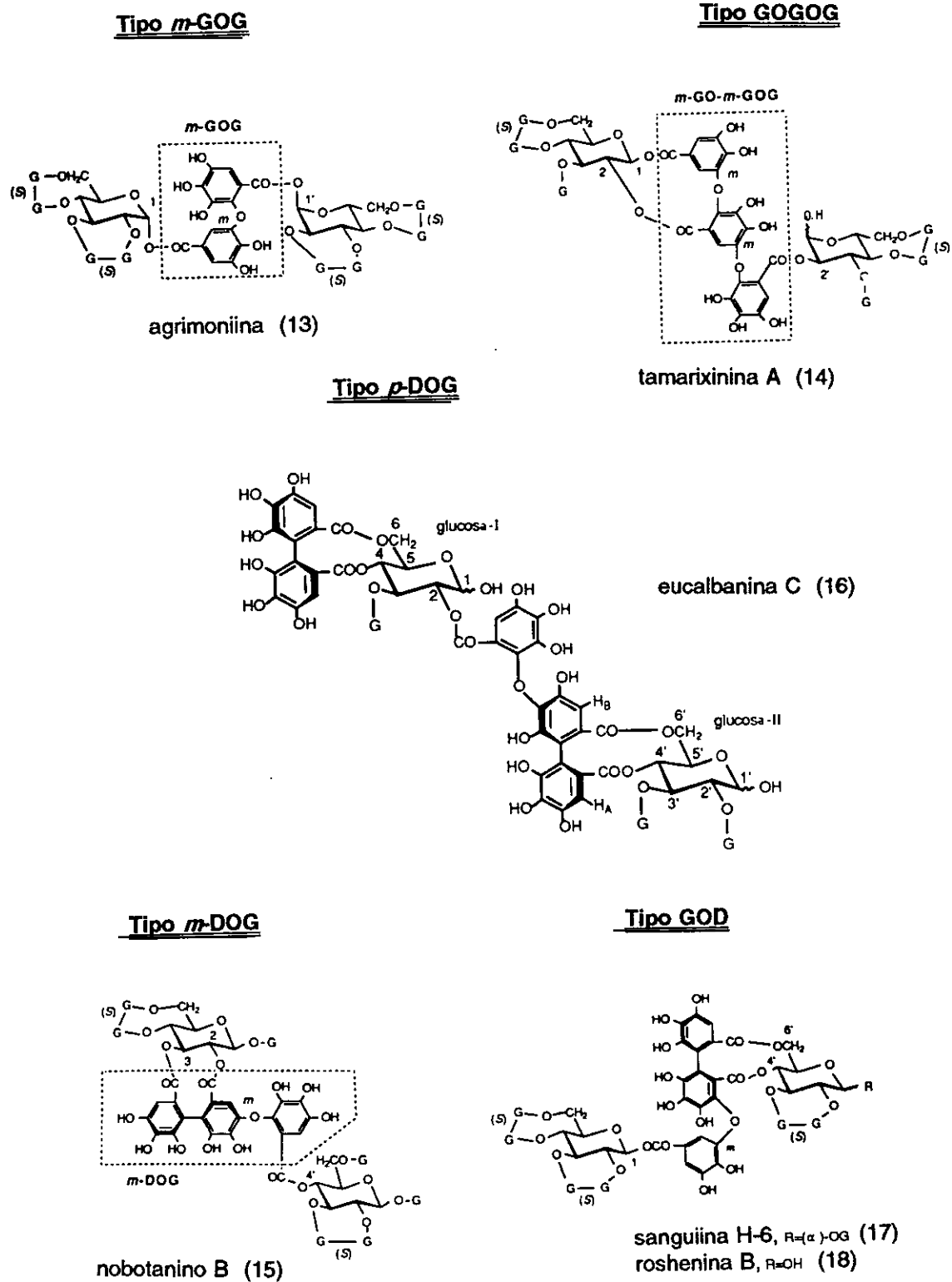
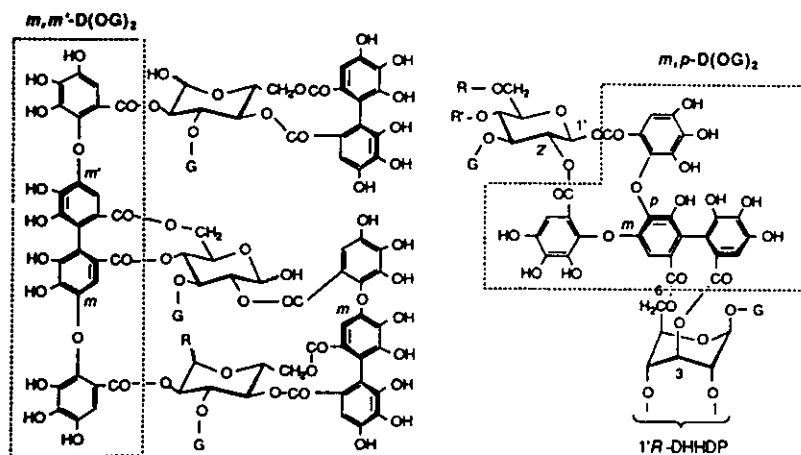


FIGURA II.4 Ejemplo de los distintos tipos de elagitaninos diméricos. G=galoilo.

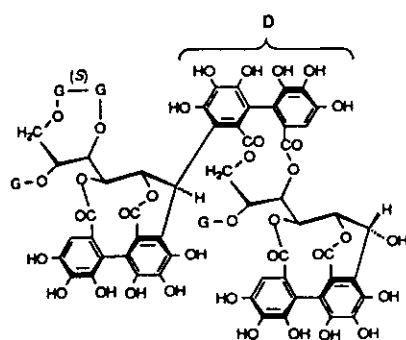
Oligómeros del tipo D(OG)₂



oenoteina A (19)

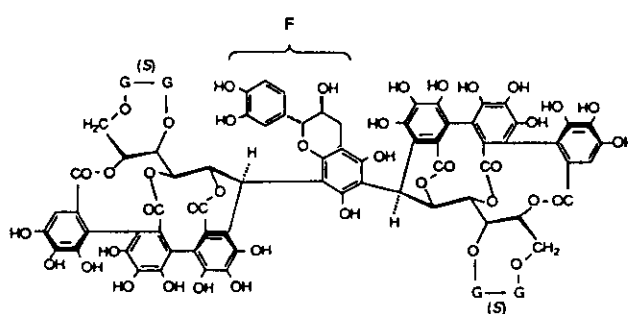
euforbina C, R=R'=(S)-HHDP (20)
euforbina D, R=R'=G (21)

Tipo CD



alienanino B (22)

Tipo CFC



anogeissinina (23)

FIGURA II.4 Continuación

* Oligómeros del tipo GOD (tipo 3). En esta clase de elagitaninos, la unidad estructural básica tiene el grupo sanguisorboilo (fig. II.3), en el cual el oxígeno del enlace éter pertenece al hidroxilo del grupo galoilo de uno de los monómeros. Entre el escaso número de elagitaninos descritos con este tipo de estructura, todos han resultado ser *meta*, como por ejemplo la sanguina H-6⁽¹⁷⁾, encontrada en hojas y frutos de *Rubus spp.* y la roshenina B⁽¹⁸⁾, identificada en varias especies del género *Rosa*; ambos taninos son del subtipo *m*-GOD (1-4',6') (fig. II.4).

* Oligómeros del tipo D(OG)₂ (tipo 4). La molécula oligomérica de un elagitanino de este tipo tiene dos hidroxilos del grupo HHDP (D) formando ambos enlaces éter con sendos grupos galoilo. Se han descrito dos tipos de isómeros, según la posición de los enlaces éter respecto del grupo HHDP: *m,m'*-D(OG)₂ y *m,p*-D(OG)₂ (grupo euforbinoilo en fig.II.3). Ejemplos son la oenoteina A⁽¹⁹⁾ (*m,m'*-D(OG)₂ (4'-2,6'-2') + *m*-DOG(4,6-2')) y euforbina C⁽²⁰⁾ y D⁽²¹⁾ (*m,p*-D(OG)₂(3,6-2'-1')) identificadas en hojas de *Oenothera biennis* y *Euphorbia spp.*, respectivamente (fig. II.4).

* Oligómeros compuestos de monómeros C-glucosídicos, unidos entre sí mediante enlaces C-C (tipo 5). En este caso, los monómeros del tipo C-glucosídicos se unen mediante enlaces C-C entre el C-1 del monómero C-glucosídico y bien un C de un grupo HHDP ó G del otro monómero (tipo CD ó CG); o bien a través de un residuo flavan-3-ol (tipo CFC). En fig. II.4 se muestra un ejemplo de cada tipo: la alienanina B⁽²²⁾ del tipo CD, aislada de hojas de *Quercus aliena* y la anogeisina⁽²³⁾ de tipo CFC, de corteza de ciertas Combretáceas.

2.2.2 Taninos condensados.

(Porter, 1989a; Hemingway, 1989a; Haslam, 1989; Hagerman, 1991; Porter, 1992)

Los taninos condensados son oligómeros y polímeros de flavanoles, los cuales están formados generalmente por cadenas de unidades flavan-3-ol⁽²⁶⁾, unidas entre sí mediante enlaces carbono-carbono (C-4/C-8 ó C-4/C-6) no susceptibles de hidrólisis. Cuando este

tipo de taninos se calientan en medio fuertemente ácido y en presencia de iones metálicos, los cuales actúan como catalizadores, la unión interflavánica se rompe oxidativamente, dando antocianidinas como productos de degradación (fig. II.5).

Por ello los taninos condensados son designados también como proantocianidinas, término sustitutivo del antiguo de leucoantocianidinas. Esta última denominación está reservada actualmente para nombrar a los flavonoides monoméricos flavan-3,4-diol⁽²⁴⁾ y flavan-4-ol⁽²⁵⁾, compuestos, por otra parte, muy poco frecuentes en la naturaleza y que son altamente reactivos, transformándose por tratamiento ácido y por autooxidación, sin calentamiento, en antocianidinas⁽²⁷⁾ y 3-desoxiantocianidinas⁽²⁸⁾, respectivamente (Watterson y Butler, 1983). Por el contrario, los monómeros flavan-3-ol o catequinas no se transforman en antocianidinas bajo dichas condiciones y, por tanto, no son considerados leucoantocianidinas.

2.2.2.1 Variaciones estructurales en las proantocianidinas oligoméricas.

Patrones de hidroxilación. Las proantocianidinas son clasificadas según los patrones de hidroxilación de sus anillos aromáticos A y B (fig. II.6). Las propelargonidinas, procianidinas y prodelfinidinas llevan anillos A floroglucínolicos en las unidades monoméricas más ampliamente representadas en la cadena polimérica, y se nombran según la antocianidina generada por el tratamiento con ácido. Los 5-desoxianálogos respectivos, por tanto, con anillo A de tipo resorcinol, son las denominadas proguibourtinidinas, profisetinidinas y prorrobnetidinas, según sea la variante del flavan-3,4-diol constituyente de la cadena oligomérica. Existen, además, otras clases de proantocianidinas, como las proteracacidinas, promelacacidinas, proapigenidinas y proluteolinidinas las cuales son muy rara vez encontradas en la naturaleza.

Los taninos aislados de la mayoría de las plantas corresponden casi siempre a uno o varios de los tipos de las citadas proantocianidinas, siendo, con diferencia, las

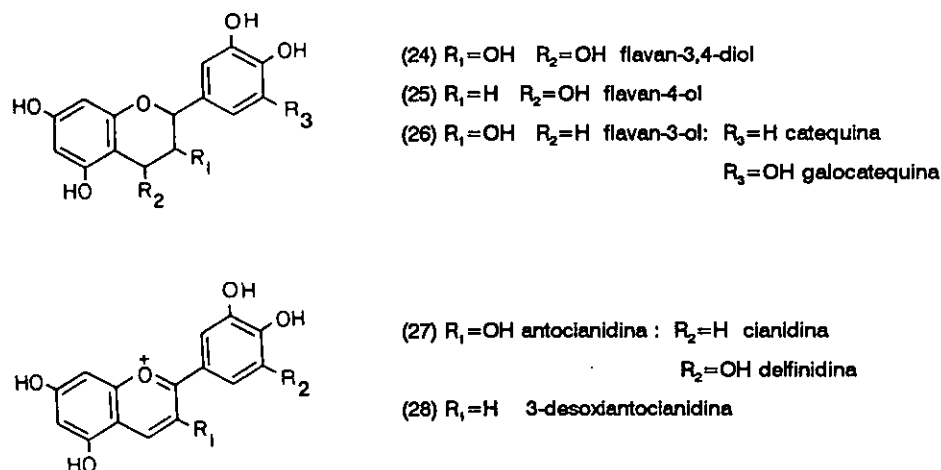
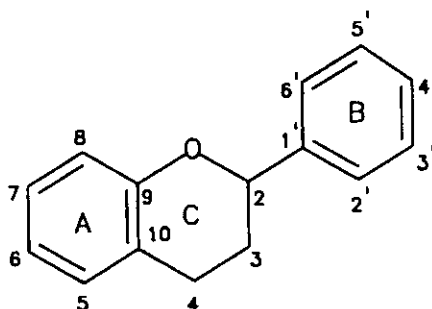


FIGURA II.5 Estructura general de los flavanoles y antocianidinas.



Unidad monomérica	Clase de proantocianidina	Patrón de hidroxilación
Afzelequina	Propelargonidina	3,4',5,7
Catequina	Procianidina	3,3',4',5,7
Galocatequina	Prodelfinidina	3,3',4',5,5',7
Guibourtinidol	Proguibourtinidina	3,4',7
Fisetinidol	Profisetinidina	3,3',4',7
Robinetinidol	Prorobinetinidina	3,3',3',5',7
Oritina	Proteracacidina	3,4',7,8
Prosopina	Promelacacidina	3,3',4',7,8
Apigeniflavan	Proapigeninidina	4',5,7
Luteoflavan	Proluteolinidina	3',4',5,7

FIGURA II.6 Estructura general de los flavanoles y patrones de hidroxilación de las principales clases de proantocianidinas.

procianidinas y prodelfinidinas las más abundantes y frecuentes.

Estereoquímica. Las unidades estructurales de las proantocianidinas presentan tres átomos de carbono asimétricos C-2, C-3 y C-4, haciendo así posible la existencia de diferentes formas estereoisómeras que complican el estudio de la estructura de estos compuestos.

El sistema de nomenclatura empleado es similar al sistema IUPAC para polisacáridos. La unidad monomérica en este tipo de polímeros es nombrada según el flavan-3-ol constituyente de la cadena polimérica. En la figura II.6 se especifican las denominaciones correspondientes a las unidades flavan-3-ol más comunes, en su forma estereoquímica absoluta (2R, 3S). Los correspondientes estereoisómeros (2R, 3R) se diferencian anteponiendo el prefijo "epi" al nombre de cada monómero, en figura II.7, catequina⁽²⁹⁾ y epicatequina⁽³⁰⁾. Por lo general, la configuración absoluta 2R es la más frecuente, pero se han descrito también unidades monoméricas y sus correspondientes proantocianidinas de configuración 2S. Se ha acordado distinguir el enantiómero 2S anteponiendo el prefijo *ent-* a la correspondiente denominación de la forma 2R (fig. II.7).

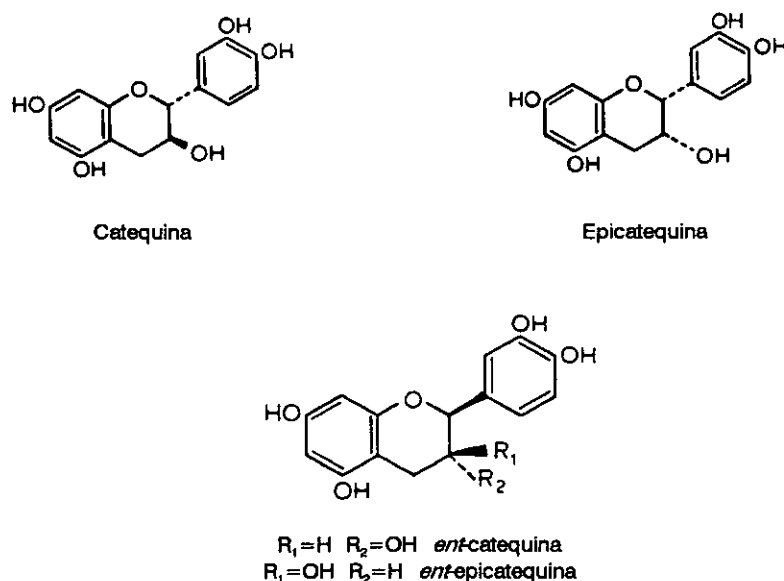


FIGURA II.7 Estructura de las formas estereoquímicas de flavanoles.

La estereoquímica del enlace interflavánico (α ó β), lleva también a la formación de diferentes estereoisómeros (fig. II.8) y depende, en gran parte, de los patrones de hidroxilación del anillo A. En las 5-desoxiproantocianidinas⁽³⁴⁾ es común la existencia de los estereoisómeros 3,4-*trans* (3S, 4R) ó (3R, 4S) y 3,4-*cis* (3S, 4S) ó (3R, 4R), en la misma proporción, pero, sin embargo, la formación de los enlaces interflavánicos en procianidinas^(31, 33) y prodelfinidinas⁽³²⁾ es muy estereoselectivo y concretamente las formas 3,4-*cis* (3R, 4R) están muy desfavorecidas.

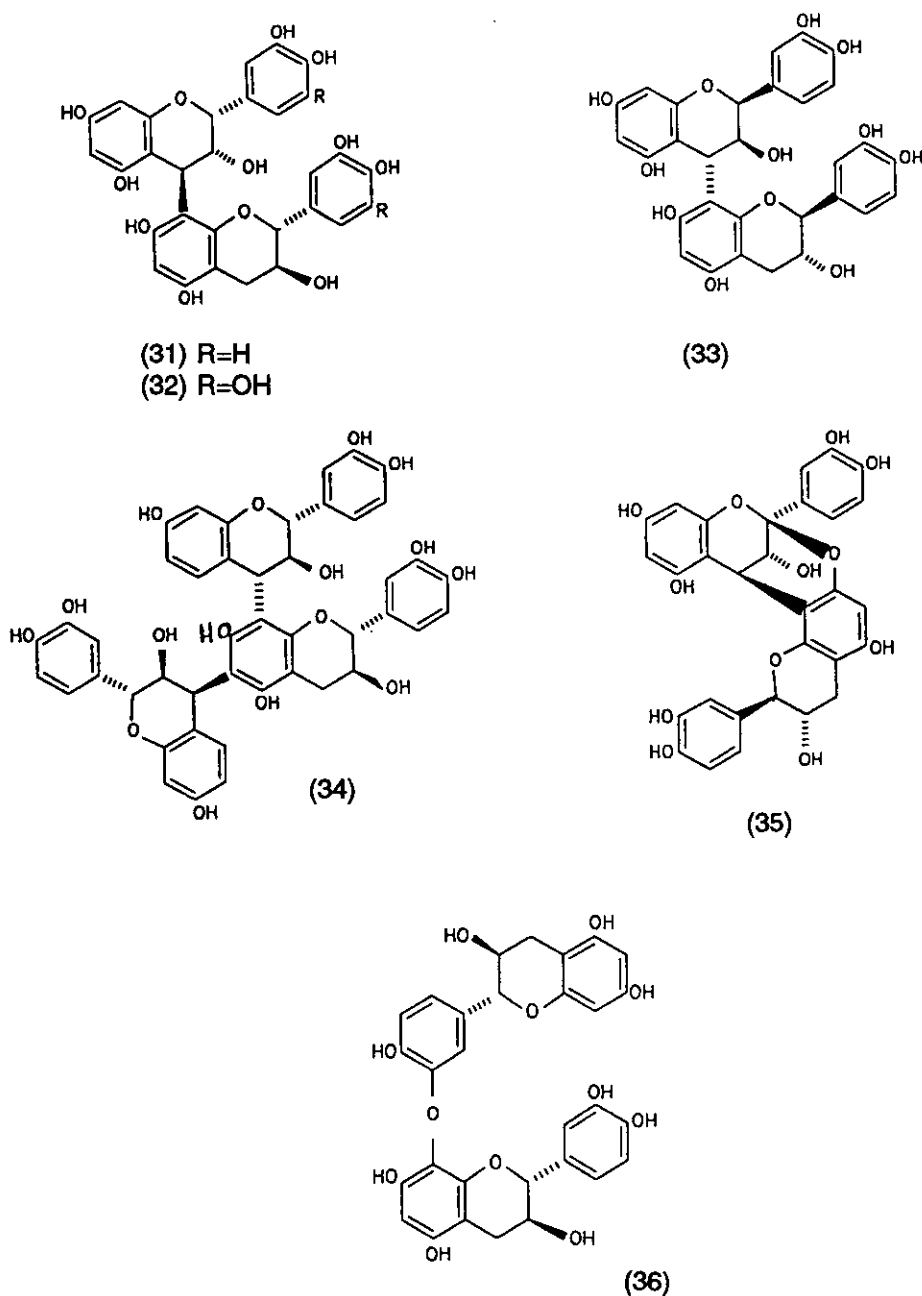
Enlaces interflavánicos. Las unidades de las proantocianidinas se unen entre sí mediante enlaces interflavánicos entre el carbono 4 del anillo C y el carbono 6 ó el 8 del anillo A (fig. II.8). En el caso de procianidinas y prodelfinidinas el enlace C-4/C-8 es el más común^(31, 32, 33) pero también suele estar presente el C4/C-6 en una proporción relativa de 1:3 siendo los polímeros generalmente lineales.

En lo que concierne a las 5-desoxiproantoanidinas, profisetinidinas y prorrobnetinidinas, la unión C-4/ C-6 es la más favorecida⁽³⁴⁾ y los polímeros son de tipo angular.

Otra variante estructural relativamente común de las proantocianidinas con anillo A del tipo floroglucinol, es la formación de un segundo enlace interflavánico surgido del acoplamiento oxidativo C-O entre el C-2 de una unidad y el O-5 u O-7 de la otra⁽³⁵⁾ (fig. II.8).

Existen otros productos oligoméricos resultantes del acoplamiento oxidativo de flavan-3-ol. Así, en los dímeros (catequina)₂ las uniones se realizan entre el anillo B de la unidad superior y el A de la otra unidad estructural, mediante enlaces éter⁽³⁶⁾ (fig. II.8). Por ejemplo, de C-2' a C-8; de C-6' a C-8; de C-2'a C-6 y otros.

Derivados de proantocianidinas. Las proantocianidinas pueden encontrarse en los



- (31) epicatequina-(4β→8)-catequina o procianidina B-1
- (32) epigalocatequina-(4β→8)-galocatequina
- (33) ent-epicatequina-(4β→8)-ent-catequina
- (34) fisetinidol-(4α→8)-catequina-(6→4b)-fisetinidol
- (35) epicatequina-(4β→8; 2β→0→7)-catequina A-2
- (36) catequina-(3'→0→8)-catequina

FIGURA II.8 Estructura de los estereoisómeros de proantocianidinas.

vegetales formando diferentes tipos de derivados. Se han descrito recientemente O- y C-glicósidos, derivados C- y O-metilados y galatos de proantocianidinas. Además se ha aislado una serie de productos de condensación o sustitución en los carbonos 6 y 8 de los anillos A de las proantocianidinas, que se forman como consecuencia del elevado carácter nucleófilo de los anillos de tipo floroglucinol y resorcinol.

2.3 Propiedades químicas

2.3.1 Taninos hidrolizables.

La determinación de la estructura de los taninos hidrolizables oligoméricos se ha basado, en gran medida, en sus posibilidades de degradación química y en el estudio de los productos obtenidos, mediante técnicas espectroscópicas. Las principales reacciones degradativas, propias de los taninos hidrolizables son las siguientes:

Hidrólisis. Los taninos hidrolizables son compuestos fácilmente hidrolizables, debido a su estructura de ésteres. Mediante calentamiento a reflujo en medio ácido o básico se produce la ruptura completa de los enlaces éster, con liberación del poliol y de los ácidos gálico, elágico u otros, integrantes de la molécula (Porter, 1989a). Hay que tener en cuenta que las condiciones y el tiempo necesarios para la hidrólisis van a depender considerablemente de los ácidos fenólicos constituyentes. Incluso se puede conseguir la especificidad de ruptura de los diferentes enlaces éster, variando las condiciones de reacción. Por ejemplo, los enlaces O-1-éster en dímeros del tipo dehidrodigaloil o valoneoil han podido ser hidrolizados selectivamente por calentamiento en agua a 60°C durante 2-3 días (Hatano *et al.*, 1986). De la misma manera, el equipo de Nishimura (1986) obtuvo la hidrólisis selectiva del enlace éster 4,6-HHDP a partir del tanino estenofinina A (catequín 8-C- β -D-bis-(2,3:4,6-(S))-HHDP-glucopiranósido) por tratamiento con agua a 20° C durante 24 horas, y Okuda *et al.* (1982) consiguieron la

escisión hidrolítica del enlace O-1-galoilo con ácido trifluoroacético.

Por otra parte, la metilación de los grupos hidroxilo fenólicos, anterior a la hidrólisis, puede aportar, en ocasiones, información adicional acerca de la estructura de estos taninos. Así, los enlaces O-1-éster de los dímeros de tipo dehidrodigaloilo o valoneoilo son particularmente susceptibles a la hidrólisis bajo dichas condiciones (Hatano *et al.*, 1986) .

Hidrólisis con el enzima tanasa. La hidrólisis mediante el enzima tanasa de *Aspergillus niger*, obtenida del hongo cultivado en medio enriquecido con ácido tánico, es una reacción que se da tanto en taninos hidrolizables como en proantocianidinas. Dicho enzima rompe específicamente los galatos, para producir ácido gálico y un poliol, en el caso de los taninos hidrolizables, o un flavanol, en el caso de las proantocianidinas. La reacción se ha utilizado para medir la proporción de unidades galoilo por unidad de poliol en los taninos hidrolizables (Haslam, 1982).

Metanolisis. En medio alcalino, esta reacción conduce a productos de degradación fenólicos metilados y se utiliza, en ocasiones, para romper específicamente enlaces éster depsídicos, los cuales son extremadamente débiles debido a la proximidad de los grupos hidroxilo de los núcleos aromáticos galoilo (Haslam, 1982).

2.3.2 Taninos condensados.

Las reacciones químicas de los taninos condensados vienen determinadas por la estructura de los anillos aromáticos A y B integrantes de las unidades básicas flavan-3-ol (fig. II.9). La reactividad del anillo A es de primordial importancia en la labilidad del enlace interflavánico y, por otra parte, en la utilidad de los taninos condensados para la fabricación de adhesivos; mientras que a la estructura del anillo B está asociada la capacidad de formar complejos con metales y propiedades antioxidantes de los taninos.

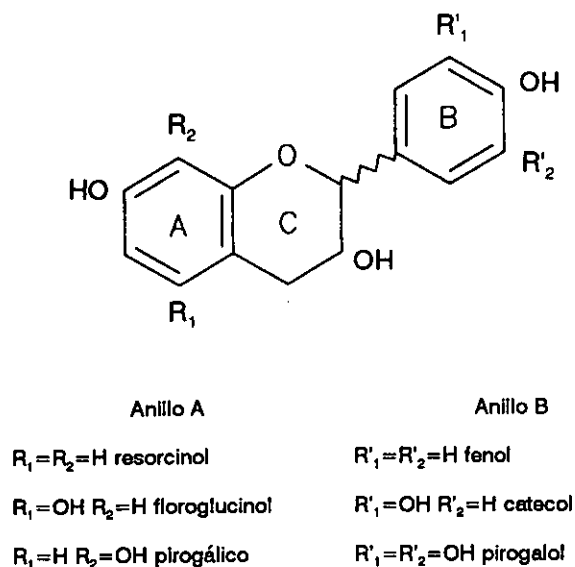


FIGURA II.9 Patrones de hidroxilación de los anillos A y B de las proantocianidinas.

2.3.2.1 Reacciones en el anillo A de las proantocianidinas.

Los patrones de hidroxilación del anillo A de las proantocianidinas son, generalmente, del tipo resorcinólico (7-hidroxi), floroglucinólico (5,7-dihidroxi) o pirogálico (7,8-dihidroxi) (fig. II.9), y condicionan, en gran medida, no sólo la naturaleza y facilidad de las reacciones químicas del propio anillo A, sino también de los enlaces interflavánicos y del anillo B.

Las reacciones más comunes que se dan en el anillo aromático A son sustituciones aromáticas electrófilas, influidas por los efectos electrónicos y estéricos de los grupos hidroxilo. Estos hidroxilos fenólicos son potentes donadores de electrones, y producen un incremento de la densidad electrónica del anillo A o, lo que es lo mismo, el aumento del carácter nucleófilo de dicho anillo; lo que supone la estabilización de los carbocationes resultantes del ataque electrófilo en las posiciones *orto* y *para* respecto de los grupos hidroxilo (McGraw, 1989; Tobiason y Hoff, 1989).

Las posibles reacciones de sustitución electrófila en el anillo A de las proantocianidinas son numerosas, pero las investigaciones en esta línea se han orientado, principalmente, hacia aquellas que han suscitado interés desde los tres puntos de vista siguientes: utilidad en la industria química (condensación con aldehídos), utilidad en la elucidación de la estructura química de los taninos (halogenación, alquilación, y otras) y, por último, por tratarse de reacciones que tienen lugar en la naturaleza, ya sea implicando a taninos o a sus precursores (C- y O-glicosilación) (McGraw, 1989).

Así entre las reacciones mas importantes a considerar están:

Halogenación. Este tipo de reacción es utilizada en el estudio de la reactividad de los sistemas aromáticos y, concretamente en el caso de los taninos condensados, para la determinación de los puntos de unión o enlaces entre las unidades flavánicas. Por ejemplo, Hundt y Roux (1978) utilizaron la bromación degradativa para determinar el lugar de unión en los 4-flavanil-flavan-3,4-dioles. Los dímeros tienen una unidad superior resorcinólica y una inferior floroglucinólica y el bromo entra en el anillo A floroglucinólico en el lugar de unión de la unidad inferior produciéndose el desplazamiento de dicha unidad.

Reacción con aldehídos: formaldehído. La importancia de este tipo de reacciones radica en que los taninos pueden ser utilizados como sustitutos del fenol en la obtención de las resinas adhesivas fenol-formaldehído. Así, en la síntesis de estas resinas, el formaldehído u otros aldehídos, son adicionados al tanino, en medio ácido o básico, produciéndose entrecruzamiento, vía grupos metileno, entre los anillos A de las unidades flavánicas, tal y como ocurre en la obtención de las clásicas resinas fenol- o resorcinol-formaldehído.

Existe una considerable diferencia de reactividad entre los anillos A de tipo resorcinólico y los de tipo floroglucinólico, siendo mucho mayor la de estos últimos. La

extremada reactividad de los taninos de tipo floroglucínico limita, en gran medida, su utilización como sustitutos del fenol en los sistemas de adhesivos, resultando más adecuados los taninos de tipo resorcinol (Hillis y Urbach, 1959; Roux *et al.*, 1975; Hemingway y McGraw, 1978; Porter, 1989b).

Las dificultades asociadas a la utilización del formaldehído, especialmente con los taninos de tipo floroglucinol, han llevado a la investigación de las posibilidades de una amplia variedad de aldehídos en cuanto a su capacidad de entrecruzamiento. El furfuraldehído, por ejemplo, reacciona con bastante lentitud con los taninos de tipo floroglucinol (Pizzi *et al.*, 1980; Pizzi, 1992).

Alquilación. Entre este tipo de reacciones cabe destacar las de condensación con metilolfenoles y flavanilos.

- Metilolfenoles: estos compuestos han merecido especial atención en la fabricación de adhesivos como agentes de entrecruzamiento de taninos condensados, tanto de tipo resorcinólico como de tipo floroglucínico (Pizzi, 1983 y 1992). Es de señalar que las condensaciones de los metilolfenoles en los sistemas de floroglucinol son significativamente más lentas que la condensación con formaldehído.

- Flavanilos: la alquilación de flavanoles con grupos flavanilo ha sido utilizada para la síntesis de flavanoles oligoméricos y también en la elucidación de la estructura de los taninos condensados (Botha *et al.*, 1981, 1982; Viviers *et al.*, 1983). La reacción de alquilación supone la generación de los grupos electrófilos flavanil-4-carbocation, a partir de flavan-3,4-diol, bajo condiciones de acidez y temperatura ambiente. Estos grupos electrófilos alquilan a los nucleófilos flavan-3-ol de tipo floroglucínico o resorcinólico.

La reacción de alquilación presenta una alta selectividad de posición y

estereoselectividad, de forma que se favorecen unas posiciones e isómeros determinados, según el tipo de anillo A de que se trate. En la figura II.10, se muestra como ejemplo la síntesis, por condensación en medio etanol ácido, de un oligómero de melacacidina, que es un flavan-3,4-diol que contiene un anillo A de pirogalol (Foo, 1985). El ataque del flavan-4-carbocatión a la posición C-6 del anillo A conduce a la formación del polímero.

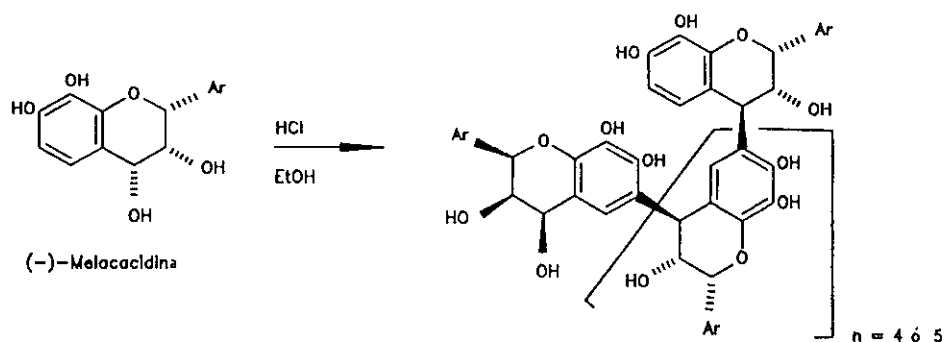


FIGURA II.10 Condensación de melacacidina, catalizada por ácido. n=4 ó 5

Reacción de sustitución. Una de las reacciones de sustitución a considerar es la referente al intercambio de hidrógeno por deuterio en el anillo A. Esta viene catalizada por una base e implica tautomería cetoenólica, llevándose a cabo con facilidad tanto en anillos A de tipo resorcinol, como floroglucinol (Furlong y Nudlemann, 1983; Kiehlmann *et al.*, 1988).

Acoplamiento oxidativo. El acoplamiento oxidativo a través de los anillos A de (+)-catequina y (+)-mesquitol, en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$ ha posibilitado la síntesis de biflavanoles o triflavanoles (fig. II.11) (Young *et al.*, 1987), compuestos que ya habían sido aislados previamente de fuentes naturales (Jacobs *et al.*, 1983). Resulta pues evidente la preferencia del acoplamiento del C-5 del (+)-mesquitol con el C-8 de la (+)-catequina, lo cual se atribuye a la facilidad de generación de radicales en el C-5 del anillo A del (+)-mesquitol, con el consiguiente aumento de nucleofilia, a la vez que en la (+)-catequina queda reducido el impedimento estérico del C-8 respecto del C-6.

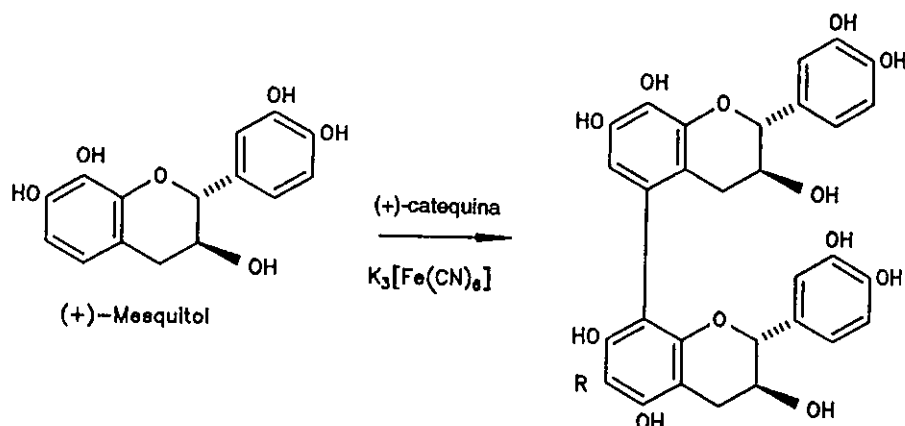


FIGURA II.11 Acoplamiento oxidativo de (+)-mesquitol y (+)-catequina. R=H, R=mesquitilo.

Otras reacciones que intervienen en la formación de productos naturales comunes. Se puede esperar la existencia de una amplia variedad de productos naturales derivados de proantocianidinas o de flavan-3-oles, ya que los anillos A integrantes de sus moléculas pueden sufrir con facilidad sustituciones por grupos electrófilos y, por ello, condensaciones en los carbonos o en los oxígenos fenólicos del anillo A en cuestión. Así, son frecuentes, por un lado, los derivados metilados en los hidroxilos del anillo A, y, por otro, los O-glicósidos derivados de flavanoles y de proantocianidinas, a su vez diversos, dependiendo de la parte hidrocarbonada y del lugar de unión entre ésta y la proantocianidina. Entre los azúcares mas comunes presentes en estos glicósidos están glucosa, xilosa, arabinosa y apiosa (Nonaka *et al.*, 1983a; Kashiwada *et al.*, 1986). Se ha postulado que el mecanismo de condensación podría consistir en el ataque nucleófilo del hidroxilo fenólico al carbono hemiacetálico del azúcar.

Han sido identificados también derivados C-glicosilados en el anillo A de catequina y epicatequina (Kashiwada *et al.*, 1986).

2.3.2.2 Reacciones del anillo B de las proantocianidinas.

En las proantocianidinas existen tres tipos de anillo B, según que el patrón de hidroxilación sea tipo fenol, catecol o pirogalol (fig. II.9). Las propiedades químicas de las proantocianidinas debidas al anillo B son las propias de fenoles, y, por lo general, la reactividad y también la complejidad de las reacciones se incrementa con el número de grupos hidroxilo. Si comparamos fenol, catecol y pirogalol, se da, en este orden, un aumento del carácter ácido, de la reactividad con grupos electrófilos en las reacciones de adición y sustitución, y del poder reductor.

Las características químicas de los taninos condensados debidas al anillo B han sido estudiadas, por lo general, tomando como referencia flavanoles monoméricos modelo, tales como catequina, y así se consideran como principales las siguientes (Laks, 1989a):

Oxidación. La oxidación es un aspecto muy importante de la química de todos los fenoles, incluidos los poliflavonoides. En las plantas, las rutas biosintéticas de muchos metabolitos complejos implican etapas de acoplamiento oxidativo, lo cual explica la importancia de estas reacciones.

Los productos que se forman por oxidación de fenoles varían dependiendo de la naturaleza y de los sustituyentes del anillo aromático B y del tipo de agente oxidante utilizado. En general, fenoles con las posiciones *orto* y *para* libres reaccionan con el oxidante (un e^-) para dar radicales aroxilo, que se estabilizan por resonancia. La oxidación puede posteriormente continuar, dando lugar, bien al acoplamiento C-C, o bien a la formación de enlaces éter (fig. II.12). Catecol y pirogalol pueden ser oxidados de la misma manera que el fenol, pero, además, por pérdida de dos e^- pueden transformarse en la ortoquinona correspondiente y por acoplamiento oxidativo C-C o C-O formar productos complejos, como se muestra en la fig. II.13 ^(38,39,40 y 41).

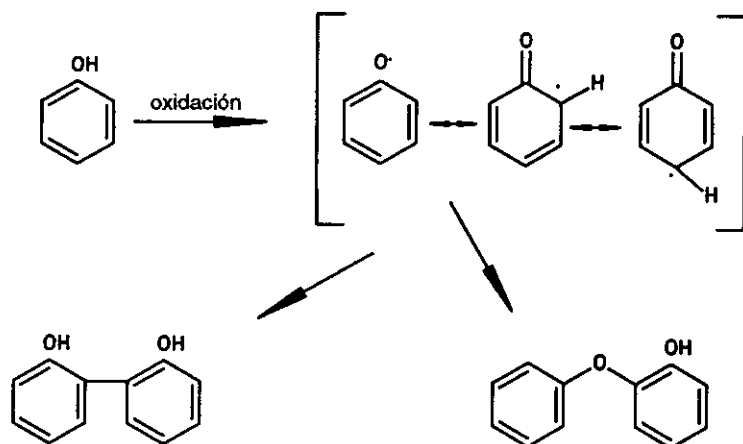


FIGURA II.12 Mecanismo de oxidación de fenol.

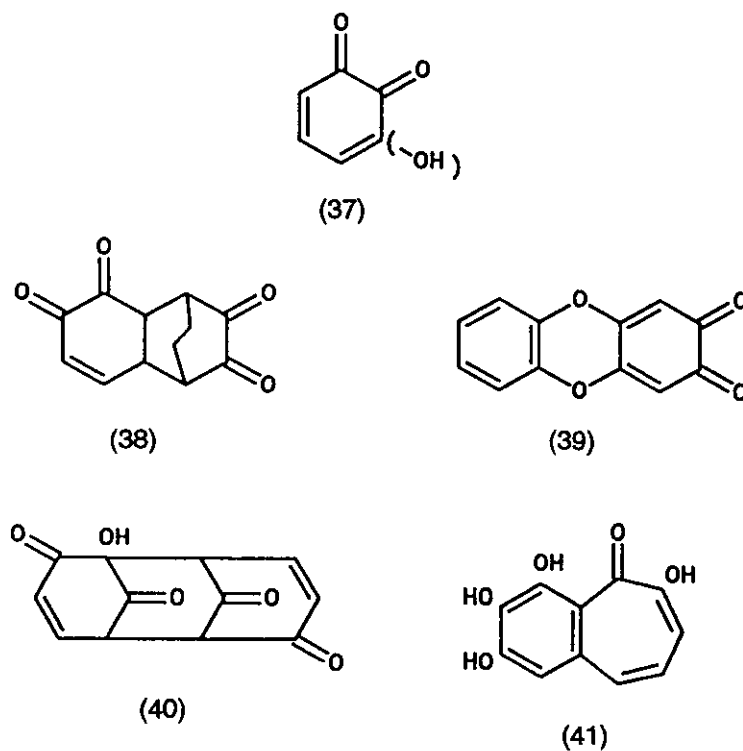


FIGURA II.13 Productos del acoplamiento oxidativo de catecol y pirogalol.

La mayoría de los fenoles pueden oxidarse también dando productos poliméricos, particularmente en presencia de óxidos metálicos, y algunas de las reacciones ocurren también si se trata de flavonoides.

Ha sido descrita la inducción de la oxidación de poliflavonoides por la luz (Duran *et al.*, 1985). En la corteza de *Pinus radiata* los polifenoles de elevado peso molecular resultaron rápidamente oxidados por fotólisis en presencia de oxígeno. Los productos de la oxidación presentaron un alto contenido de O₂ y de grupos carboxílicos, estos últimos formados, posiblemente, por ataque del oxígeno a los anillos aromáticos del flavonoide.

Bajo condiciones oxidantes, el anillo B de la catequina puede formar una ortoquinona, la cual puede reaccionar con nucleófilos como floroglucinol dando productos de adición (acoplamiento oxidativo), como se mencionó anteriormente para fenoles simples. Sin embargo, en ausencia del nucleófilo adicional, el anillo A de una segunda molécula de catequina puede reaccionar con el anillo B de la ortoquinona dando lugar a polímeros distintos (fig. II.14) (Ahn y Gstirner, 1970; Weinges *et al.*, 1971).

Formación de complejos con metales. La formación de quelatos por complejación de flavonoles con iones metálicos ha sido utilizada en la determinación de una amplia variedad de metales, así como también, en la determinación de la estructura y concentración de flavonoides (Sekhon *et al.*, 1983; Slabbert, 1992).

En el caso de las proantocianidinas se han descrito complejaciones con Al (III), Fe (III) y Cu (II) (Kennedy y Powell, 1985a, b; Slabbert, 1992). Particularmente en las poliméricas, la formación de precipitado se hace evidente a partir de un tamaño molecular determinado (aproximadamente 15 unidades).

A pesar de las grandes lagunas que hay en la química básica de las interacciones metal-proantocianidinas, se han investigado y llegado a patentar numerosas aplicaciones

de los taninos, basadas en las propiedades de quelación de dichos compuestos. Así, se han desarrollado protectores de madera basados en quelatos de cobre con taninos sulfonados extraídos de pino, o de otros varios metales con taninos de quebracho y acacia (Laks *et al.*, 1988).

Randall *et al.* (1974) han estudiado las posibilidades de utilización de cortezas de especies arbóreas con alto contenido en taninos, con objeto de eliminar metales pesados de aguas residuales industriales. Este autor contempla la regeneración del tanino, mediante tratamiento con ácido, basándose en el hecho de que la estabilidad de los complejos de metales con 3,4-dioles se incrementa con la alcalinidad.

Otras reacciones del anillo B. Una reacción que puede darse tanto con los flavonoides como con las proantocianidinas, con anillos B de tipo catecol, es la formación de cetales ⁽⁴²⁾ (fig. II.15), compuestos a los que se han atribuido importantes propiedades antibacterianas y fungicidas.

Por otra parte, el anillo B de las proantocianidinas ejerce una importante influencia sobre la reactividad del carbono 2 del anillo de pirano. En medio alcalino el anillo puede abrirse mediante una adición inversa de Michael, para dar un intermedio quinónico ^(43, 44) (fig. II.15) (Kennedy *et al.*, 1984). Este intermedio puede reaccionar con una amplia variedad de nucleófilos, tales como ácido sulfhídrico, resorcinol, floroglucinol y tioles, produciendo aductos cuya estructura básica es la 45 (fig. II.15) (Mayer y Merger, 1959; Laks y Hemingway, 1987).

2.3.2.3. Reacciones en el enlace interflavánico de proantocianidinas.

Una de las características mas importantes a tener en cuenta en el análisis de estructuras de las proantocianidinas poliméricas y, también en la síntesis de derivados de taninos de interés industrial, es la extraordinaria labilidad de los enlaces interflavánicos

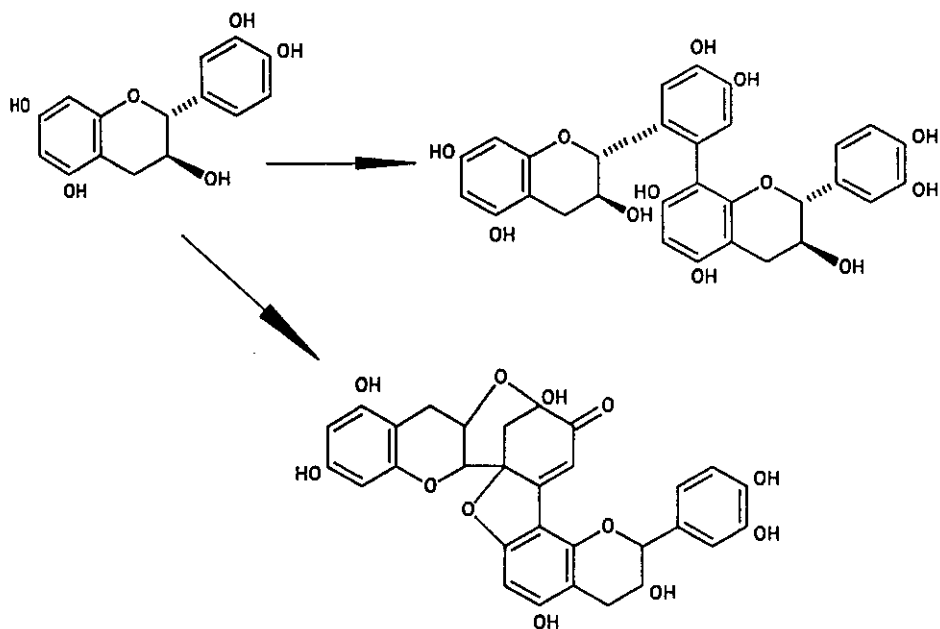


FIGURA II.14 Reacciones de acoplamiento oxidativo enzimático de catequina, sin la presencia de nucleófilo adicional.

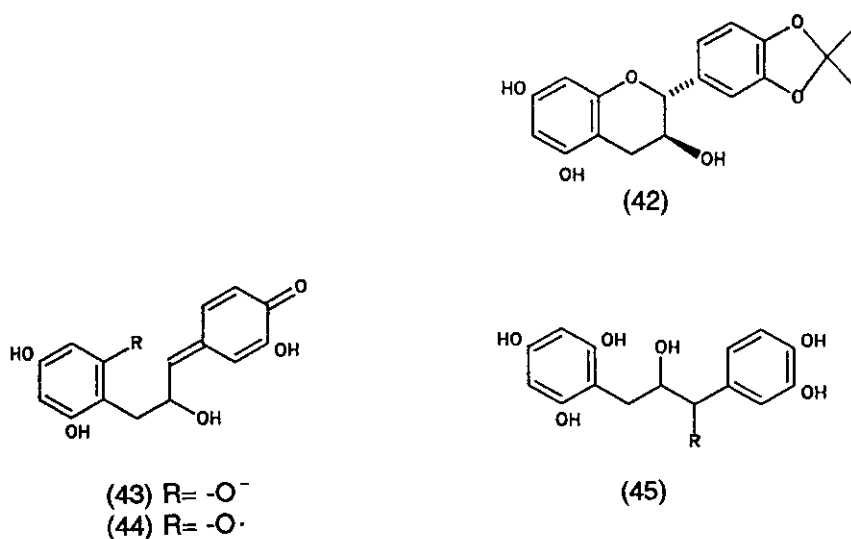


FIGURA II.15 Ejemplos de estructuras derivadas de la reactividad del anillo B de los flavanoles. (42) cetol. (43, 44) quinonas.

de las proantocianidinas con anillos A de tipo floroglucinol, respecto de la labilidad de los de tipo resorcinol (Heminway, 1989b).

Ruptura catalizada por ácido:

Formación de antocianidinas. Se considera que una de las reacciones propias de los taninos condensados más importante es la formación de antocianidinas, mediante ruptura del enlace interflavánico, llevada a cabo en medio alcohólico y en presencia de oxígeno (Swain y Hillis, 1959; Ribereau-Gayon, 1972; Porter *et al.*, 1986) (fig. II.16). Los taninos condensados con anillo A de tipo floroglucinol son particularmente susceptibles a dicha hidrólisis.

La conversión de taninos condensados en antocianidinas, aunque no es una reacción cuantitativa, se ha considerado como uno de los métodos de análisis más convenientes, y es ampliamente utilizada en la estimación de proantocianidinas en tejidos vegetales (Porter *et al.*, 1986). Estos autores propusieron la utilización de sulfato férrico amónico como catalizador, logrando aumentar así el rendimiento en antocianidinas y la reproducibilidad del ensayo.

Tiólisis. Son también importantes las reacciones de los taninos condensados con ácidos débiles, en presencia de diversos nucleófilos, entre ellos los tioles, como método de análisis de taninos condensados. En este caso se mantiene la estereoquímica de los carbonos C-2 y C-3 de la unidad básica del polímero (fig.II.17), produciéndose flavan-4- y proantocianidín-4-tioéteres oligoméricos (Betts *et al.*, 1967; Sears y Casebier, 1968; Kolodziej, 1990; Rigaud *et al.*, 1991).

La debilidad de los enlaces interflavánicos de las proantocianidinas depende de su estructura, lo que es de suma importancia para la interpretación de los resultados. Por ejemplo, polímeros con unidades flavánicas de configuración axial (enlaces $4\beta \rightarrow 8$), sufren

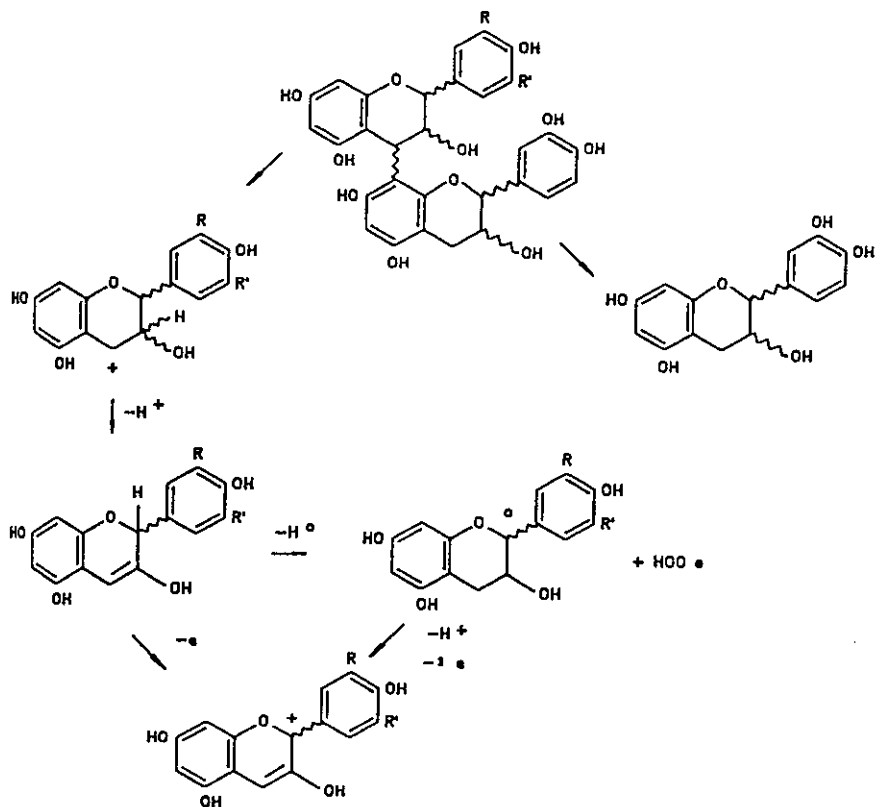
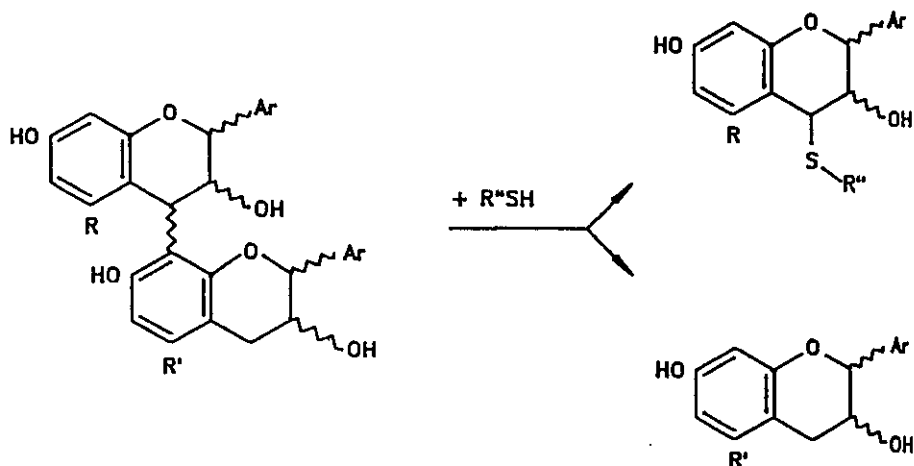


FIGURA II.16 Mecanismo de formación de antocianidinas a partir de taninos condensados, propuesto por Porter (1986).



Cuando el anillo A es:

R=H, R'=H no hay reacción.

R=H, R'=OH bajo rendimiento a 120° C.

R=OH, R'=H bajo rendimiento a 120° C.

R=OH, R'=OH rendimiento del 30% a 105° C.

Cuando la unidad superior tiene estereoquímica:

2,3-cis; aducto 3,4-trans

2,3-trans; aducto 3,4-trans > 3,4-cis

FIGURA II.17 Tiólisis de taninos condensados.

tiólisis más rápidamente que los que presentan unidades flavánicas de configuración ecuatorial (enlaces $4\alpha\rightarrow 8$).

Aplicaciones prácticas de la ruptura del enlace interflavánico. El futuro más prometedor en el aprovechamiento de los taninos condensados de tipo floroglucínico, estriba en el manejo de la labilidad específica de sus enlaces interflavánicos.

La mayoría de las procianidinas y prodelfinidinas encontradas en los extractos de productos naturales han podido ser sintetizadas. Para ello se han utilizado las mismas condiciones de la reacción de tiólisis explicadas anteriormente, con la diferencia de que, en este caso, el nucleófilo es un flavan-3-ol. Un ejemplo práctico de interés es el de la síntesis de diastereoisómeros de procianidinas, obtenidos a partir de taninos de palmera, mediante ruptura ácida y en presencia de epicatequina y *ent*-epicatequina (Foo y Porter, 1983).

Se ha estudiado también la posibilidad de sintetizar aductos procianidin-($4\beta\rightarrow 4$)-resorcinol, mediante reacción de taninos, extraídos de corteza de pino, con ácido acético y resorcinol. Aunque el resorcinol no es tan buen nucleófilo como el anillo A floroglucínico de los taninos, se producen los aductos epicatequín-($4\beta\rightarrow 4$)-resorcinol y procianidín-($4\beta\rightarrow 4$)-resorcinol, debido a que estos compuestos son comparativamente más estables que las procianidinas poliméricas con enlaces interflavánicos. Dichos aductos pueden ser, en muchos casos, directamente utilizados como sustitutos del resorcinol en los adhesivos para el encolado en frío de laminados de madera (Kreibich y Hemingway, 1985).

La síntesis de derivados de taninos, como 4-alkilsulfuro, pueden tener también interés por su actividad como biocidas (Laks, 1987).

Hidrogenolisis. La ruptura reductiva del enlace interflavánico o hidrogenolisis,

realizada sobre paladio o con borohidruro en medio alcalino, ofrece importantes posibilidades en la producción de flavan-3-oles y proantocianidinas de bajo peso molecular, a partir de procianidinas poliméricas. Al mismo tiempo transforma el grupo aldehído de los carbohidratos en un alcohol evitando, de este modo, la interferencia de estos componentes en la adherencia de los adhesivos tanino-base (Foo, 1982). Es conocido que uno de los principales problemas en el uso de taninos de coníferas en estos adhesivos es el alto contenido de carbohidratos coextraídos, los cuales interfieren seriamente en la capacidad adhesiva de estos preparados.

Sulfonación. Las proantocianidinas oligoméricas (por ejemplo, 5,7-dihidroxi-) reaccionan con ión sulfito produciéndose la ruptura del enlace interflavánico, formando flavan-4- o proantocianidín-4-sulfonatos (Foo *et al.*, 1983). Sin embargo, en el caso de la (+)-catequina la sulfonación se produce por apertura del anillo piranilo y formación del grupo ácido sulfónico en el carbono α del anillo B (Sears, 1972), siendo esta reacción el ejemplo clásico de los errores que se pueden cometer al generalizar las reacciones propias de los flavan-3-ol a los taninos condensados oligoméricos.

El hecho de que la sulfonación de las 5,7-dihidroxiproantocianidinas conlleve la ruptura del enlace interflavánico, y no la formación de sulfonatos poliméricos, tiene implicaciones importantes para la utilización de esta clase de taninos. La sulfonación puede ser aplicada para reducir el peso molecular de los taninos y obtener productos de condensación con aldehídos, de aplicación como adhesivos de madera (aldehído-tanino-base).

Ruptura de los taninos condensados por catálisis básica. Los enlaces interflavánicos de las proantocianidinas con anillos A de tipo floriglucinol son también altamente susceptibles a la ruptura en medio alcalino. En presencia de un nucleófilo como el toluen- α -tiol, se produce la rápida ruptura del enlace interflavánico acompañada, generalmente, de la ruptura del anillo piranilo con la subsiguiente isomerización y

formación de nuevos anillos piranilo, representados por el ácido catequínico (Laks, 1987; Kiatragrajai *et al.*, 1982). Ya que la mayoría de las formulaciones para adhesivos tanino-base suponen la solubilización en un medio de pH alto, estas reacciones de ruptura son particularmente importantes. El aspecto más importante de estas reacciones que tienen lugar en el desarrollo de adhesivos, es la facilidad de ruptura del enlace interflavánico, y posterior recondensación que pueden suponer redistribuciones y cambios de pesos moleculares y en el caso de las procianidinas y prodelphinidinas, pérdidas de funcionalidad del anillo floroglucinólico por la nueva disposición. En el caso de profisetinidinas y prorrobnetinidinas, la isomerización de los anillos podría inducir un incremento de reactividad con los aldehídos (Laks *et al.*, 1987).

2.4 Complejación de los taninos.

La singularidad de los taninos vegetales respecto de otros metabolitos secundarios radica no sólo en su naturaleza fenólica, sino también en la amplia variedad de tamaños moleculares que presentan. Ambas características determinan en gran medida la capacidad que tienen los taninos en cuestión para complejarse fuertemente con otros metabolitos de la planta, como proteínas (Haslam, 1989; Hagerman, 1989) y carbohidratos (Haslam, 1989, Ya *et al.*, 1989). Otros compuestos, entre ellos los alcaloides, pueden unirse también a dichos taninos, pero los efectos fisiológicos más importantes en el vegetal atribuidos a los taninos tienen que ver sobre todo con su capacidad de interacción con las proteínas.

Está claro pues, que el estudio de las propiedades de complejación de los polifenoles y, en particular, el relativo a la especificidad de la interacción con proteínas y carbohidratos, deberá aportar información esencial acerca del confuso papel de estas sustancias en el metabolismo de las plantas superiores.

Tales estudios son también de gran significación en muy diversos aspectos fuera del ámbito de la fisiología vegetal, como en el establecimiento de la importancia ecológica de los taninos y de su utilidad práctica. Por ejemplo, se reconoce que los taninos vegetales juegan un papel decisivo en la formación del humus y, en general, en el desarrollo del perfil de los suelos y, por otra parte, la astringencia, propiedad de los productos de plantas que contienen polifenoles influye notablemente en la aceptación y el valor nutricional de alimentos y bebidas. También depende de las propiedades de astringencia, la capacidad de curtido de pieles de animales, característica propia de los extractos vegetales que contienen taninos (Haslam, 1989; Hagerman, 1989).

2.4.1. Interacción con proteínas.

La formación de complejos tanino-proteína es la forma más común de interacción entre estos dos tipos de compuestos. Ello implica la aparición de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonílicos peptídicos de la proteína y los grupos hidroxilo fenólicos del tanino, sin la intervención de enlaces iónicos o covalentes (Gustavson, 1954; Loomis y Battaile, 1966; Hagerman y Butler, 1981). Esta interacción debida a enlaces de hidrógeno viene reforzada por las interacciones hidrofóbicas entre regiones no polares de ciertos aminoácidos de las proteínas, como la fenilalanina, y las regiones no polares aromáticas del tanino (Oh *et al*, 1980; Mc Manus *et al.*, 1985).

La interacción tanino-proteína se caracteriza por su especificidad, determinada tanto por la proteína (Hagerman y Butler, 1981) como por el tanino (Asquith y Butler, 1986).

Esta interacción específica depende en primer término de la naturaleza química de ambos componentes, resultando ser determinantes no solo las estructuras químicas primarias (presencia de grupos reactivos) sino también otras características moleculares, como el tamaño y estructura secundaria o tridimensional, las cuales pueden resultar

factores decisivos en la formación de los complejos con la proteína.

Los taninos y las proteínas son multivalentes en cuanto que presentan en sus moléculas varios posibles lugares susceptibles de formación de enlaces de hidrógeno o de interacciones hidrofóbicas. En lo que a las proteínas se refiere, éstas difieren considerablemente en su afinidad por un determinado tanino y, precisamente, el tamaño relativo y/o la estructura abierta y flexible de algunas proteínas podrían explicar la considerable mayor afinidad que presentan por el tanino.

Por otra parte, en la formación del complejo tanino-proteína resultan también decisivas las condiciones de la reacción como pH, temperatura, composición del disolvente y tiempo de reacción. Por ejemplo, la precipitación de proteínas por taninos es dependiente del pH, existiendo un pH óptimo, que coincide aproximadamente con el punto isoeléctrico, PI, de dicha proteína (Hagerman y Butler, 1978). Esta dependencia apoya la hipótesis de la implicación de enlaces de hidrógeno en la interacción tanino-proteína; así como también está de acuerdo con el hecho de que la composición del disolvente puede ser un factor determinante en la formación del complejo tanino-proteína. Estos complejos no pueden ser disociados por tratamientos con tampones acuosos, pero sí por detergentes, inhibidores de enlaces de hidrógeno, o disolventes hidrófobos (Hagerman y Butler, 1980b; Martin y Martin, 1984). Además, cuando la proporción tanino/proteína y el pH son óptimos, los complejos que se forman son de elevado peso molecular e insolubles en solución acuosa (Calderon *et al.*, 1968; Hagerman y Butler, 1978 y 1980a).

En cuanto a la influencia de la composición en aminoácidos de la proteína destacaremos que las ricas en prolina, tales como el colágeno y las prolaminas, son las que presentan mayor afinidad por los taninos, ya que la prolina tiene un nitrógeno amino secundario y así el oxígeno adyacente es un buen aceptor del enlace de hidrógeno. El colágeno y sus derivados, tales como gelatina, son de importancia obvia en el fenómeno

de curtido de pieles y las prolaminas, en la fabricación de cerveza. Estas últimas proteínas son solubles en alcohol y están presentes en el grano de ciertos cereales incluyendo sorgo y cebada, los cuales a su vez contienen taninos que, bajo ciertas condiciones, se unen a las proteínas ricas en prolina (Asano *et al.*, 1982). Un tercer grupo de proteínas de reconocido interés, son las proteínas de la saliva, también ricas en prolina. Su alta afinidad por los taninos condiciona el consumo, por parte de los mamíferos, de las plantas que los contienen (Mehansho *et al.*, 1987).

Como se ha mencionado, la estructura del tanino puede influir también en la interacción tanino-proteína. Una de las características de las que cabría esperar una mayor influencia es la forma tridimensional de dicho tanino (McManus *et al.*, 1981, 1985). Sin embargo, en algunas ocasiones, se han atribuido afinidades de proteínas similares por ambos grupos de taninos, hidrolizables y condensados, a pesar de sus diferentes estructuras tridimensionales (Martin y Martin, 1983; Hagerman y Klucher, 1986). Tanto las moléculas de taninos condensados como hidrolizables llevan grupos *orto*-dihidroxifenólicos con alta afinidad por las proteínas, pero la estructura molecular de los elagitaninos es plana y redondeada, con los grupos fenólicos situados en la parte exterior, mientras que la de los taninos condensados presenta disposición en cadenas helicoidales.

El tamaño molecular del tanino sí es, sin embargo, un factor determinante de la interacción con la proteína y así, por ejemplo, los oligómeros de flavanoles deben contener al menos tres subunidades para ser efectivos como agentes curtientes (Roux, 1972).

En general, los estudios realizados sobre la interacción tanino-proteína se han llevado a cabo con compuestos purificados y han proporcionado importante información sobre la naturaleza de las interacciones y los factores que las afectan. Sin embargo, en muchos casos, estos estudios no son del todo satisfactorios y los resultados no pueden extrapolarse a otras condiciones. En el medio natural, debe considerarse la posibilidad

de efectos sinérgicos y antagónicos que se producirían al estar presentes mezclas de compuestos fenólicos en mezclas de proteínas. Así, por ejemplo, la velocidad de reacción en las interacciones tanino-proteína se ha visto influida considerablemente por la heterogeneidad del preparado tánico (Hagerman y Robbins, 1987). Por otra parte, las condiciones de reacción utilizadas en el laboratorio puede que no hayan sido, en muchas ocasiones, las adecuadas para una completa y global reproducción de las interacciones tanino-proteína, producidas en sistemas naturales o industriales. Así, durante el proceso de fabricación de bebidas alcohólicas, la polimerización oxidativa de fenoles hace que el tipo de compuestos fenólicos presente esté en constante variación (Asano *et al.*, 1984). También en aquellos sistemas biológicos en los que el tanino actúa reduciendo la digestibilidad, la interacción real de éstos con las proteínas es muy variable ya que a lo largo de su tránsito por el tracto gastrointestinal los taninos están sometidos a amplia variación de factores tales como pH y presencia de sustancias detergentes entre otros determinantes de la interacción tanino-proteína (Martín *et al.*, 1985).

2.5 Biosíntesis.

Las plantas vasculares terrestres sintetizan, además de polímeros estructurales mayoritarios como celulosa y lignina, una amplia gama de otros productos del metabolismo secundario: lignanos, ácidos fenólicos, taninos, alcaloides, terpenoides etc., cuya función en el vegetal para la mayoría de ellos es aún desconocida.

Se considera que, en términos generales, los productos del metabolismo secundario de las plantas tienen papeles importantes en su crecimiento y desarrollo, así como en sus mecanismos de respuesta a condiciones ambientales desfavorables. En particular, los taninos, aunque considerados inicialmente como meros productos de desecho, hoy en día son contemplados, principalmente, como parte del mecanismo de defensa general de los vegetales.

Elagitaninos y proantocianidinas son compuestos que presentan semejanza en muchas de sus propiedades biológicas, quizá en razón de que ambos tienen en común el ser capaces de precipitar proteínas, pero es obvio que sus rutas biosintéticas no tienen por qué ser coincidentes y, de hecho, son muy diferentes. Así, el precursor de los elagitaninos, el ácido gálico, parece ser biosintetizado directamente a partir del ácido siquímico, y sin embargo, las proantocianidinas son productos de las rutas biosintéticas generales: fenilpropanoides y malonil CoA. Por su implicación en el metabolismo general de los fenilpropanoides, se considera a dichas proantocianidinas como uno de los metabolitos mayoritarios más costosos para la célula vegetal, junto con la lignina y las proteínas, ya que a su formación se destina una parte significativa de la energía fotosintética. Por otra parte, la ruta de los fenilpropanoides, a la vez que lleva a la formación de las proantocianidinas, juega un papel importante en procesos metabólicos generales: así, la actividad de dicha ruta contribuye al mantenimiento de los niveles de nitrógeno inorgánico disponible, bajo condiciones limitantes de nitrógeno o de alta relación C/N. En la figura II.18 se ilustran las relaciones metabólicas de los taninos condensados y elagitaninos con otros biopolímeros mayoritarios de los vegetales (Lewis y Yamamoto, 1989).

2.5.1 Ruta biosintética de los ácidos siquímico y corísmico.

La biosíntesis de los ácidos siquímico y corísmico (fig. II.19) tiene lugar a partir de los metabolitos precursores fosfoenol-piruvato (PEP) y D-eritrosa-4-fosfato (E-4-P), productos de la glicólisis y del ciclo de las pentosas-fosfato, respectivamente. Estos intermediarios metabólicos se unen para dar el primer producto propio de esta ruta, el ácido 3-desoxi-D-arabinoheptulosónico-7-fosfato (DAHP), en una reacción catalizada por DAHP sintetasa (DS). El DAHP se transforma en 3-deshidrosiquimato (3-DHS) via 3-deshidroquimato (3-DHQ). En las siguientes transformaciones se producen, sucesivamente, ácido siquímico (SA), siquimil-3-fosfato (S3-P), 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (5-EPSP), y ácido corísmico (CA) (Dewick, 1985; Ganem, 1978; Floss, 1986).

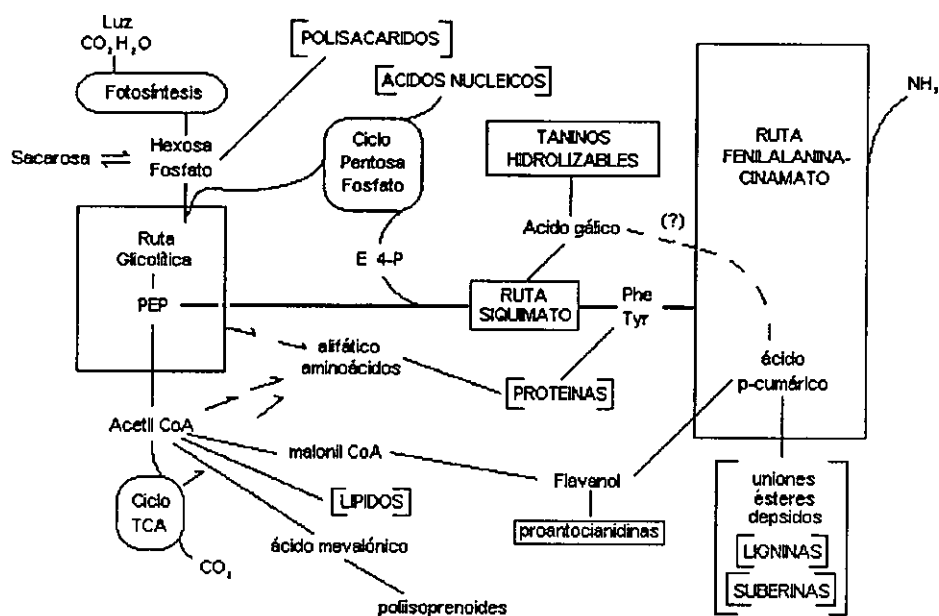


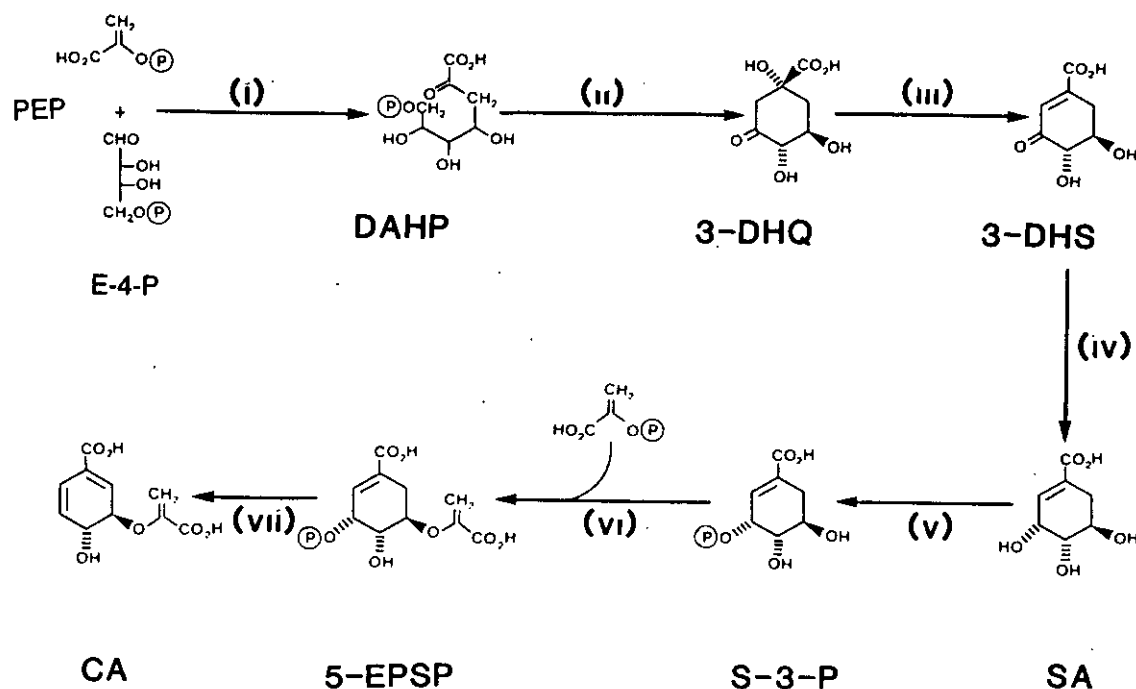
FIGURA II.18 Relación metabólica entre proantocianidinas y taninos hidrolizables, y otros biopolímeros (Lewis y Yamamoto, 1989).

Todas estas reacciones ocurren aparentemente en el compartimento plastídico de plantas superiores, pero también el citosol puede contener los enzimas responsables, aunque en niveles inferiores.

2.5.2 Ruta del ácido p-cumárico vía fenilalanina y tirosina.

La formación del ácido cumárico supone el punto de partida de la ruta general de los fenilpropanoides como se ilustra en la figura II.20.

La ruta de síntesis del ácido cumárico se conoce sólo en parte. Así, se sabe que el ácido corísmico sufre una reordenación 3,3' sigmatrópica catalizada por corismato mutasa, para dar ácido prefénico (Ganem, 1978; Dewick, 1985; Floss, 1986; Singh y Connelly,



- (I) Acido 3-desoxi-D-arabinoheptulosónico-7-fosfórico, (DAHP sintetasa)
- (II) 3-Deshidrosiquimato sintetasa
- (III) 3-Deshidrosiquimato deshidratasa
- (IV) Siquimato deshidrogenasa
- (V) Siquimato quinasa
- (VI) 5-Enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintetasa
- (VII) Corismato sintetasa

FIGURA II.19 Ruta biosintética de los ácidos siquímico y corísmico (Lewis y Yamamoto, 1989).

1985). Pero sobre el mecanismo de las siguientes transformaciones, que dan lugar a la fenilalanina y tirosina, existe aún una cierta confusión. En general, ha sido más o menos aceptado que en las plantas el ácido prefénico se transforma en fenilalanina y tirosina via transaminación de fenilpiruvato y 4-hidroxifenilpiruvato, respectivamente, aunque, muchas plantas herbáceas utilizan otra vía, a través de arogenato. El ácido cumárico se produce finalmente, por desaminación de los anteriores aminoácidos, bien sea directamente, o bien vía ácido cinámico (Lewis y Yamamoto, 1989) y, en cualquier caso, el nitrógeno de dicha desaminación puede ser reutilizado en otros procesos del metabolismo primario.

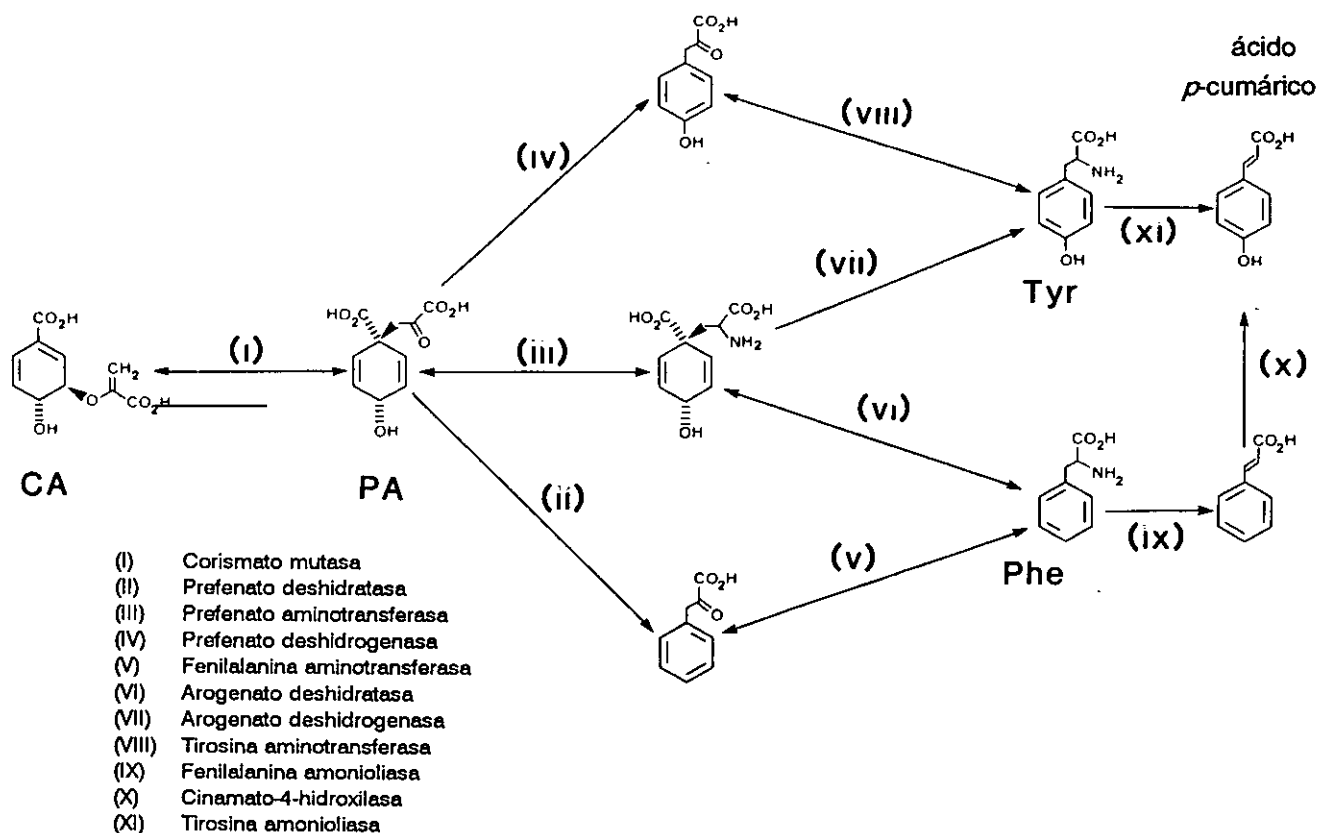


FIGURA II.20 Ruta biosintética del ácido *p*-cumárico a partir del ácido corísmico (Lewis y Yamamoto, 1989).

2.5.3 Biosíntesis de los galotaninos.

La ruta biogénica que conduce a la síntesis del ácido gálico es, en parte, aún desconocida, habiendo sido propuestas las tres rutas diferentes que se resumen en la figura II.21 (Haslam, 1989; Lewis y Yamamoto, 1989). Las rutas a y b suponen la síntesis del ácido gálico a partir de fenilalanina. En el primer caso (vía a) se postula una ruptura, por β -oxidación, de la cadena lateral del aminoácido dando un supuesto intermedio, ácido 3,4,5-trihidroxicinámico, que no ha sido encontrado nunca como producto natural en los vegetales (Zenk, 1964). De la ruta alternativa b, propuesta por El-Basyoani *et al.* (1964), es importante destacar que la serie de transformaciones que incluye: ácido cinámico \rightarrow ácido caféico \rightarrow ácido protocatéquico \rightarrow ácido gálico, no han sido puestas en evidencia en una misma especie vegetal.

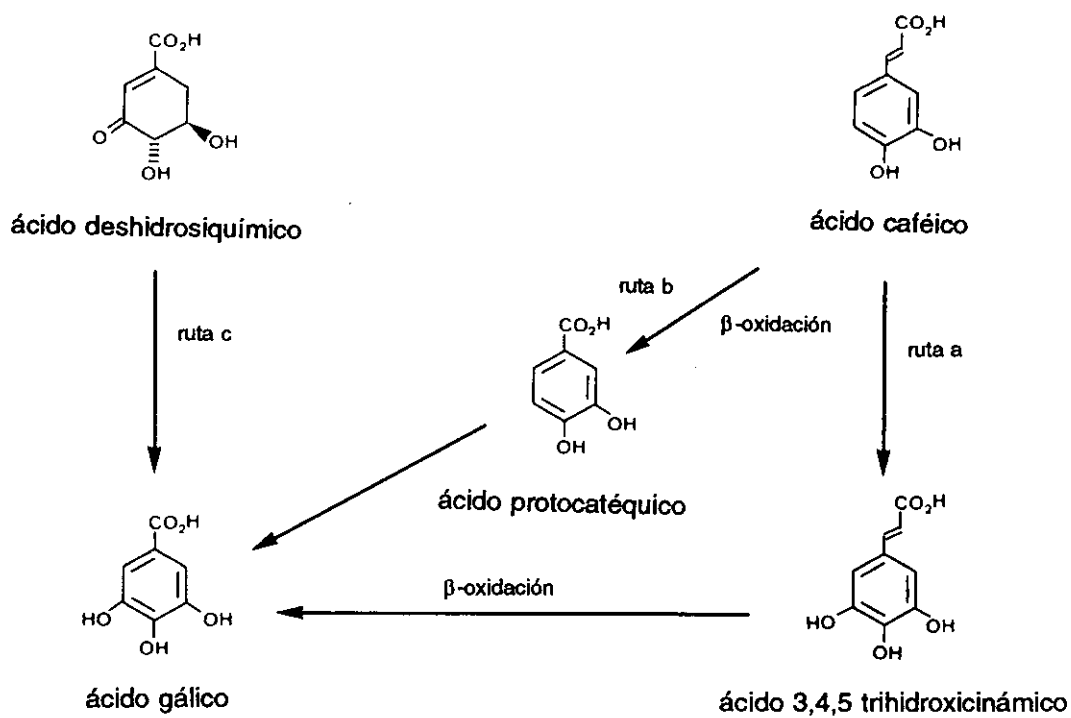


FIGURA II.21 Rutas biosintéticas propuestas para el ácido gálico (Lewis y Yamamoto, 1989).

Anteriormente, Conn y Swain (1961) habían sugerido que el ácido gálico se formaba directamente a partir del ácido siquímico vía ácido deshidrosiquímico (ruta c). Las posteriores investigaciones de Dewick y Haslam (1969), Saijo (1983) y Amrhein *et al.* (1984), apoyan también la idea de la biosíntesis del ácido gálico a partir del ácido siquímico y no de la fenilalanina como se acaba de exponer.

Las etapas posteriores a la formación del ácido gálico en la biosíntesis de los galotaninos se esquematizan en la figura II.22. Se ha establecido que el ácido gálico es activado por transesterificación, en la que interviene UDP-D-glucosa, y no derivados de CoA, para producir β -O-glucogalina⁽³⁰⁾ (Haddock *et al.*, 1982a,b,c; Haslam, 1982). La β -O-glucogalina sirve como donador y aceptor de electrones en las etapas siguientes de la

síntesis de β -glucopentagalina (Gross, 1983; Schmidt *et al.*, 1987). Los enzimas responsables de la catálisis son diferentes para cada etapa de la biosíntesis.

La información sobre la formación de enlaces *meta*-depsídicos en la biosíntesis de los galotaninos es escasa y poco concluyente. Parece ser que en este caso la activación del ácido gálico puede ocurrir vía el éster de CoA correspondiente (Gross, 1989).

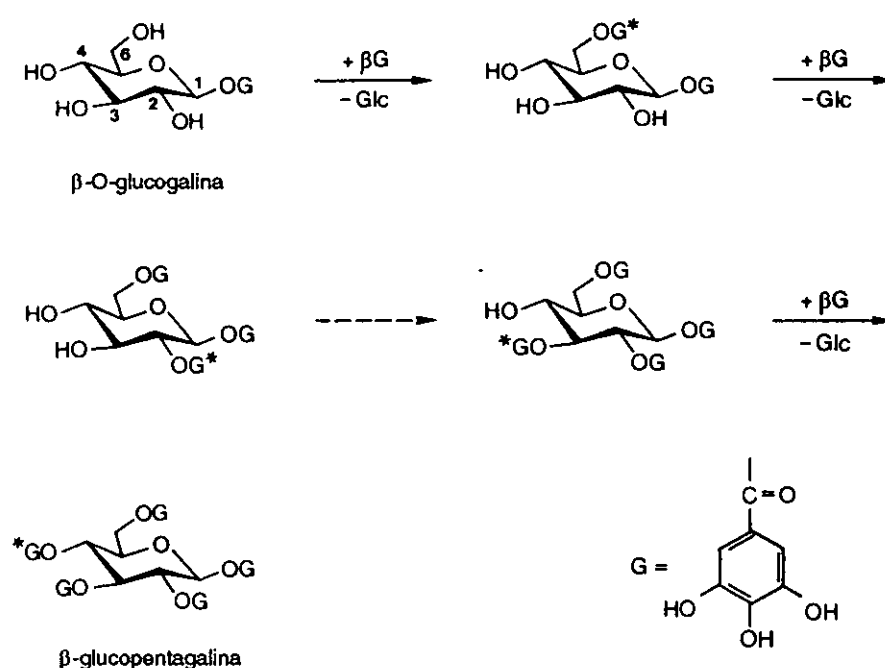


FIGURA II.22 Ruta biosintética de β -glucopentagalina. β G= β -O-glucogalina (Lewis y Yamamoto,1989).

2.5.4 Biosíntesis de elagitaninos y estructuras relacionadas.

Se desconocen, por el momento, los mecanismos implicados en el acoplamiento del grupo galoilo para formar el ácido hexahidroxidifénico, intermedio en la formación de una amplia gama de elagitaninos. Se ha sugerido que dicha biosíntesis se hace vía ruptura del anillo aromático seguida de procesos de oxidación y/o reducción (Hillis, 1985). La

enzimología de estos procesos y la secuencia de intermedios también son desconocidos en la actualidad.

En la figura II.23 se ilustran algunos de los metabolitos más comunes con D-glucosa como poliol (Porter, 1989a).

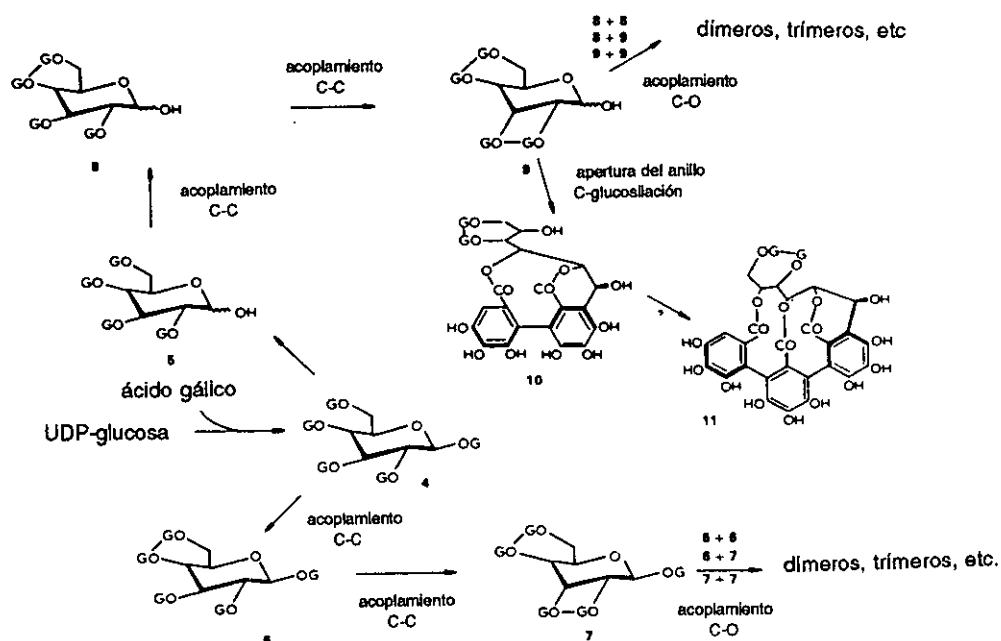


FIGURA II.23 Relación estructural y biosintética entre galotaninos y elagitaninos. G=galoilo, G-G=(S)-hexahidroxidifenilo, 4=β-1,2,3,4,6-pentagaloi-D-glucosa, 5=2,3,4,6-tetragaloi-D-glucosa, 6=eugenina, 7=casuarictina, 8=tellimagrandina I, 9=pedunculagina, 10=casuariina, 11=castalagina (Porter, 1989a).

2.5.5 Biosíntesis de taninos condensados.

La unidad básica de las proantocianidinas y de los flavan-3-ol relacionados consiste en una molécula flavanoidea C₆-C₃-C₆ que es sintetizada mediante una ruta biosintética doble que parte de malonil-CoA y 4-cumaroil-CoA (fig. II.24). Los grupos hidroxilo del anillo A proceden de las unidades acetato del malonil-CoA, mientras que los correspondientes a los anillos B y C proceden de hidroxilaciones específicas. Dos formas

estereoquímicas son comúnmente encontradas, el isómero 2,3-*trans* (2R, 3S) y el isómero 2,3-*cis* (2R, 3R), debidas a la estereoquímica del C-3. Aunque se han detectado compuestos de configuración 2S, la presente discusión sobre la biosíntesis se limitará para las formas 2R que son las más comunes. Además, se pondrá más énfasis en la ruta biosintética más usual y conocida, la referente a la biosíntesis de proantocianidinas con anillo A 5,7-dihidroxi y con uniones interflavánicas 4-8.

Por lo que respecta a las unidades de flavan-3-ol, éstas son sintetizadas según las siguientes etapas (fig. II.24): a) condensación de tres unidades C₂ procedentes de malonil-CoA con una unidad de 4-cumaroil-CoA (C₆-C₃) para formar la molécula flavanoidea base C₆-C₃-C₆, seguida de una isomerización que cierra el anillo C y estabiliza la estereoquímica del anillo B en el C-2; b) hidroxilación de las posiciones 3 y 3', y en algunos casos de la 5'; c) reducción de la 3-hidroxi flavanona al 3,4-diol (leucoantocianidina), seguida de una bifurcación de la ruta metabólica; d) algunas de las unidades 3,4-diol son reducidas a flavan-3-ol, mientras, e) otras se transforman en unidades de "extensión"; finalizándose con f) condensación en el C-4 de una o más unidades de "extensión", con el C-8 de una cadena preexistente o un flavan-3-ol iniciador de una nueva cadena (Grisebach, 1985; Heller y Forkmann, 1988; Stafford, 1989 y 1993).

Se conoce en la actualidad la enzimología, *in vitro*, de la biosíntesis de los 2,3-*trans*flavan-3-oles y de las proantocianidinas oligoméricas 2,3-*trans* excepto para la etapa de condensación final que conduce a la formación de los oligómeros.

La ruta de biosíntesis hasta 3,4-dioles (leucoantocianidinas) se solapa con la de las antocianidinas, y se ha postulado que la regulación de las rutas de flavan-3-ol y proantocianidinas corre a cargo de la primera etapa: la síntesis de la unidad C₆-C₃-C₆ por la acción de calcona sintetasa. Los responsables de la regulación parecen ser complejos multienzimáticos asociados con las vesículas del retículo endoplásmico (Hrazdina y Wagner, 1985; Ryder *et al.*, 1987).

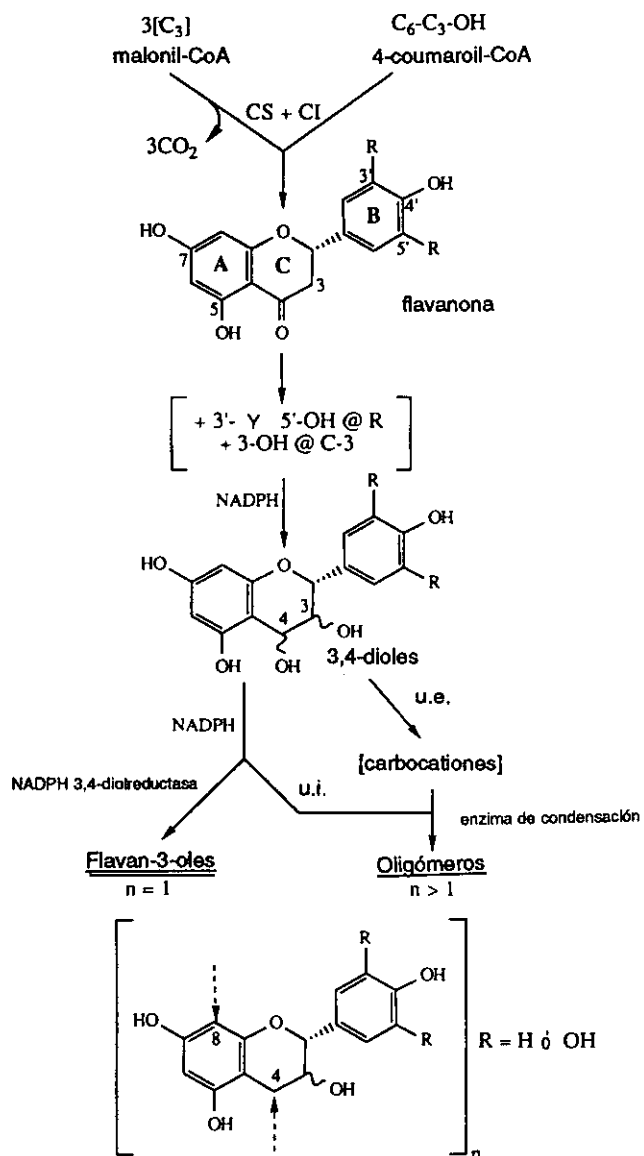


FIGURA II.24 Ruta biosintética de flavan-3-oles y proantocianidinas. R=H o OH; u.i.=unidad inicial; u.e.=unidad de extensión (Stafford, 1989).

Las etapas exclusivas para la ruta biosintética de flavan-3-oles y proantocianidinas, mostradas en la figura II.24, son las correspondientes a la formación de flavan-3-oles por la acción de reductasas dependientes de NADPH (Stafford y Lester, 1985) y las etapas postuladas de condensación para formar los oligómeros (Roux y Ferreira, 1985;

Hemingway y Laks, 1985). Se asume que el desconocido enzima condensante, que cataliza la última etapa de la biosíntesis de los oligómeros con su correspondiente estereoisomería, contiene lugares de reunión para las dos formas de flavan-3-ol, unidad inicial y terminal de la cadena, y para el carbocación quinónico intermedio, derivado de los 3,4-dioles.

2.6 Significación biológica de los taninos.

La importancia biológica de los taninos se extiende, al menos, en dos amplios aspectos: a) el correspondiente a su función como metabolitos especializados del vegetal, y b) aquellos relativos a los efectos reales y potenciales que produce la planta que los contiene, según ésta vaya a ser ingerida por los animales o, una vez recogida, procesada de alguna manera para su utilización como alimento o como material renovable, entre otros usos.

Al contrario de lo considerado hasta ahora, los taninos son mucho más que meros productos de desecho del vegetal, ya que se trata de componentes activos de las plantas, tanto en condiciones fisiológicas normales como en las desfavorables para su desarrollo. Concretamente, se piensa que los taninos condensados e hidrolizables podrían jugar papeles importantes en la regulación del crecimiento, y en la adaptación y defensa de las plantas frente a condiciones o agentes tales como estrés medioambiental, lesiones, enfermedades y ataques de depredadores.

La significación relativa de los taninos en las citadas funciones viene sugerida por su localización en el vegetal, ya que se presentan, por un lado, en zonas de activo crecimiento y, por otro, en las envueltas externas del vegetal (Chalker-Scott y Krahmer, 1989). La mayoría de los taninos se encuentran en la pared celular, pero también con frecuencia se hallan almacenados en vacuolas, desde donde, ante condiciones adversas

ocasionadas tanto por agentes abióticos como bióticos, se produce su liberación, seguida de la disociación enzimática de sus enlaces éster. Este proceso puede coincidir con la modificación rápida de ciertos componentes celulares tales como enzimas y otras proteínas.

2.6.1 Funciones de los taninos en las plantas.

2.6.1.1 Regulación del crecimiento.

Como ya se ha adelantado, hoy en día la idea más aceptada sobre la función de los taninos en el vegetal es la de su implicación en la regulación del crecimiento vegetal.

En primer lugar, hay que considerar la razón de la presencia de estos compuestos en las semillas. Los compuestos fenólicos inhibidores del crecimiento, localizados en sus capas más externas podrían servir para prevenir la germinación prematura de las semillas o la germinación en condiciones desfavorables para el desarrollo del embrión. Concretamente, en la inhibición de la germinación parecen estar implicados distintos procesos de producción enzimática de suberina impermeable, de taninos condensados y de ligninas, entre otros compuestos (Espelie *et al.*, 1980; Aastrup *et al.*, 1984; Egley *et al.*, 1985; Aparicio-Tejo *et al.*, 1986). Esto no sólo lograría impermeabilizar al agua la cubierta de la semilla, si no también restringir el intercambio de gases a su través, y así conseguir la protección del embrión frente al estrés ambiental y también frente a los agentes de enfermedad.

Por otra parte, la presencia de compuestos fenólicos en ciertos tejidos vegetativos y reproductores de los vegetales sugiere que pueden tener un papel activo en su crecimiento y desarrollo. Dependiendo de la reactividad potencial con ciertas proteínas y enzimas, los compuestos fenólicos de las plantas se clasifican en "inhibidores" o "estimuladores del crecimiento". Los estimuladores, derivados de *o*-dihidroxi- y

trihidroxifenoles, como el ácido caféico, que poseen grupos hidroxilo altamente reactivos, pueden inactivar el enzima ácido indolacético oxidasa (IAA oxidasa), inhibiendo así la descarboxilación de la fitohormona. Por el contrario, los monohidroxifenoles, como el ácido *p*-cumárico, y los ácidos cinámicos no hidroxilados, que carecen, por tanto, de grupos hidroxilo contiguos, no inhiben la actividad IAA-oxidasa y son considerados inhibidores del crecimiento (Beckman *et al.*, 1974).

Los estudios realizados sobre yemas y otras partes vegetativas de las plantas corroboran, en general, la idea de la participación activa de los compuestos fenólicos en el crecimiento, pero hay controversia en cuanto a si su acción es propiamente reguladora. Aunque algunos de estos supuestos reguladores endógenos fenólicos se encuentran fuera de la vacuola, en compartimentos donde podrían actuar sobre las rutas metabólicas, se cuestiona si la concentración de estos compuestos *in vivo* llega a ser suficientemente elevada como para funcionar de una manera reguladora. No obstante, ante la enorme cantidad de experiencias al respecto, parece posible que estos compuestos fenólicos actúen como estimuladores o inhibidores no hormonales del crecimiento (Kefeli y Dashek, 1984).

2.6.1.2 Inhibición de depredadores, parásitos y competidores

En las plantas se han descrito mecanismos de antidepredación tanto activos como pasivos. Se entiende por mecanismo activo al proceso de defensa que se desencadena en respuesta al ataque del depredador. Un ejemplo es el de la resistencia de la planta de lechuga a los áfidos de raíz, que es atribuido al incremento de la síntesis de compuestos fenólicos, puesto de manifiesto en las plantas atacadas por el depredador (Cole, 1984). Por el contrario, se tratará de un mecanismo de defensa pasivo cuando los factores responsables de la antidepredación se encuentran ya presentes en el vegetal, en el lugar de acción, con anterioridad al ataque del depredador: como tal podría considerarse el frecuente almacenamiento de taninos que se observa en vacuolas (Hendry, 1986).

La antidepredación se ha podido correlacionar, a menudo, con el alto contenido en compuestos fenólicos presentado por algunas especies vegetales potencialmente susceptibles de pasto; lo que podría actuar, entre otras cosas, como elemento disuasorio para los herbívoros. Además, debido a que estos compuestos fenólicos tienen posibilidad de reaccionar fácilmente con proteínas y enzimas de la saliva del animal, los taninos podrían formar parte del mecanismo químico general de defensa de las plantas contra la depredación y así, también ser factor determinante de la coevolución planta-animal (Beart *et al.*, 1985; Clausen y Reichardt, 1992). Así, ha sido referido que un relativamente alto contenido en taninos condensados reduce la palatabilidad de hojas de *Barteria* (Waterman *et al.*, 1984), *Machaerium* (Yokoyama y Hackey, 1987) y *Quercus* (Scalbert y Haslam, 1987).

A pesar de la cantidad de datos de que se dispone por el momento, se desconoce realmente el mecanismo o mecanismos por los que los taninos condensados reducen o inhiben la depredación. Varias teorías son contempladas, todas ellas, basadas en la disminución, bien de la ingestión, o bien de la asimilación del alimento por el animal (Butler, 1992).

Por otra parte, existe también interés sobre la relación entre los taninos y la depredación de tejidos vegetales por insectos o más concretamente sobre la implicación de los taninos en los mecanismos de resistencia química de las plantas contra los insectos (Schultz, 1989). Por el momento, estos aspectos no han sido suficientemente estudiados y faltan, sobre todo, los bioensayos decisivos para poder llegar a atribuir a un compuesto, en este caso a los taninos, las propiedades insecticidas o atrayentes que según los casos se les asignan. Se acepta que los flavonoides de muchas plantas, debido a su coloración, juegan un papel esencial como atrayentes para los insectos polinizadores y así serían un factor primordial en la evolución insectos-plantas.

Pero, por otra parte, a pesar de que las antocianidinas parecen presentar efectos

beneficiosos en los mamíferos, se sugiere la idea de que estos compuestos podrían formar parte del mecanismo de defensa de las plantas frente a los insectos.

En cuanto a las propiedades insecticidas de los taninos, los pocos ejemplos descritos se refieren a flavonoides y por otra parte adolecen por lo general de una demostración inequívoca de su toxicidad en insectos. Sin embargo, estos taninos, por su sabor amargo, serían un factor de antidepredación frente a los insectos, al igual que en el caso de los herbívoros .

2.6.1.3 Resistencia a enfermedades.

Aunque se desconoce, por el momento, casi todo acerca de los mecanismos de resistencia de las plantas a las enfermedades, es un hecho constatado la gran longevidad relativa alcanzada por las especies arbóreas, la cual parece deberse a la alta resistencia a muy diversos agentes patógenos, en lo que parecen estar implicados mecanismos de defensa tanto activos como pasivos. La idea más generalizada es la de que los mecanismos activos de defensa se dan sólo en las partes vivas del árbol, en respuesta a ciertos tipos de estímulos como son las lesiones o ataques por hongos. En este último caso, en las llamadas "zonas de reacción" se producen compuestos tóxicos denominados fitoalexinas, y, como consecuencia final de esta respuesta activa, tiene lugar la compartimentación de la zona infectada con la creación de barreras físicas y/o químicas que evitan la extensión del hongo (Kemp y Burden, 1986; Laks, 1988).

Barreras similares de resistencia a diversas enfermedades han sido descritas en respuesta a lesiones o infecciones producidas por otros patógenos. En numerosas especies arbóreas como haya (Ostrowsky *et al.*, 1984), *Prunus* (Feucht *et al.*, 1986; Biggs, 1986) y pino (Walkinshaw, 1989), se ha puesto de manifiesto con frecuencia el incremento del contenido de compuestos fenólicos en las paredes celulares como respuesta a la lesión o infección, lo cual induce, en muchos casos, la inmunización contra la enfermedad (Kuc,

1982; Ostrofsky *et al.*, 1984).

Por otro lado, se han descrito casos de resistencia de especies arbóreas o de tejidos específicos a enfermedades diversas por mecanismos pasivos. Parece ser que dicha resistencia se relaciona con un contenido inherente mayor de compuestos fenólicos; por ejemplo, las raíces de especies resistentes a la podredumbre como pacana, kaki y maracuyá, tienen un contenido mayor de dichos compuestos que especies susceptibles, tales como manzano, almendro y melocotonero (Sztejnberg *et al.*, 1983); y en variedades de tomates (Bhathia *et al.*, 1972), rosales (Conti *et al.*, 1986) y algodóneros (Mace y Howell, 1974; Mace *et al.*, 1978), resistentes a diversas enfermedades, se encontraron mayores concentraciones de taninos y de sus precursores que en variedades susceptibles.

Más concretamente, las bases bioquímicas de la resistencia podrían consistir, a veces, en la activación de enzimas responsables de la síntesis de compuestos fenólicos, ya que se ha observado que ciertas actividades enzimáticas son, a menudo, superiores en los hospedadores resistentes que en los sensibles (Friend, 1981). Parece ser que enzimas como la fenilalanina amonio-liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), difenil oxidasa (DPO) y peroxidasas tienen que ver con la resistencia a ciertas enfermedades (Venere, 1980; Friend, 1981; Bell, 1981), y precisamente tales actividades enzimáticas están implicadas en la formación de compuestos fenólicos, tales como taninos o, más en general, flavonoides oxidados. Estos compuestos podrían llegar a formar parte de tejidos impermeabilizantes del vegetal, y por otra parte, por su carácter astringente (inhibición enzimática), presentar propiedades antimicrobianas (Mace y Bell, 1978; Mace y Howell, 1974; Howell *et al.*, 1976; Scalbert, 1991).

2.6.1.4 Respuesta a estrés.

Existe una considerable variación cualitativa y cuantitativa en los compuestos fenólicos de las plantas sometidas a diversos tipos de estrés. A parte del efecto ya

comentado, producido por el ataque de agentes bióticos, podemos considerar que el contenido de compuestos fenólicos puede venir determinado por muchos y diversos factores ambientales.

En general, cualquier tipo de lesión mecánica puede conducir al incremento de la síntesis de estos compuestos y/o a su acumulación específica en las paredes celulares (Biddington, 1985; Feucht *et al.*, 1986).

También se ha observado que el estrés nutricional tiene un importante efecto en los niveles de compuestos fenólicos en los tejidos vegetales. Deficiencias en nitrógeno, fosfatos, potasio y otros elementos producen su acumulación además de provocar procesos de lignificación y suberización (Gershenzon, 1983; Dicosmo y Towers, 1983; Tiarks *et al.*, 1989).

Por último, entre los agentes causantes de la acumulación de compuestos fenólicos hay que incluir: toxicidad de elementos metálicos como cadmio (Fuhrer, 1982), shock térmico (Stermer y Hammerschmidt, 1984), estrés hídrico (Pizzi y Cameron, 1986) y exceso de radiación UV (Caldwell *et al.*, 1983). Debido a sus propiedades antioxidantes y a su capacidad de captación de radicales libres, los polifenoles y los oligómeros relacionados podrían ser los metabolitos de respuesta generalizada en los vegetales a diversos tipos de estrés, produciendo un efecto protector por estabilización de las membranas citoplasmáticas.

2.7 Aplicaciones en la Industria Química y Farmacéutica.

La abundancia y la amplitud de distribución de los taninos en los vegetales ha motivado el continuo interés acerca de su posible utilización en la industria química y farmacéutica; sin embargo, por otro lado, la variedad de poliflavanoles y elagitatinos

presentes en las plantas, y su frecuente asociación con otros constituyentes celulares así como las dificultades existentes para su aislamiento y purificación, son inconvenientes para su aprovechamiento. El futuro de la aplicación de estos compuestos en la industria química depende, en gran medida, de como lleguen a resolverse estas limitaciones.

Las fuentes principales de taninos son la corteza y madera de los árboles y las cáscaras de frutos. La mayoría de los taninos utilizados en la industria son los obtenidos de la corteza y de la madera de acacia y de quebracho, procedentes de Suráfrica y Suramérica. Sin embargo, es preciso considerar que la corteza o madera, tanto de otras especies arbóreas como de otras localizaciones, y disponibles en gran cantidad, podrían llegar a ser también útiles como fuentes potenciales de taninos.

Una de las aplicaciones principales de los taninos ha sido en la industria del curtido de pieles para la obtención de cuero, en la que los taninos procedentes de acacia y quebracho son considerados de muy buena calidad, ya que penetran rápidamente en la piel y dotan de un color luminoso al producto final. Aunque la tecnología del curtido de pieles tiene una larga historia, el conocimiento sobre los mecanismos de interacción entre taninos y proteína animal es reciente y por ahora limitado. Se sabe que la estructura química del flavanol, la capacidad de penetración del tanino y la capacidad de fijación en la piel animal son los factores más importantes, que condicionan la calidad del cuero obtenido (Bliss, 1989; Pauckner, 1992; Krisper *et al.*, 1992).

Otra importante utilidad de los taninos, en particular de los taninos condensados, está en la industria de obtención de adhesivos, especialmente para madera de conglomerado. Han sido descritas una amplia variedad de formulaciones de adhesivos derivados de taninos condensados, en las que estas sustancias son frecuentemente utilizadas como coaductos junto con otros polímeros sintéticos, para conseguir adhesivos efectivos (Pizzi, 1983, 1992 y 1993).

La aplicación más prometedora de los taninos de coníferas está en la obtención de adhesivos para laminados de encolado en frío, donde los taninos son utilizados en sustitución del fenol o resorcinol, en un sistema resorcinol-formaldehído (Kreibich y Hemingway, 1989; Kreibich, 1989; Tisler, 1992). Otras formulaciones, como los sistemas tanino-isocianato, son de interés al no emitir o emitir muy poca cantidad de formaldehído, satisfaciendo así las rigurosas exigencias para materiales compuestos de madera, en cuanto a la emisión de formaldehído se refiere (Dix y Marutzky, 1989).

Debido a las propiedades antimicrobianas de los taninos (Laks, 1987; Scalbert, 1991), estos compuestos son contemplados en la investigación actual de áreas tan diversas como, por ejemplo, la conservación de alimentos y la protección de la madera, habiéndose obtenido, especialmente en esta última faceta, buenos resultados (Laks, 1989b; Tisler, 1992). Numerosos estudios han demostrado que las formulaciones basadas en complejos poliflavanoles-cobre son eficaces protectores de madera. Su utilización presenta numerosas ventajas debido al reducido impacto ambiental durante la fabricación y aplicación, y también ante la mayor seguridad que presentan para el personal dedicado al tratamiento de maderas, frente a otros tratamientos más convencionales, derivados de la petroquímica (Laks, 1989b).

Además, a los taninos se les ha atribuido importantes propiedades de insecticidas y biocidas en general. La toxicidad para los escarabajos de los taninos condensados de las cubiertas de las semillas de legumbres ha sido demostrada en el caso de *Vicia faba*, cuyos taninos inhibieron el desarrollo de *Callosobruchus maculatus* (Boughdad *et al.*, 1986). El crecimiento de las larvas de *Heliothis virescens* resultó fuertemente inhibido por cianidín-3-glucósido (Hedin *et al.*, 1993).

Otras muchas actividades biológicas de los taninos los hacen potencialmente útiles en la industria farmacéutica: actividad antiviral, actividad antitumoral, inhibición de la peroxidación de lípidos, disminución de capacidad mutagénica o disminución del

contenido de urea en sangre, entre otras actividades (Miyamoto *et al.*, 1987; Okuda *et al.*, 1989).

En general, los taninos hidrolizables o elagitaninos han resultado ser los responsables de las múltiples actividades biológicas atribuidas a un buen número de plantas medicinales. Elagitaninos tales como oenoteína B, rugosina E, rugosina D, gemina A y coriariina A han mostrado importantes propiedades antitumorales, y parece que esta propiedad depende de que los elagitaninos en cuestión posean una estructura dimérica, con varios grupos galoilo unidos al anillo de glucosa (Miyamoto *et al.*, 1987; Okuda *et al.*, 1989b).

2.8 Análisis de los taninos.

Se han desarrollado muy numerosos y diferentes ensayos para dar respuesta a la necesidad de estimar el contenido de taninos en productos naturales destinados a la industria, o bien por simple interés científico.

Los métodos de valoración de taninos difieren considerablemente, tanto en la reacción química en que se basan como en el grado de especificidad. A pesar de ello, como es usual, no se dispone de métodos más o menos universales, válidos para cualquier tipo de muestra. Así, en una gran parte de los casos, se hace dificultosa la selección del ensayo más apropiado (Okuda *et al.*, 1989a; Hagerman y Butter, 1989; Waite, 1991; Scalbert, 1992).

Ante la posibilidad de elección para el análisis de taninos entre un método químico o un método de precipitación de proteínas, el principio general a considerar es, que los primeros son particularmente útiles para su valoración cuantitativa o el esclarecimiento de sus estructuras químicas; mientras que los métodos basados en la complejación con

proteínas informan, sobre todo, acerca de la actividad biológica potencial del tanino en una muestra dada.

2.8.1 Análisis cuantitativo.

2.8.1.1 Métodos químicos.

Ensayo de fenoles totales. Los taninos son compuestos ricos en grupos fenólicos, de tal forma que los métodos útiles para la determinación de fenoles pueden ser utilizados también satisfactoriamente en el análisis de taninos. Los métodos más comunes para la determinación de fenoles totales son el método de Folin (Folin y Denis, 1915; Singleton y Rossi, 1965) y el del Azul de Prusia (Price y Butler, 1977), basados ambos en las propiedades redox de los fenoles. Hay que tener en cuenta que estos métodos no diferencian entre fenoles tánicos y no tánicos; o incluso entre compuestos fenólicos y otros no fenólicos fácilmente oxidables, como el ácido ascórbico.

El método de Folin se basa en la oxidación de los fenoles, en medio básico, mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de complejos de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico), produciéndose, por reducción del reactivo, una mezcla de complejos de wolframio y molibdeno que presenta una coloración azul característica.

En el caso del método del Azul de Prusia, se produce, en primer lugar, una reducción del ión férrico a ión ferroso a la vez que la oxidación del fenol, seguidas de la formación del complejo iónico ferricianuro ferroso (Azul de Prusia).

En la determinación de taninos, la formación de complejos fenol-metal coloreados también tiene utilidad. En particular, la diferente coloración de los complejos formados por el ión férrico en medio neutro, con los taninos hidrolizables y con los taninos condensados ha sido considerada, en algunos casos, como criterio o característica

diferencial importante en la distinción de ambas clases de taninos (Mole y Waterman, 1987a), aunque no siempre haya sido posible dicha distinción (Grove y Pople, 1979).

Métodos específicos de taninos condensados.

Método del butanol-ácido. Se trata de un método específico de análisis de proantocianidinas, siempre y cuando se optimicen las condiciones de reacción (Swain y Hillis, 1959; Bate-Smith, 1973a; Porter *et al.*, 1986). El método se basa en la valoración, mediante espectrofotometría UV-VIS, de las antocianidinas procedentes de la ruptura oxidativa de los enlaces interflavánicos de las proantocianidinas poliméricas, reacción que es llevada a cabo por calentamiento en medio butanol-ácido (fig. II.16).

Los flavanoles monoméricos no son detectados en las citadas condiciones de reacción apropiadas para polímeros. Sin embargo, modificando dichas condiciones, por ejemplo, con la supresión del calentamiento, las leucoantocianidinas pueden ser valoradas por este mismo método (Watterson y Butler, 1983).

La principal limitación del método del butanol-ácido es que el rendimiento es generalmente bajo, aunque puede ser mejorado dependiendo de la estructura de las proantocianidinas y de las condiciones de reacción (Porter *et al.*, 1986).

Método de la vainillina. Es un método selectivo, sensible y sencillo para la valoración de flavanoles y proantocianidinas (Sakar y Howarth, 1976). Así pues, puede ser útil en la determinación de taninos condensados en presencia de taninos hidrolizables u otros fenóles (Makkar y Becker, 1993; Price *et al.*, 1978; Broadhurst y Jones, 1978).

El método consiste en la valoración por espectrofotometría UV-VIS de los productos de adición, cromóforos, resultantes de la reacción de los aldehídos aromáticos, tales como la vainillina, con las proantocianidinas.

Métodos específicos de taninos hidrolizables.

Método de la Rodanina (Inoue y Hagerman, 1988). El método se basa en la reacción de la rodanina (2-tio-4-cetotiazolidina) con los grupos hidroxilo adyacentes del ácido gálico, para dar un cromóforo, con máximo de absorción a 518 nm. La reacción es específica de ácido gálico libre y no se da ni con sus ésteres, ni con el ácido elágico, por lo que, en el caso del análisis de los galotaninos, se hace necesaria una hidrólisis previa llevada a cabo en medio ácido.

Método del ácido nitroso para elagitaninos (Bate-Smith, 1972). Este método es ampliamente utilizado, a pesar de sus inconvenientes. Los ésteres del ácido hexahidroxidifénico o elagitaninos reaccionan con el ácido nitroso para dar complejos coloreados que, bajo condiciones especiales como atmósfera de nitrógeno, pueden ser lo suficientemente estables como para ser utilizados en la valoración de elagitaninos.

Sin embargo, este método presenta los inconvenientes de la interferencia del ácido gálico en la valoración de los elagitaninos (Scalbert *et al*, 1989) además de las dificultades de manipulación en el laboratorio (Mole y Waterman, 1987b).

El método desarrollado por Wilson y Hagerman (1990) determina el ácido elágico liberado por hidrólisis ácida de los elagitaninos, mediante valoración espectrofotométrica de las nitrosil-oximaquinonas del ácido elágico, derivados cromóforos formados bajo condiciones especiales de nitrosilación.

2.8.1.2 Métodos basados en la complejación con proteínas.

Aunque los taninos son capaces de unirse además de a las proteínas a otros compuestos diversos, como alcaloides, hidratos de carbono e iones metálicos, la mayoría de los análisis de taninos basados en reacciones de complejación, se refieren a la

formación de precipitados con proteínas (Mole y Waterman, 1987b; Makkar, 1989). Este tipo de métodos presentan la ventaja, frente a los químicos clásicos, de proporcionar información adicional sobre la actividad biológica de los taninos; pero, sin embargo, hay que tener en cuenta que, ante la complejidad de la interacción tanino-proteína, se hace necesario extremar las precauciones en la interpretación de los resultados, los cuales además deben ser comparados sólo con datos obtenidos bajo las mismas condiciones de ensayo.

Los precipitados de proteína-tanino hidrolizable o proteína-tanino condensado, pueden ser valorados, directamente en el precipitado, mediante la formación de complejos coloreados con ión férrico (Hagerman y Butler, 1978) o por el método del Azul de Prusia (Price y Butler, 1977). Ambos métodos son sencillos y recomendables en la mayor parte de las situaciones.

En la determinación de complejos tanino-proteína insolubles, el método de difusión radial es también simple y adecuado (Hagerman, 1987). Su fundamento es el siguiente: la solución conteniendo los taninos se deposita en los orificios practicados en una matriz de agar, la cual contiene la proteína. La difusión de los taninos a través del gel da lugar a la complejación con la proteína y a la formación de un anillo visible de precipitación, siendo el área de dicho anillo proporcional a la cantidad de tanino en la muestra.

Es preciso considerar que algunos complejos tanino-proteína pueden permanecer en solución y, por ello, la actividad biológica de los taninos en esos casos no mostrará correlación con los resultados obtenidos en la valoración por métodos de precipitación de proteínas. En la actualidad se están desarrollando nuevos métodos, tanto para la optimización de la precipitación de los complejos tanino-proteína como para cuantificar los complejos solubles (Hagerman y Butler, 1989).

2.8.2 Análisis cualitativo. Métodos cromatográficos.

Los taninos se suelen presentar en el vegetal como mezclas complejas de polifenoles, cuya separación y análisis por técnicas cromatográficas supone un especial reto. Al tratarse de compuestos que presentan enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares se asocian fácilmente con proteínas, hidratos de carbono y metales. La fortaleza de tales asociaciones puede afectar considerablemente la conformación molecular y las propiedades químicas y, por consiguiente, su comportamiento cromatográfico. Los métodos de separación deben también tener en cuenta éstas y otras características reactivas, como susceptibilidad a la oxidación, labilidad térmica y descomposición o reactividad en medio ácido o básico. En resumen, nos enfrentamos a separaciones y análisis complicados que requieren a menudo un tratamiento específico.

La mayoría de los trabajos con resultados satisfactorios se han realizado con taninos oligómeros de bajo peso molecular. El reto futuro está, pues, en la separación y análisis de oligómeros más grandes, y también más complejos, en los que, por ejemplo, puedan ponerse de manifiesto las diferencias entre distintas formas estereoquímicas de las unidades monoméricas, como las 3,4-*cis* y 3,4-*trans*, o los distintos tipos de enlaces interflavánicos del oligómero (Karchesy *et al.*, 1989; Okuda *et al.*, 1989a, 1990).

Los trabajos de Karchesy *et al.* (1989) y de Okuda *et al.* (1989a, 1990) presentan amplias descripciones y discusiones sobre las diferentes técnicas cromatográficas.

Cromatografía en columna. Ha sido la técnica más común para el aislamiento preparativo de proantocianidinas oligoméricas y elagitaninos, utilizando como relleno, concretamente, Sephadex LH-20 y como eluyentes, etanol o etanol-agua (Nonaka *et al.*, 1983b; Hsu *et al.*, 1985; Kashiwada *et al.*, 1986; Morimoto *et al.*, 1988). A medida que se ha ido poniendo en evidencia la complejidad de los taninos, los métodos de fraccionamiento en columna han ido evolucionando hacia la utilización de otros

materiales de relleno alternativos al Sephadex LH-20, como geles MCI (copolímeros estireno-divinilbenceno, altamente porosos) (MCI, 1984; Nonaka *et al.*, 1983b; Foo y Wong, 1986; Sun *et al.*, 1987), Bondapak C₁₈/ Porasil B (Morimoto *et al.*, 1986 a,b; Morimoto *et al.*, 1988) y Fractogel TSK (Sun *et al.*, 1987; Delcour *et al.*, 1985). Por otra parte, para llegar a obtener sustancias puras, a menudo se requieren fraccionamientos sucesivos con alternancia de distintos tipos de geles. Es preciso considerar que los taninos condensados y los elagitaninos tienen la misma solubilidad y las mismas características de movilidad en Sephadex, por lo que eluyen conjuntamente (Foo y Porter, 1980).

Cromatografía en contra corriente (CCC). Esta técnica consiste en una cromatografía de reparto líquido-líquido, en ausencia de fase estacionaria sólida. Frente a otras técnicas de cromatografía presenta, en particular a escala preparativa, la ventaja de la ausencia de soporte sólido, el cual es a menudo el causante de pérdidas de taninos de alto peso molecular. Sin embargo, con esta técnica existen limitaciones en cuanto a la disponibilidad de mezclas de disolventes que cumplan las condiciones adecuadas de selectividad para el reparto. Por ello, se ha utilizado generalmente para la separación preliminar en fracciones del extracto bruto de taninos (Putman y Butler, 1985; Zhang *et al.*, 1988).

Con objeto de aumentar la eficacia y disminuir el tiempo requerido para la separación se han desarrollado algunas variantes de este método cromatográfico. Así, por ejemplo, la cromatografía de partición por centrifugación ha sido útil, en particular, en la separación preparativa de taninos hidrolizables oligoméricos (Okuda *et al.*, 1986; Yoshida *et al.*, 1989).

Cromatografía en papel y en capa fina. La cromatografía bidimensional en papel ha sido una valiosa herramienta para el análisis cualitativo de elagitaninos y proantocianidinas de bajo peso molecular (Roux y Ewelyn, 1958; Roux, 1959; Haslam 1966; Thompson *et al.*, 1972; Malan y Roux, 1975), pero actualmente es reemplazada por

la cromatografía en capa fina (CCF), bien sea bidimensional en celulosa (Hemingway *et al.*, 1982; Foo, 1984; Foo y Wong, 1986; Sun *et al.*, 1987; Mueller-Harvey *et al.*, 1987; Conde *et al.*, 1992), o bien en gel de sílice (Thompson *et al.*, 1972; Hemingway *et al.*, 1982; Viviers *et al.*, 1983; Delcour *et al.*, 1985; Young *et al.*, 1985, 1986; Conde *et al.*, 1992). Las ventajas principales de la CCF frente a la cromatografía en papel son: una sensibilidad mayor, más flexibilidad en el empleo de eluyentes y la mayor rapidez en su desarrollo. Se ha demostrado la eficacia de la CCF en la separación de mezclas complejas de taninos condensados y elagitaninos, siempre y cuando sean de peso molecular bajo, mientras que los polifenoles poliméricos tienden a quedar inmovilizados en CCF.

Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Actualmente esta técnica cromatográfica es la que presenta mejores perspectivas, tanto en el análisis de taninos como en su aislamiento y purificación. Por el momento los sistemas más usados y que tienden a generalizarse, ya que han dado mejor resolución, constan de columnas de fase inversa y de eluyentes acidificados, tales como metanol-agua y acetonitrilo-agua.

Las revisiones de Daigle y Conkerton (1983) y de Karchesy *et al.* (1989), junto con los trabajos realizados por Lea (1979, 1980, 1982), Van de Castele *et al.* (1983), Mueller-Harvey *et al.* (1987) y Putman y Butler (1989), nos aportan una amplia información sobre los tipos de columnas y métodos de elución utilizados en la separación de flavonoides, y en particular de proantocianidinas, por CLAR. Además, es preciso mencionar también los trabajos de Hatano *et al.* (1988a), Okuda *et al.* (1989a) y Scalbert *et al.* (1988, 1990) ya que ponen de manifiesto la utilidad en el análisis de taninos hidrolizables, de los mismos sistemas cromatográficos antes descritos.

La forma tradicional de detección de taninos por CLAR ha sido con los detectores de UV-VIS: siendo las longitudes de onda de máxima absorción para elagitaninos y proantocianidinas, 255 y 280 nm, respectivamente. El reciente desarrollo de los detectores de diodos, los cuales permiten la obtención del espectro UV de cada pico cromatográfico

(Hatano *et al.*, 1986; Putman y Butler, 1989; Bailey *et al.*, 1990), ha facilitado la distinción entre los diferentes tipos de taninos, flavonoides y otros compuestos fenólicos.

Por otra parte, la cromatografía líquida de alta resolución presenta también importantes limitaciones en el análisis de taninos, en especial de proantocianidinas poliméricas, las cuales tienden en ocasiones a asociarse de forma irreversible con la fase sólida, bloqueando así el flujo de eluyente a través de la columna.

Por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase inversa ha sido obtenida una excelente resolución en la separación de monómeros y oligómeros de proantocianidinas, pero hay que tener en cuenta que el orden de elución no se corresponde con el grado de polimerización (Lea, 1980, 1982; Van de Castele *et al.*, 1983; Mueller-Harvey *et al.*, 1987; Pérez-Ilzarbe *et al.*, 1992), ya que, por el contrario, las formas poliméricas eluyen al final del cromatograma sin llegar a resolverse, dando un pico ancho (Putman y Butler, 1989; Ricardo da Silva *et al.*, 1991). Sin embargo, por CLAR en fase normal sí se ha conseguido la separación de proantocianidinas oligoméricas eluyendo en razón de sus pesos moleculares, aunque de nuevo en este caso las poliméricas salen en la parte final del cromatograma como un pico ancho y no resuelto (Rigaud *et al.*, 1993).

También el análisis de elagitaninos por CLAR presenta limitaciones: Por ejemplo, aquellos que tienen un grupo hidroxilo libre en carbono anomérico, dan en CLAR en fase inversa un doble pico correspondiente a los anómeros α y β . Otro tipo de complicación se muestra en el caso de la cromatografía de taninos hidrolizables con uno o más grupos dehidrohexahidroxidifenoilo (DHHDP), ya que cuando son inyectados como solución alcohólica se eluyen dando picos complejos, lo que posiblemente sea debido a la formación de acetales en medio alcohólico (Hatano *et al.*, 1988a; Okuda *et al.*, 1989a).

Cromatografía de permeabilidad por geles (CPG). Entre las diferentes técnicas de cromatografía de exclusión, la más sencilla y por lo general más utilizada para el análisis de taninos es la cromatografía de permeabilidad por geles (CPG) (Samejima y Yoshimoto, 1979; Foo *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1983a; Koupai-Abyazani *et al.*, 1993). En su versión en "fase normal", opera con eluyentes orgánicos y la separación cromatográfica depende única y exclusivamente de la magnitud molecular de los polímeros, sin la intervención de otros procesos como adsorción, partición o iónicos (García de Marina y del Castillo, 1988). Es, así un método rápido, sencillo y adecuado para el estudio de la distribución de pesos moleculares de moléculas poliméricas, en general, y por ello muy valioso en el análisis de taninos poliméricos.

2.8.3. Análisis estructural.

El estudio de la estructura química de los taninos ha sido considerablemente facilitado por el reciente desarrollo de las técnicas espectroscópicas, particularmente la espectrometría de masas y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Espectrometría de masas. Cualquiera de las técnicas de espectrometría de masas existentes: de impacto electrónico (Mabry y Markham, 1975; Mabry y Ulubelen, 1980), de ionización química (Itokawa *et al.*, 1982; Bankova *et al.*, 1986; Mabry y Ulubelen, 1980) y de desorción de campo (Schulten y Games, 1974; Karchesy *et al.*, 1976; Nonaka *et al.*, 1983b) han sido ampliamente empleadas en la elucidación de la estructura de los taninos. Sin embargo, sólo se han conseguido resultados satisfactorios, en general, en el caso de monómeros o dímeros, y no con oligómeros, debido a la escasa volatilidad y estabilidad presentada por estos últimos.

Los taninos oligoméricos pueden ser analizados por las técnicas de impacto electrónico o de ionización química, siempre y cuando puedan ser derivatizados y así incrementada su volatilidad y estabilidad. Desafortunadamente, los métodos de

derivatización de estos compuestos presentan problemas; ya que, dado el elevado número de grupos hidroxilo y grupos fenólicos que contienen, su derivatización supone un importante incremento del peso molecular, y se reduce así considerablemente el límite superior de tamaño molecular del compuesto que puede ser analizado en una espectrometro determinado. Sin embargo, el problema principal radica en que los taninos de tamaño superior al correspondiente a los dímeros no dan ión molecular por la técnica de impacto electrónico y dan ión molecular poco intenso mediante ionización química (Mabry y Ulubelen, 1980; Barofsky, 1989). En esta última técnica, la fragmentación es también lo suficientemente escasa como para dar información sobre la estructura del oligómero.

El método de desorción de campo, incluido en el grupo de técnicas de ionización por desorción, ha sido la primera técnica de espectrometría de masas que no requiere la derivatización de los flavonoides y da un espectro con buen rendimiento del ión molecular. Sin embargo, ésta presenta la desventaja de su dificultad práctica y aunque la moderna instrumentación ha facilitado su uso, sólo ha sido utilizada ocasionalmente en el estudio de la estructura de los taninos (Biswas *et al.*, 1978; Geiger y Schwinger, 1980; Domon y Hostettman, 1985).

El desarrollo de la espectrometría de masas de ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS), ha proporcionado una poderosa herramienta para el estudio de las estructuras de los biopolímeros (Williams *et al.*, 1983b, 1987; Cochram, 1986; Barofsky, 1989), ya que esta técnica no requiere tampoco derivatización química previa al análisis espectral y presenta la ventaja sobre la de desorción de campo, de una fácil manipulación y producción de iones.

La FAB-MS pertenece al grupo de técnicas espectrométricas de ionización por desorción, pero se diferencia en dos aspectos fundamentales: 1) como partículas primarias se utilizan átomos neutros y 2) el compuesto problema se disuelve o suspende en una

matriz líquida. Es esta última característica la que le confiere una importante utilidad analítica (Williams *et al.*, 1987; Fenseleau y Cotter, 1987). Mediante este método se han estudiado las estructuras químicas de numerosas proantocianidinas y elagitaninos oligoméricos (Yoshida *et al.*, 1983; Karchesy *et al.*, 1986; Self *et al.* 1986; Okuda *et al.*, 1989a; Isobe *et al.*, 1989; Karchesy y Foo, 1989).

Para el análisis de mezclas de compuestos polifenólicos, los métodos ideales serían los cromatográficos acoplados a los espectrométricos, en particular el acoplamiento CLAR/EM. El objetivo del acoplamiento CLAR/EM no es solamente disponer de un detector universal para la cromatografía líquida, sino también que sirva para obtener información estructural de los compuestos analizados. Por otra parte, a pesar de que existen una amplia variedad de interfases de acoplamiento de ambas técnicas, el problema del acoplamiento en sí no está aún resuelto satisfactoriamente. Hasta el momento, parece que las interfases de transporte son las más útiles y permiten diversas formas de ionización: impacto electrónico, ionización química o ionización por bombardeo con átomos rápidos (Martínez Verges, 1989).

Espectrometría de resonancia magnética nuclear. Tanto la RMN de protón como la de carbono-13, combinadas con técnicas de separación y purificación, son el mejor medio para el estudio de taninos de estructuras complejas.

Cada una de las técnicas de RMN presenta distintas ventajas según el problema al que sea aplicada. La mayor ventaja de la RMN de protón es que proporciona información directa de la estereoquímica, en particular de las conformaciones del poliol de los taninos hidrolizables (Gupta *et al.*, 1982; Haddock *et al.*, 1982b; Okuda *et al.*, 1989a; Yoshida *et al.*, 1992a) y del anillo C de las unidades flavan-3-ol de las proantocianidinas (Porter *et al.*, 1986a; Porter, 1989a; Kolodziej, 1992) y, además, sobre los patrones de sustitución en ambas clases de taninos. Su desventaja es la dificultad de interpretación de los espectros en el caso de moléculas grandes (dímeros, trímeros, etc),

debido a los efectos de solapamiento y ensanchamiento de las señales.

La RMN de carbono-13, por el contrario, da información definitiva sobre las estructuras de moléculas grandes incluyendo oligómeros y polímeros. Hasta el momento se han conseguido espectros útiles de proantocianidinas con un número aproximado de hasta 20 unidades (Okuda *et al.*, 1989a; Porter, 1989a).

Los recientes avances experimentados por las técnicas de RMN, están facilitando considerablemente la elucidación de estructuras y conformaciones de taninos excepcionalmente complejos. Nos referimos, por ejemplo, al análisis por RMN de muestras en estado sólido, a las técnicas de RMN acopladas a la cromatografía, a la RMN microscópica, a las nuevas técnicas de supresión de disolventes, a la utilización de núcleos diferentes al ^{13}C para establecer acoplamientos heteronucleares, etc. La RMN en estado sólido ha resultado muy ventajosa para el estudio de superficies y puede ser un método con excepcionales aplicaciones en el estudio de taninos complejos (Ferreira y Brandt, 1989; Newman y Porter, 1992).

2.9 Distribución de los taninos en el género *Eucalyptus*.

Se puede decir que los taninos, en cualquiera de sus formas químicas, se hallan ampliamente distribuidos en el reino vegetal sobre todo en plantas superiores y, en particular, en las dicotiledóneas. La mayoría de las especies más importantes productoras de taninos pertenecen a las familias *Leguminosae* (Acacia), *Anacardiaceae* (quebracho), *Combretaceae* (chuglan), *Rhizophoraceae* (mangle), *Myrtaceae* (eucaliptos) y *Polygonaceae* (acedera). Acacia, quebracho, mangle y chuglan son originarias de climas tropicales o subtropicales, aunque otras especies ricas en taninos también se dan en zonas templadas (Haslam, 1989).

En cuanto a la distribución en el vegetal, en general, cualquiera de las partes de la planta, corteza, madera, hojas, frutos, raíces, e incluso, semillas, puede acumular taninos.

La presencia generalizada de taninos en las dicotiledóneas se cumple solamente en lo que se refiere a los taninos condensados, ya que parece que los taninos hidrolizables, tanto monoméricos como oligoméricos, se restringen a las *Choripetales*, no habiendo sido descritos en las *Sympetales*. La distribución de oligómeros es aún más limitada. Por ejemplo, dentro de la familia *Rosaceae* los taninos hidrolizables se encuentran presentes en las especies herbáceas y arbustivas, pero no en las leñosas (Okuda *et al.*, 1992 y 1993). Sin embargo, en la familia *Euphorbiaceae* se dan tanto en especies herbáceas como leñosas, e incluso algunas familias, formadas principalmente por especies de porte leñoso, están consideradas como importantes productoras de taninos hidrolizables oligoméricos. Como ejemplo tenemos *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Cornaceae*, *Combretaceae*, *Tamaricaceae*, *Nyssaceae*, *Hamamelidaceae* y *Theaceae* (Okuda *et al.*, 1993).

El género *Eucalyptus* comprende alrededor de 500 especies, variedades y subespecies que crecen bajo un amplio rango de condiciones ambientales. Entre ellas, algunas están consideradas como plantas de alto contenido en taninos, en especial en taninos hidrolizables (Hillis, 1972; Haslam, 1989).

Existen pocas referencias sobre la composición polifenólica de los eucaliptos; la mayoría corresponden a estudios globales sobre composición química de la madera, en los que se valoran, por lo general, cenizas, extractos totales, lignina, celulosa y pentosanos (Bland, 1985; Pereira, 1988); y sólo en algunas casos el contenido en fenoles totales, como un índice de la riqueza en compuestos polifenólicos (Scalbert *et al.*, 1989; Fechtal y Riedl, 1991).

A continuación se resume la escasa información de que se dispone hasta el

momento sobre la composición de los taninos encontrados en el género *Eucalyptus*. Se ordena teniendo en cuenta la localización de los mismos en el árbol, ya que el objetivo y naturaleza de los estudios realizados difiere considerablemente según la utilización potencial de la corteza, madera, hojas y frutos.

2.9.1 Madera.

La madera de *Eucalyptus spp.* presenta una importante riqueza en extraíbles; en especies de color pálido se han descrito en la madera de duramen de baja densidad contenidos del 25% o más de compuestos extraíbles. Estos extractos son ricos en taninos hidrolizables, los cuales, junto con los ácidos gálico y elágico, se consideran responsables de muchos de los problemas que surgen en la fabricación de pasta de papel de *Eucalyptus spp.* (Hillis, 1972 y 1986). Hillis y su equipo han puesto de manifiesto la presencia de casi una veintena de elagitaninos en diferentes especies de *Eucalyptus*. Estos autores han analizado tanto los extractos metanólicos y etanólicos como los "exudados" de la madera mediante cromatografía bidimensional en papel, y para ello han puesto a punto varios métodos de revelado específicos de elagitaninos. El aislamiento de los elagitaninos fue realizado por cromatografía en columna de Sephadex y la identificación mediante hidrólisis y RMN de los hidrolizados obtenidos. A partir de madera del duramen de *E. delegatensis* lograron aislar e identificar los siguientes elagitaninos: 2,3-HHDP-glucosa (D-1), 4,6-HHDP-glucosa (D-4), pedunculagina (D-2), 3,6-HHDP-glucosa y corilagina; y pusieron de manifiesto, además, la presencia de otros elagitaninos (D-3, D-6, D-12, D-13) de estructura desconocida (Seikel y Hillis, 1970).

Los elagitaninos encontrados posteriormente en extractos metanólicos de *E. regnans* y *E. globulus* resultaron ser muy similares: D-1, D-2 y D-6 en *E. globulus* y D-3, D-6 y D-13 en *E. regnans* (Yazaki y Hillis, 1976).

En extractos de *E. sideroxylon*, que resultaron también ser ricos en otros

compuestos polifenólicos, se detectaron varios elagitaninos de estructura desconocida. Además, en esta especie, fueron identificados derivados metilados y glicosilados del ácido elágico (ácido 3,3'-di-O-metilelágico-4'-glucósido y ácido 3,3',4-tri-O-metilelágico-4'-glucósido) (Hillis *et al.*, 1974).

Yazaki *et al.* (1993), en su análisis sobre la composición polifenólica de los extractos en agua caliente de madera de *E. pilularis*, revelan la presencia de D-1, D-4, D-6, D-13 y de otros tres elagitaninos de estructura desconocida, utilizando CLAR en fase inversa y acetonitrilo-agua-ácido fosfórico como eluyente.

En lo que concierne a las proantocianidinas, es de destacar en primer lugar que, mientras éstas están presentes sólo en pequeñas proporciones en especies de madera de color pálido, en las de color rojo pueden encontrarse en elevadas proporciones.

La presencia de proantocianidinas ha sido puesta de manifiesto en varias especies de *Eucalyptus*: mediante tratamiento con calor en medio butanol/HCl se produjo cianidina en los extractos de *E. fascinata* y *E. marginata* (Robinson y Robinson, 1993), y delfinidina en los de *E. sieberi* (Hillis, 1956 y 1962). Más recientemente Nisi y Panizzi (1966) aislaron una procianidina dimérica de madera de *E. camaldulesis*, que da cianidina por tratamiento con ácido. En la misma especie se aisló otra proantocianidina considerada octamérica, detectada también en *E. globulus*, que da delfinidina por el mismo tratamiento ácido (Nisi, 1969 y 1970).

En los "kinos" (exudados polifenólicos) de *E. sieberi* (Hillis y Carle, 1964) y de *E. hemiphloa* (Hillis y Carle, 1963) se han encontrado polímeros de leucodelfinidina y de catequina, respectivamente.

2.9.2 Corteza.

La información acerca de la composición en taninos de la corteza de *Eucalyptus* es reducidísima. El único trabajo encontrado es el de Yazaki y Hillis (1976), en el que se estudia la composición de polifenoles en los extractos metanólicos de corteza de *E. regnans* y *E. globulus*. En ambas especies se detectaron los elagitaninos D-1, D-2, D-6 y D-13, derivados metilados y glicosilados del ácido elágico (3-Me-AE ramnósido y 3-Me-AE glucósido) y los propios ácidos elágico y gálico. Además asocian alguna de las manchas obtenidas en la cromatografía en capa fina, con polímeros de catequina. En *E. regnans* se identificó también el elagitanino D-4.

Fechtal y Riedl (1991), estudiaron los productos de la hidrólisis ácida de extractos de taninos de cortezas de cuatro especies de *Eucalyptus* (*E. astringens*, *E. cladocalyx*, *E. occidentalis* y *E. sideroxylon*), detectando ácido gálico y, ácido elágico y catequina entre otros, además de los azúcares glucosa, arabinosa y ramnosa.

2.9.3 Hojas y frutos.

Se considera que las hojas de *Eucalyptus* contienen una amplia variedad de compuestos fenólicos, de acuerdo con los resultados de las numerosas investigaciones publicadas sobre la composición en flavonoides. Sin embargo, no hay prácticamente trabajos que estudien, concretamente, la fracción de taninos.

En hojas de *E. rostrata*, ha sido identificada una amplia variedad de compuestos fenólicos, todos ellos con grupos galoilo y notable actividad antioxidante (Okamura *et al.*, 1993). Entre estos compuestos están los taninos hidrolizables 1,2,6-tri-D-galoil- β -D-glucosa (Nonaka *et al.*, 1981; Wilkins, 1988) y tellimagrandina (Wilkins y Bohm, 1976; Hatano *et al.*, 1988b). Ha sido descrita también la presencia de ácido elágico en hojas de *E. globulus* (Osawa y Namiki, 1985).

En lo que al contenido de taninos en frutos se refiere, Yoshida y colaboradores (1992b) han aislado de *E. alba* tres nuevos taninos hidrolizables no descritos hasta entonces, las eucalbaninas A, B y C, y además han detectado otros, aislados antes por otros autores a partir de diferentes órganos y especies vegetales: casuarinina, casuariina, pedunculagina (Okuda *et al.*, 1983), tellimagrandina I (Okuda *et al.*, 1983; Wilkins y Bohm, 1976), gemina D (Yoshida *et al.*, 1985), cornusiina B (Hatano *et al.*, 1989), 2,3-(S)-hexahidroxidifenoil-D-glucosa (Seikely Hillis, 1970), penta-O-galoil- β -D-glucosa (Schmidt *et al.*, 1967) y oenoteína B (Hatano *et al.*, 1990). Es de destacar que las eucalbaninas B y C y la oenoteína B fueron los primeros taninos hidrolizables diméricos encontrados en especies de *Myrtaceae*.

En el mismo trabajo Yoshida y colaboradores (1992b) aislan e identifican el tanino condensado, procianidina B-7 identificado ya anteriormente por Nonaka y Nishioka (1981).

III. MATERIAL VEGETAL

III. MATERIAL VEGETAL.

1. Selección de muestras.

Para los ensayos previos de puesta a punto de los métodos de extracción y análisis de los diferentes taninos, objeto de este trabajo, fueron utilizadas muestras tipo, de madera y corteza de *Eucalyptus globulus*, procedentes de Galicia (sin especificación del origen exacto) y suministradas por el Laboratorio de Pastas del Area de Industrias Forestales del CIFOR-INIA.

Los estudios sistemáticos objeto de esta tesis se han realizado en madera, corteza y hojas de tres especies del género *Eucalyptus*: *E. globulus*, *E. camaldulensis* y *E. rudis*, utilizando muestras recogidas en dos estaciones, localizadas en las provincias de Huelva y Pontevedra, con características edafoclimáticas muy diferentes.

En Huelva, se seleccionó inicialmente el arboreto de "El Villar", donde se cultivan ejemplares de las tres especies. No obstante, al observar que la población de *E. globulus* estaba afectada de *phoracantha*, se tomaron sólo muestras de *E. camaldulensis* y *E. rudis*; y el muestreo de *E. globulus* se tuvo que realizar en el arboreto de "Bodegones" (La Soldana) a unos 20 Kms del anterior. Todas las muestras de Pontevedra fueron recogidas en el arboreto de "Lourizán".

La figura III.1 recoge las características fitoclimáticas de las zonas de ensayo. Los datos proceden de las estaciones meteorológicas más próximas a cada uno de los arboretos muestreados. Lourizán y El Villar poseen estación meteorológica propia, mientras que la estación más cercana a Bodegones es la del arboreto de Cabezudos, contiguo a éste. De acuerdo con la clasificación fitoclimática de Allue (1990), el arboreto de Lourizán pertenece al subtipo climático nemoral VI(V); y los de El Villar y Bodegones, a los subclimas mediterráneos IV₂ y IV₂ → IV₄, respectivamente.

FITOCLIMATOLOGIA DE LAS ZONAS DE ENSAYO

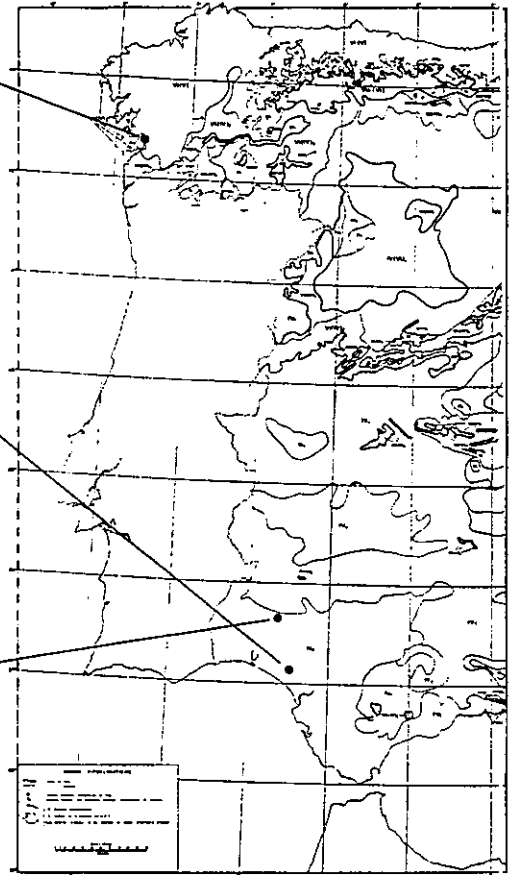
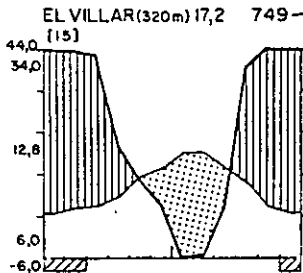
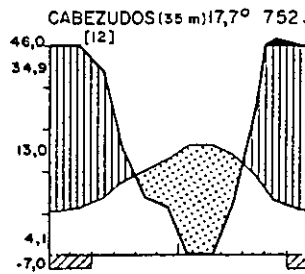
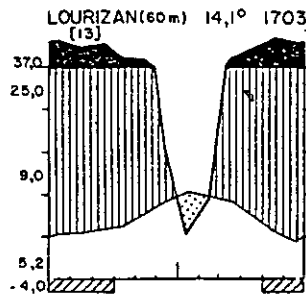
ESTACIONES METEOROLOGICAS ESTUDIADAS:

PONTEVEDRA: LOURIZAN

HUELVA: CABEZUDOS, EL VILLAR

SUBTIPOS FITOCLIMATICOS (ALLUE, 1990)

- DESERTICOS
- 1 III (IV)
- MEDITERRANEOS
- 2 IV (III)
- 3 IV₁
- (arbóreo)
- 4 IV₂
- 5 IV₃
- 6 IV₄
- 7 IV (VI)₁
- 8 IV (VI)₂
- 20 IV (VII)
- NEMOROMEDITERRANEOS
- 9 VI (IV)₁
- 10 VI (IV)₂
- 11 VI (IV)₃
- 12 VI (IV)₄
- NEMOROESTEPARIOS
- 13 VI (VII)
- NEMORALES
- 14 VI (V)
- 15 VI
- BOREALOIDES
- 16 VIII (V)₁
- 17 X (VIII)
- ARTICOIDES
- 18 X (IX)₁
- 19 X (IX)₂



Situación de las ESTACIONES estudiadas, en el mapa de SUBREGIONES FITOCLIMATICAS DE ESPAÑA (ALLUE ANDRADE, 1990) y climodiagramas correspondientes.

FACTORES	ESTACIONES	LOURIZAN	CABEZUDOS	EL VILLAR
P, precipitación anual		1703	752	749
p., precipitación en cada mes (i)		medir en climod.	medir en climodiag.	medir en climodiag.
A, período seco (meses)		1,7	5,0	4,3
\bar{T} , temperatura media anual		14,1°	17,7°	17,2°
\bar{t}_i , temperatura media de cada mes (i)		medir en climod.	medir en climodiag.	medir en climodiag.
\bar{t}_f , temperatura media mensual más baja		8,9°	9,7°	10,7°
\bar{T}_m , temperatura media de las mínimas del mes de media más baja		5,2°	4,1°	6,0°
T _m , temperatura mínima absoluta del período		-4,0°	-7,0°	-6,0°
H _s , meses de helada segura (en los que $\bar{T}_m \leq 0^\circ$)		0	0	0
H _p , meses de helada probable (en los que $\bar{T}_m > 0^\circ$ pero $T_m \leq 0^\circ$)		5	3	3
\bar{t}_c , temperatura media mensual más alta		19,9°	25,0°	26,1°
\bar{T}_M , temperatura media de las máximas del mes de media más alta		25,0°	34,9°	34,0°
T _M , temperatura máxima absoluta del período		37,0°	46,0°	44,0°
\bar{Osc} , media anual de la oscilación térmica diaria		9,0°	13,0°	12,8°
DIAGNOSIS FITOCLIMATICA		VI (V)	IV₂ → IV₄	IV₂

FIGURA III.1 Fitoclimatología de las zonas de ensayo.

De cada zona y para cada especie bajo estudio se seleccionaron, al azar, varios individuos de entre todos aquellos árboles con características morfológicas semejantes.

Así, para que las muestras fuesen lo más homogéneas posible, se seleccionaron ejemplares de aproximadamente la misma edad, con diámetro de tronco semejante y ramas accesibles. Este criterio no pudo mantenerse con *E. rudis* de Pontevedra, cuyo escaso desarrollo, debido a la deficiente aclimatación, obligó a escoger ejemplares menos robustos y más jóvenes.

De cada uno de los individuos seleccionados se recogieron muestras de la corteza del tronco y de las ramas completas, para obtener posteriormente de estas últimas, por un lado las hojas y por otro la madera, después de la eliminación de su corteza. Así pues, se optó por utilizar la madera de las ramas, en lugar de la del tronco, ante la imposibilidad de talar árboles para la realización de este estudio.

Por el contrario, elegimos la corteza del tronco, en lugar de la de las ramas, ya que la primera presenta una mayor diferenciación celular y por tanto la consideramos más representativa.

2. Preparación de las muestras.

2.1 Molienda y tamizado.

Para los ensayos preliminares de puesta a punto del método de extracción de taninos, las muestras de madera y corteza fueron troceadas, respectivamente, de forma mecánica y manual. Posteriormente, la madera fue sometida a un astillado de tipo cerilla con un desfibrador de discos Sprout-Waldron, equipado con un disco de púas, modelo C-2976-I. No se hizo así en el caso de la corteza ya que la textura de las fibras no

permite la utilización de este desfibrador.

Finalmente, tanto las astillas de madera como los trozos de corteza así obtenidos se molieron en un molino de martillo, modelo D-Mat/ Typ ECZF, F230, con una placa de rejilla número 3 (de 3 mm de diámetro de poro).

Para los ensayos sistemáticos, las muestras de madera y corteza se trataron de la misma forma, siendo troceadas mecánicamente y trituradas en el molino, sin astillado previo. En cuanto a las hojas, después de cortadas manualmente, fueron molidas en un molino tipo "Turmix".

2.2 Determinación de humedad.

Como paso previo a la extracción de los taninos, se determinó la humedad de todos los tipos de muestras, de acuerdo con la norma Tappi T 208 om-89, según se detalla a continuación:

Se pesan 10 g de muestra, en matraz de 500 ml, se añaden 200 ml de xileno-tolueno (195:5) y la mezcla se destila durante 4 h. El destilado, que está formado por una mezcla gaseosa azeotrópica de xileno-tolueno y agua, al condensarse se separa en dos fases, orgánica y acuosa, las cuales se recogen en un recipiente graduado, situado entre el matraz y el refrigerante. La fase acuosa, más pesada, queda debajo, y su volumen puede medirse directamente en ml con ayuda de la escala graduada. El porcentaje de humedad se calcula a partir de esta lectura, multiplicando por 10.

IV. METODOLOGIA

IV. METODOLOGIA.

1. Extracción.

1.1 Antecedentes bibliográficos.

Las consideraciones acerca del disolvente más idóneo para la extracción de taninos de tejidos vegetales, se basan en un número muy limitado de estudios, realizados, además, en muy pocas especies de plantas y de los que no siempre se desprenden conclusiones concordantes. Se podría decir que los disolventes más recomendados para la extracción de taninos han sido las mezclas metanol-agua, metanol-ácido y acetona-agua, pero, en la mayoría de los casos, estas recomendaciones no se apoyan en estudios estimativos de la eficacia de la extracción.

En particular, ha sido cuestionada la utilidad del metanol como disolvente para la extracción de taninos hidrolizables (Haslam *et al.*, 1961; Swain, 1979) y su capacidad para extraer taninos condensados de ciertas especies de plantas; y también, por sus bajos rendimientos (Bate-Smith, 1973a; 1975; Foo y Porter, 1980). El metanol, no obstante, ha sido utilizado por algunos investigadores en la extracción de polifenoles monoméricos y poliméricos de madera y corteza de *Eucalyptus* y otras especies arbóreas (Hillis *et al.*, 1974; Yazaki y Hillis, 1976; Foo y Karchesy, 1989).

Por otra parte, la mezcla acetona-agua ha sido usada con más frecuencia para extraer taninos condensados y taninos hidrolizables, de madera y corteza (Ohara y Hemingway, 1989; Sun *et al.*, 1987; Nonaka *et al.*, 1985) así como de hojas (Mueller-Harvey *et al.*, 1987, Nonaka *et al.*, 1991), que la mezcla metanol-agua (Fechtal y Riedl, 1991; Scalbert *et al.*, 1988, 1990). Sin embargo, dicha mezcla acetona-agua no ha dado tasas de recuperación elevadas con todas las plantas ensayadas (Martin y Martin, 1984;

Stafford y Cheng, 1980), cuestionandose la estabilidad de los taninos condensados en la misma (Cork y Krockenberger, 1991).

Hay que tener en cuenta que la presencia de agua en los disolventes orgánicos puede aumentar el rendimiento de extracción de los polifenoles, pero también facilita su degradación después de la extracción (Swain, 1979; Lindroth y Pajutee, 1987) y, en este sentido, la elección del contenido de agua de la mezcla disolvente parece que, por lo general, ha sido arbitraria.

Otros parámetros, como el tiempo de extracción, han sido aún menos sistemáticamente estudiados, siendo muy pocas veces cuantificado el grado de extracción o de degradación de los taninos. Así, en las extracciones de taninos han sido empleados tiempos que varían desde unos pocos minutos hasta uno o varios días. Los períodos de extracción cortos tienden a minimizar la degradación química de los taninos extraídos, y los tiempos prolongados, por el contrario, a incrementar la extracción. De la misma forma, las metodologías publicadas, generalmente tampoco incluyen recomendaciones sobre la temperatura, la exposición a la luz, u otros factores que pueden afectar considerablemente a la estabilidad de los polifenoles.

Por otra parte, aunque son frecuentes las revisiones y trabajos publicados sobre metodología química y bioquímica para el análisis de taninos, las referentes a la preparación de muestras para los análisis químicos, son muy escasas.

Recientemente, Hagerman (1988) y Cork y Krockenberger (1991) han abordado la problemática de la extracción de taninos de hojas y han investigado sobre las condiciones óptimas para la extracción de éstos y otros compuestos fenólicos, a partir de *Eucalyptus spp.* Se han centrado, en particular, en el estudio de los métodos de secado de las hojas, de los disolventes de extracción y del efecto de la luz y la temperatura en la eficacia de la extracción, considerando la estabilidad de los taninos condensados y los

niveles de fenoles totales. Estos autores concluyen que la acetona acuosa es mejor disolvente que el metanol acuoso para taninos condensados y fenoles totales, aunque la estabilidad de los primeros resultase ser menor en dicha acetona acuosa, y se viese también afectada por la temperatura y la exposición a la luz.

1.2 Método de extracción.

Al seleccionar el método de extracción, nuestro objetivo primordial ha sido mimar, vigilar y preservar la estabilidad de los compuestos a analizar, aún en detrimento del rendimiento de extracción y, por ello, elegimos la mezcla metanol-agua como disolvente de extracción.

El procedimiento de extracción empleado se ha basado fundamentalmente en los métodos descritos por Hillis *et al.* (1974), Yazaki y Hillis (1976), Scalbert *et al.* (1988, 1989), Cork y Krockenberger (1991) y Fechtal y Riedl (1991).

El esquema del método seguido para la extracción de los taninos de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.*, así como las etapas posteriores de preparación de los extractos para su análisis, se recoge en la figura IV.1. A continuación, se amplía la información con los siguientes comentarios aclaratorios:

- El disolvente de extracción MeOH-H₂O (4:1) fue elegido como el más apropiado después de ensayarse otras proporciones.
- Todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente y evitando la luz directa, con el objeto de proteger a los polifenoles de reacciones de degradación, isomerización o polimerización, a las que son tan susceptibles.

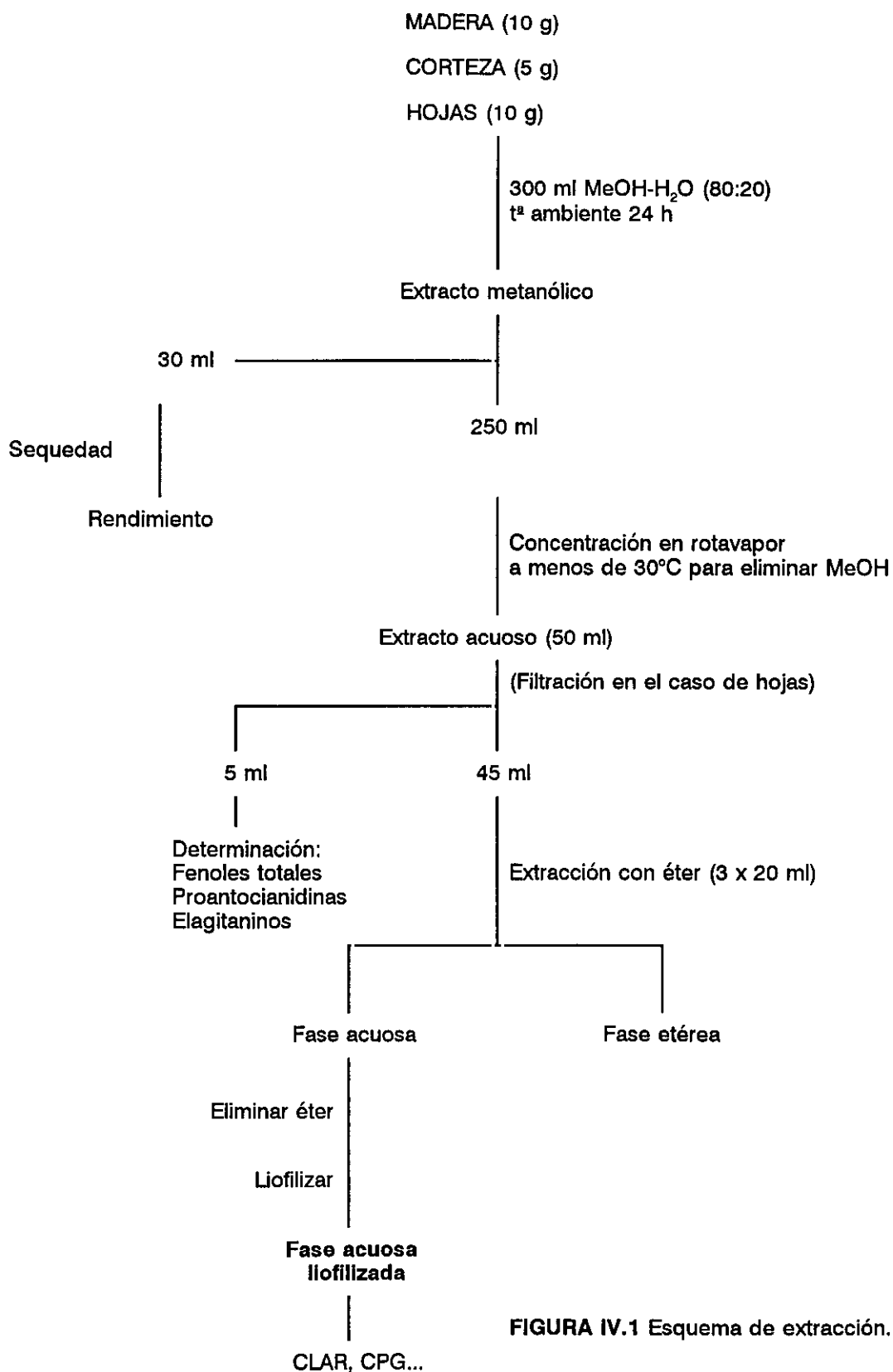


FIGURA IV.1 Esquema de extracción.

- En la extracción a partir de hojas, durante el proceso de concentración aparece un precipitado, posiblemente ceras, clorofilas y grasas, que es separado por filtración, antes de la extracción con éter. El análisis de este precipitado demostró la ausencia de polifenoles y por eso no se toma en consideración.
- La extracción con éter etílico del extracto acuoso concentrado, se realizó con el objeto de extraer los fenoles de bajo peso molecular, tales como los ácidos gálico y elágico, catequina y, en general, los aglicones de los flavonoides, que podrían interferir en el análisis de las proantocianidinas y elagitaninos.
- En algunos casos, la extracción con éter etílico generó unas fuertes emulsiones. La adición de NaCl facilitó su eliminación, pero, al disolverse en la fase acuosa, imposibilitó el cálculo del rendimiento de liofilizado.

Las fases acuosas finales, único objeto de estudio en la Tesis, por encontrarse en ellas la casi totalidad de los taninos solubles: proantocianidinas y elagitaninos, fueron sometidas a liofilización para su conservación hasta la realización de los análisis.

2. Análisis cuantitativo de los diferentes tipos de taninos.

Las valoraciones del contenido de fenoles totales, proantocianidinas y elagitaninos se han llevado a cabo en los extractos brutos de MeOH-H₂O de madera, corteza y hojas, una vez realizada la fase de concentración para la eliminación del metanol (ver esquema de extracción de la fig. IV.1).

2.1 Método de determinación de fenoles totales de Folin-Ciocalteu.

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una solución ácida de polímeros complejos de los

ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico. Este reactivo, de color amarillo, oxida los fenolatos, reduciéndose los ácidos del reactivo, para dar lugar a un complejo azul de molibdeno-wolframio. En este proceso se produce una reducción parcial del estado de valencia de Mo y W de +6 a +5. Una reducción completa, a la valencia más baja, destruye el color. La naturaleza de estos complejos no se conoce bien (Singleton y Rossi, 1965).

Los fenoles sólo son oxidados rápidamente en un medio suficientemente alcalino. Pero, en estas condiciones, el reactivo oxidante y el pigmento azul son inestables. Por ello, el reactivo deberá encontrarse en exceso, para que, aún a pH alcalino, se conserve al menos una fracción inalterada durante el tiempo necesario para reaccionar con todos los fenoles.

El método utilizado en este trabajo está basado en el de Singleton y Rossi (1965). Estos autores estudiaron las características diferenciadoras de los reactivos de Folin-Denis y Folin-Ciocalteu, y modificaron éste último en orden a incrementar su sensibilidad y selectividad frente a los fenoles. En este trabajo se selecciona una longitud de onda de 760 nm, como óptima para la lectura de la absorción del complejo azul.

Estos autores recomiendan la utilización de una serie de compuestos como patrones, para la obtención de curvas de calibración. Entre ellos, hemos seleccionado el ácido gálico.

Concretamente, el método aplicado fue el siguiente: a 0,5 ml del extracto acuoso (ver figura IV.1), se añaden 2,5 ml de una solución acuosa al 10% del reactivo Folin-Ciocalteu y 2 ml de Na_2CO_3 al 7,5%. La mezcla se mantiene durante 5 minutos en baño maría a 50°C. Después se enfría, y se centrifuga si se observa aparición de precipitado. Se mide la absorbancia a 760 nm. El extracto acuoso debe diluirse de tal forma que los productos de reacción den unos valores de absorbancia inferiores o iguales a 0,5.

La curva de calibración se realizó con soluciones acuosas de ácido gálico de 2,5-40 $\mu\text{g/ml}$, sometidas al mismo tratamiento que las muestras y fue elaborada a partir de tres repeticiones para cada concentración, aplicando el método de mínimos cuadrados para el ajuste de los valores obtenidos. La recta cumple la ecuación de Lambert-Beer cuando la absorbancia es inferior a 0,5. El coeficiente de extinción molar para el ácido gálico resultó ser de $22,3 \cdot 10^3$ y el r^2 de la recta 0,998.

2.2 Determinación de proantocianidinas mediante el método de la vainillina-ácido.

Como ya se ha discutido ampliamente en el apartado II.2.8 de la introducción, los flavanoles monoméricos y los taninos condensados reaccionan fácilmente con los aldehídos. Así, con la vainillina en medio ácido dan productos de condensación cromóforos, con un máximo de absorbancia alrededor de 500 nm. En el caso particular de las proantocianidinas, la condensación no supone la ruptura del polímero y la reacción tiene lugar como se esquematiza en la figura IV.2.

Este método de la vainillina-ácido ha sido utilizado ampliamente para la valoración de los flavanoles y proantocianidinas, ya que proporciona un método selectivo, sensible y relativamente sencillo para dicha valoración (Swain y Hillis, 1959; Broadhurst y Jones, 1978; Price *et al.*, 1978; Makkar y Becker, 1993).

Con objeto de obtener otros cromóforos con coeficientes de absorción superiores, se han ensayado otros aldehídos aromáticos en lugar de vainillina (Putman y Butler, 1985); sin embargo, los métodos que utilizan esta última han resultado más adecuados para la mayoría de las aplicaciones.

El medio de reacción es diverso según los distintos métodos que se han descrito. Mientras que Swain y Hillis (1959) utilizan la vainillina en ácido sulfúrico al 70%, otros

investigadores (Broadhurst y Jones, 1978; Price *et al.*, 1978) prefieren, en lugar de este ácido, la mezcla MeOH-HCl. Parece ser que este último método da valores de absorbancia considerablemente inferiores a los obtenidos con el del ácido sulfúrico, lo que pudiera ser debido a la inestabilidad de los iones carbonio en medio clorhídrico (Swain y Hillis, 1959; Scalbert *et al.*, 1989). Por otra parte, en la valoración de catequinas utilizando ácido sulfúrico al 70% se han obtenido curvas estándar lineales (Scalbert *et al.*, 1989), mientras que en los métodos que usan ácido clorhídrico en MeOH no ha sido observada linealidad (Price *et al.*, 1978). Estos inconvenientes han llevado al estudio de otros medios de reacción como el ácido acético glacial (Butler *et al.*, 1982), pero sin embargo, el MeOH ha sido el disolvente más ampliamente elegido en la determinación de proantocianidinas, ya que la reacción se hace menos sensible a unidades monoméricas, tales como catequinas, que a los taninos poliméricos.

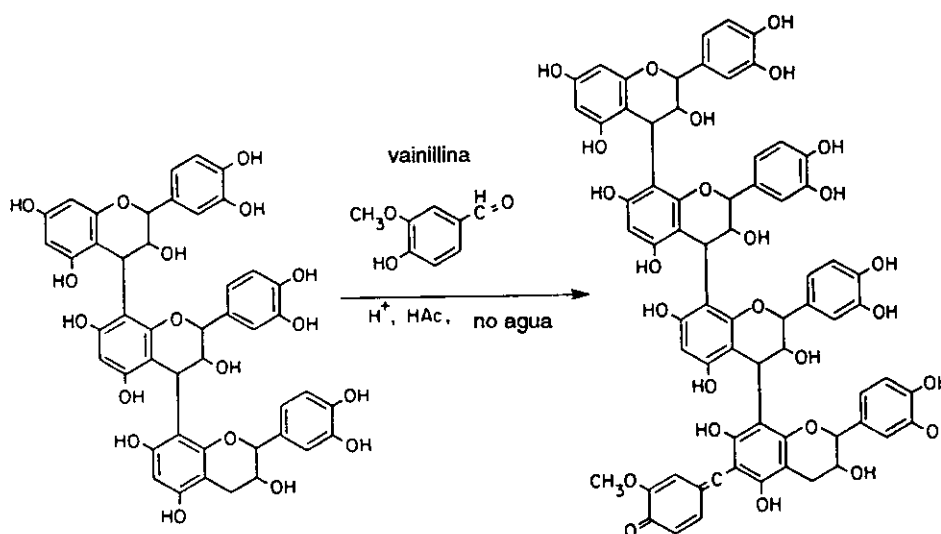


FIGURA IV.2 Reacción de conjugación de los taninos condensados con vainillina.

El método utilizado por nosotros fue básicamente el de Swain y Hillis (1959), teniendo en cuenta las optimizaciones descritas por Scalbert *et al.* (1989) y se detalla a continuación.

A 1 ml de extracto acuoso, se añaden 2 ml de una solución, recién preparada, que contiene 1 g de vainillina en 100 ml de H₂SO₄ 70%. La reacción se lleva a cabo en baño de agua a 20±1°C durante 15 minutos. A continuación, se mide la absorbancia a 500 nm.

Para la obtención de la recta de calibrado, en este caso se utilizó catequina como patrón. Se prepararon soluciones acuosas de catequina en un rango de 2,5-40 µg/ml y se sometieron a los mismos tratamientos que las muestras, realizando tres repeticiones por cada concentración. Los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las concentraciones ensayadas, se ajustaron, mediante el método de mínimos cuadrados, a una recta que cumplió la ley de Lambert-Beer. El coeficiente de extinción molar de la catequina fue 34,3.10³ y el r² de la recta 0,998.

2.3 Método de determinación de elagitaninos.

La valoración de los elagitaninos se llevó a cabo mediante la determinación por CLAR del ácido elágico liberado, después de su hidrólisis ácida.

2.3.1 Hidrólisis ácida.

La hidrólisis ácida de elagitaninos se realizó utilizando el método descrito por Wilson y Hagerman (1990), con algunas modificaciones, según se describe a continuación.

A muestras de 0,5 ml de extracto bruto acuoso concentrado (ver figura IV.1.), se les añadió 0,5 ml de H₂SO₄ 4N. Esta mezcla, una vez congelada, se cerró al vacío en un

liofilizador y posteriormente se calentó a 100°C durante 24 h. Cuando la hidrólisis se dió por finalizada, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les añadió 1 ml de MeOH, con objeto de facilitar la redisolución del ácido elágico y otros compuestos que pudieran haber quedado en suspensión. Finalmente, se procedió a la valoración del ácido elágico por CLAR después de filtrar la solución a través de filtros de 0,45 μm .

2.3.2 Valoración del ácido elágico por CLAR.

La separación cromatográfica del ácido elágico se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el apartado 3.1.2, siendo el gradiente de elución utilizado el nº 2. La longitud de onda específica para la detección de ácido elágico es 255 ± 2 nm.

Para la cuantificación del ácido elágico, se utilizó como referencia una recta de calibrado obtenida con soluciones patrón de ácido elágico en metanol, en el rango de concentración de 1-40 $\mu\text{g/ml}$, las cuales se analizaron por CLAR en las mismas condiciones que las muestras. La ecuación de la recta de regresión, obtenida por ajuste de mínimos cuadrados, fue $y=6,86 \cdot 10^{-6}x+3,78 \cdot 10^{-4}$, donde y es la concentración de ácido elágico expresada en $\mu\text{g/ml}$ y x el área del pico cromatográfico, expresada en unidades de integrador, resultando un coeficiente de correlación r^2 de 0,999.

3. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

3.1 CLAR en fase inversa.

3.1.1 Bases teóricas.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se ha desarrollado espectacularmente en los últimos años, gracias a los avances de la instrumentación, sobre

todo en la calidad de los sistemas de bombeo, y en la mejora de la sensibilidad de los detectores y, por otra parte, en la variedad de material y tamaño de partícula de los rellenos de las columnas. Comúnmente, es conocida como HPLC, siglas inglesas de "High Performance Liquid Chromatography".

La parte fundamental de un cromatógrafo de líquidos consta de la columna cromatográfica, a través de la cual circula la fase móvil, líquida, en contacto con la fase estacionaria contenida en la columna. El mecanismo de separación se basa en la diferente afinidad que presentan los solutos por las dos fases, que determina su distribución entre ambas. Aquellos solutos que sean más afines a la fase móvil, serán eluidos más rápidamente, y los más afines a la fase estacionaria serán más retenidos, y por tanto tardarán más en salir de la columna.

La cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (o fase reversa) se basa en la utilización de una fase estacionaria de carácter apolar y una fase móvil polar. La fase estacionaria consiste en un relleno de sílice, modificado mediante el bloqueo de sus grupos activos con alquilsilanos de cadena lineal (octadecilsilano, C_{18} u octilsilano, C_8), o fenilsilanos. Las columnas C_{18} son las más frecuentemente utilizadas (Van de Castele *et al.*, 1983; Verzele *et al.*, 1986; Mueller-Harvey *et al.*, 1987; Dhingra y Davis, 1988; Hatano *et al.* 1988a; Putman y Butler, 1989; Scalbert *et al.*, 1990), aunque algunos trabajos describen la utilización de columnas C_8 (Lea, 1980; Harborne, 1985; Hostettmann y Marston, 1986).

En el análisis cromatográfico de polifenoles los eluyentes utilizados con más frecuencia han sido mezclas de metanol-agua, generalmente acompañados de ácidos como fórmico (Van de Castele *et al.*, 1983), acético (Mueller-Harvey *et al.*, 1977; Treutter, 1989) o fosfórico (Scalbert *et al.*, 1990). Estos ácidos facilitan la separación, impiden la formación de colas en los picos y evitan la disociación protónica de los hidroxilos fenólicos.

En lo que concierne al régimen de elución, lo más recomendable es el empleo de gradientes lineales o curvos.

En la cromatografía líquida en fase inversa, los compuestos son adsorbidos, inicialmente, por la fase estacionaria mediante interacción hidrofóbica, y, después, son eluidos por la fase móvil polar, debido al establecimiento de puentes de hidrógeno entre dicha fase móvil y los compuestos. Por ello, para comprender la secuencia de elución debe considerarse tanto la capacidad donadora como la aceptora de protones de cada compuesto, decisivas en la formación de puentes de hidrógeno, así como por su influencia en la interacción hidrofóbica.

3.1.2 Método empleado.

En este trabajo se utilizó CLAR en fase inversa para el análisis de diferentes tipos de muestras:

- * En primer lugar, se analizaron por esta técnica las fases acuosas liofilizadas de los extractos de *Eucalyptus spp.* (ver figura IV.1), en las cuales se encuentran la práctica totalidad de las proantocianidinas y elagitaninos solubles. Para ello, 200 mg de material liofilizado, se disolvieron en 1 ml de MeOH/H₂O (1:1) y se filtraron luego a través de filtros de 0,45 μ m.
- * Por otro lado, se empleó también la técnica de CLAR en fase inversa para el análisis de los productos de la hidrólisis de elagitaninos (apartado 2.3.2 y 4.2); así como de los hidrolizados de proantocianidinas (apartado 5.3).

El cromatógrafo empleado para los análisis por CLAR fue un Hewlett-Packard mod. 1050 M, con sistema de bombeo cuaternario, inyector automático, detector de fotodiodos mod. 1040 M y estación de tratamiento de datos.

El detector se programó estableciendo distintos canales de adquisición de información, a cada uno de los cuales se le asignó un rango de longitudes de onda. El de aplicación general (de longitud de onda 325 nm, con un ancho de banda de 150 nm) permite el reconocimiento y obtención del espectro UV de todos aquellos compuestos que presenten absorción en este rango de longitudes de onda. Así mismo, se establecieron canales específicos de detección: a 280 ± 2 nm, característico de catequinas, proantocianidinas y galotaninos; 255 ± 2 nm y 375 ± 2 nm, de ácido elágico y elagitaninos; y 535 ± 10 nm, de antocianidinas.

La columna utilizada fue de acero inoxidable, con relleno Hypersil ODS, de 200x4 mm d.i., de 5 μ m de tamaño de partícula y protegida con una precolumna con relleno de las mismas características.

En cuanto a los sistemas eluyentes, se ensayaron distintas composiciones y gradientes. Se modificó el agente acidificante, probando los ácidos fórmico, acético y fosfórico. Además, se comprobó la necesidad de acidificar por igual los dos componentes de la mezcla eluyente, es decir el MeOH y el H₂O, ya que al utilizar detector de fotodiodos, si se acidifica sólo el H₂O, se produce una variación en la concentración de ácido a lo largo del gradiente y, por tanto, de la absorción UV de la mezcla eluyente, lo que provoca desajuste en el detector.

El sistema de eluyentes con el que se obtuvieron mejores resultados fue el formado por A: MeOH-H₃PO₄ (999:1) y B: H₂O-H₃PO₄ (999:1) y se emplearon diferentes gradientes según el tipo de compuestos a los que se pretende aplicar el análisis cromatográfico:

- * El gradiente 1 se caracteriza por el lento incremento de la proporción de metanol y así, es apropiado para la separación de muestras con componentes más polares, como es el caso de las fracciones acuosas liofilizadas (fig. IV.1), ricas en

proantocianidinas y elagitaninos.

Gradiente 1:

t(min)	A : B
0	0:100
80	60:40
90	100:0
95	100:0
100	0:100
105	0:100

- * El gradiente 2, más corto y con un incremento más rápido de la proporción de metanol, fue aplicado para el análisis de los productos de la hidrólisis u otras reacciones degradativas de elagitaninos y proantocianidinas.

Gradiente 2:

t(min)	A : B
0	20:80
40	100:0
45	100:0
50	20:80
55	20:80

En todos los análisis el flujo se mantuvo a 1 ml/min, la temperatura del horno cromatográfico se fijó en 30°C y el volumen de inyección programado fue de 20 μ l.

Para la preparación de los eluyentes, se utilizaron disolventes orgánicos de calidad CLAR, agua bidestilada purificada mediante un sistema Milli Q^R de Millipore y H₃PO₄

puro. Tanto los eluyentes como las muestras a analizar se filtraron a través de filtros de 0,45 μm .

3.1.3 Identificación directa de compuestos fenólicos por CLAR.

La posibilidad de trabajar con detector de fotodiodos y librerías de espectros UV de patrones facilita notablemente la identificación de compuestos fenólicos, al poder comparar los espectros obtenidos en nuestros picos problema con los existentes en la librería de espectros de patrones. Sin embargo, el problema principal es la falta de patrones comercializados. El estudio del espectro UV correspondiente a cada pico cromatográfico ha constituido la base para la clasificación de los taninos en proantocianidinas y elagitaninos.

Las identificaciones directas por CLAR se han utilizado para el análisis de algunos de los productos de la hidrólisis de proantocianidinas y elagitaninos. En general, se ha procedido en todos los casos de la siguiente manera:

- 1 Obtención del espectro UV del pico cromatográfico problema para su comparación con los existentes en librería.
- 2 Comprobación de la semejanza de los tiempos de retención (t_R) del patrón y del compuesto en cuestión utilizando el gradiente habitual.
- 3 Aplicación del método de enriquecimiento de pico, añadiendo una pequeña cantidad del patrón a la muestra, lo cual deberá producir un aumento del tamaño del pico del compuesto problema. Esta mezcla se analiza nuevamente por CLAR utilizando los eluyentes habituales y dos gradientes diferentes, comprobado si el pico patrón-compuesto problema se desdobra o permanece como un único pico en los dos gradientes.

3.2 Cromatografía de permeabilidad por geles (CPG).

3.2.1 Bases teóricas.

Las técnicas de cromatografía de exclusión por tamaño se vienen utilizando desde hace tiempo en el estudio de la distribución de pesos moleculares de polímeros y, dada su naturaleza de técnicas cromatográficas, se han incorporado recientemente al campo de la CLAR. Hoy en día, casi toda la cromatografía de exclusión se realiza por CLAR. La conjunción de ambas técnicas se conoce como cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (Anderson, 1976; Billingham, 1976; García de Marina y del Castillo, 1988; Yau *et al.*, 1979).

La cromatografía de exclusión se basa en la penetrabilidad diferencial de las moléculas, en los poros de las partículas del relleno de una columna. Cuanto menor sea el tamaño de la molécula mayor será su penetrabilidad y mayor la retención en la columna. Así, es posible separar de una muestra componentes de tamaños moleculares suficientemente diferentes. La denominación de cromatografía de exclusión se debe al hecho de que moléculas muy grandes, que en otros tipos de CLAR eran muy retenidas o erosionaban la columna, en este caso, al no entrar en los poros, eluyen en primer lugar.

La fase móvil o eluyente idóneo debe estar constituido por moléculas pequeñas, en general menores que las de la muestra a analizar, y por ello sale en último lugar de la columna. La fase estacionaria consta de partículas porosas e irregulares formando geles rígidos, que son resistentes a las altas presiones aplicadas usualmente en este tipo de cromatografía.

La cromatografía de exclusión, según se opere en fase normal (con eluyentes orgánicos, para muestras lipófilas) o bien en fase inversa (con eluyentes acuosos, para muestras hidrófilas), recibe, respectivamente, la denominación de cromatografía de

permeabilidad por geles o cromatografía de filtración por geles.

La cromatografía de exclusión es una técnica sencilla y que no requiere gran precisión. Otra de sus ventajas frente a otras técnicas cromatográficas es que los tiempos de retención dependen sólo del tamaño de las moléculas a separar sin la intervención de procesos de adsorción, partición o iónicos; aunque es preciso señalar que no se da una retención propiamente dicha, si no un alargamiento del camino recorrido por los compuestos en la columna.

Así, esta técnica es de utilidad para la resolución de mezclas complejas de sustancias con tamaños moleculares distintos. Se ha aplicado muy especialmente para obtener información sobre distribución de pesos moleculares de biopolímeros y, entre ellos, mezclas complejas de taninos (Samejima y Yoshimoto, 1979; Foo *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1983).

Debido a la presencia de grupos hidroxilo en las moléculas de los taninos, éstos pueden estar sometidos a fenómenos de adsorción en el gel o bien tender a formar asociaciones intermoleculares mediante enlaces de hidrógeno, lo que, en ambos casos, lleva a una estimación errónea de los pesos moleculares. Tanto los mencionados fenómenos de adsorción en el gel como las asociaciones intermoleculares pueden ser eliminados, o por lo menos minimizados, mediante la utilización de fases móviles muy polares, como dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilformamida (DMF), que forman enlaces de hidrógeno con los polímeros, y llegan a solvatarlos completamente (Brown, 1967; Kristersson *et al.*, 1983). El tetrahidrofurano (THF) también puede eliminar asociaciones débiles o enlaces de hidrógeno, sin producir una excesiva solvatación (Yau *et al.*, 1979).

Otro procedimiento para disminuir dichos fenómenos, es bloquear los grupos hidroxilo mediante la preparación de derivados acetilados (Lange *et al.*, 1981; Faix *et al.*, 1980, 1981; Foo *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1983), metilados (Karchesy y Hemingway,

1980; Samejima y Yoshimoto, 1981), o sililados (Mansson, 1981).

A pesar de que las técnicas de CPG se han utilizado con cierta frecuencia en el análisis de otros tipos de productos vegetales complejos, las referencias a taninos son muy escasas y la mayor parte de la metodología utilizada se ha basado en los estudios realizados con ligninas, pudiéndose considerar que, en este caso, la metodología de CPG que ha dado los mejores resultados es la que se sirve de los derivados acetilados como muestras y como eluyente THF.

Concretamente, se han realizado estudios sobre caracterización de taninos en corteza de pino por CPG (Karchesy y Hemingway, 1980; Samejima y Yoshimoto, 1981), en los que se utilizan los derivados metilados de los taninos, obtenidos por tratamiento con diazometano. Sin embargo, habría que señalar que la metilación de polihidroflavanoles con diazometano, a menudo, es muy variable y da grados muy diferentes de derivatización, mientras que la acetilación que conduce a derivados peracetilados, en el caso de proantocianidinas, ha dado los mejores resultados para el estudio de distribución de pesos moleculares por CPG (Foo *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1983; Koupai-Abyazani *et al.*, 1993; Rigaud *et al.*, 1993).

Por otro lado, la utilización conjunta de un eluyente como THF y de los derivados acetilados, en el análisis por CPG de taninos y otros biopolímeros, minimiza las interacciones debidas a enlaces de hidrógeno entre polímero y disolvente (Faix *et al.*, 1980, 1981; Lange *et al.*, 1981, 1983; Meier y Schwweers, 1981, Foo *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1983), las cuales podrían conducir a una sobreestimación del tamaño molecular (Philip y Anthony, 1984), debido a los grupos hidroxilo libres del biopolímero, que forman enlaces de hidrógeno con el THF. El uso de derivados acetilados previene este tipo de asociaciones.

3.2.2 Métodos empleados.

3.2.2.1 Preparación de las muestras para el análisis por CPG.

Los análisis de CPG se llevaron a cabo en la fase acuosa liofilizada (fig. IV.1), en la que los taninos fueron acetilados siguiendo básicamente el método descrito por Williams *et al.* (1983), según se describe a continuación.

Muestras de 5-10 mg fueron disueltas en 2 ml de una mezcla de piridina-anhidrido acético (1:1). Después de una noche a temperatura ambiente, la mezcla fue vertida sobre 10 ml de H₂O destilada y sometida a agitación durante una hora. El precipitado obtenido, formado por los derivados peracetilados de los taninos, se recuperó por filtración a vacío, o mediante extracción con éter etílico, en el caso de muestras en las que no se había obtenido precipitado visible. Una vez lavado con H₂O destilada, el precipitado se secó a vacío y se disolvió en su totalidad, 2-5 mg, en 1ml de THF. La disolución se filtró a través de filtros de 0,60 μ m, para ser inmediatamente analizada por CPG.

El control de la eficacia de la acetilación fue realizado por CLAR, utilizando el gradiente de elución nº 2 descrito en el apartado 3.1.2.

3.2.2.2 Análisis por CPG.

Los análisis de CPG, se realizaron en el mismo cromatógrafo utilizado para la CLAR y descrito en el apartado 3.1.2. En este caso, el detector de diodos fue programado con tres canales de adquisición de información: uno general para proantocianidinas y elagitaninos, con una longitud de onda de 270 nm y un ancho de banda de 30 nm, otro específico de proantocianidinas a 280 ± 2 nm y un tercero, específico de elagitaninos, a 255 ± 2 nm.

La columna utilizada fue una columna HP-PL gel Mixed-D, protegida con precolumna del mismo material y las condiciones de análisis las siguientes:

eluyente	THF
flujo	1 ml/min
temperatura	30°C
volumen de inyección	20 μ l
tiempo de análisis	15 min

La calibración de la columna fue realizada mediante patrones de poliestireno de un rango de pesos moleculares de 162 a 22.000, sometidos a las mismas condiciones de CPG que las muestras. Se inyectaron 20 μ l de cada solución patrón de 1-2 mg/ml de concentración.

Los cálculos estadísticos de los pesos moleculares medios se hicieron mediante el "GPC Software" suministrado con el cromatógrafo Hewlett-Packard utilizado.

4. Caracterización de los taninos hidrolizables.

La caracterización de los taninos hidrolizables o elagitaninos se realizó en la fase acuosa liofilizada (fig. IV.1). En primer lugar, estos liofilizados fueron sometidos a una hidrólisis ácida, y a continuación se procedió a la identificación de los productos de la hidrólisis de los elagitaninos, concretamente compuestos polifenólicos y azúcares.

4.1 Hidrólisis ácida.

En esencia, se procedió como ha sido descrito en el apartado 2.3.1, con la

introducción de ligeras adaptaciones. La hidrólisis se llevó a cabo con 5-10 mg de muestra seca a la que se le añadió 1 ml de H₂SO₄ 2N, a 100°C, durante 24 h y en vacío. Después de la adición de MeOH y del filtrado habitual, la muestra se analizó por CLAR con el fin de identificar los compuestos fenólicos.

Este procedimiento de hidrólisis se modificó para las muestras cuyo destino fue el análisis de azúcares por CG-EM. En este caso, el H₂SO₄ 2N fue sustituido por HCl 6N, ácido más volátil, lo que facilita el secado del hidrolizado, paso previo indispensable a la preparación de los trimetilsilil (TMS) derivados de los azúcares para su análisis por CG-EM.

4.2 Análisis por CLAR de los polifenoles generados en la hidrólisis.

Los hidrolizados, obtenidos según el método que se acaba de describir, fueron analizados por CLAR bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.1.2., gradiente 2. En este caso los canales de adquisición seleccionados fueron el general, de 325 ± 75 nm, y el específico de elagitaninos, de 255 ± 2 nm.

Los compuestos polifenólicos producto de la hidrólisis de los taninos hidrolizables, fueron identificados directamente por CLAR por su espectro UV y su tiempo de retención, en el caso de los compuestos existentes en la librería de patrones (apartado 3.1.3.).

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó, para aquellos compuestos de los que se disponía de patrón, en base a las áreas de los picos obtenidos a 325 ± 75 nm y mediante la utilización de rectas de calibrado. En el caso de compuestos de los que no disponíamos de patrón, la cuantificación se hizo en base a un patrón estructuralmente relacionado y suponiendo la semejanza de los coeficientes de absorción molar.

Los patrones seleccionados fueron ácido gálico y ácido elágico y las ecuaciones de las rectas de calibración correspondientes, considerando el canal de adquisición de datos de 325 ± 75 nm, las siguientes:

Acido gálico	$y=9,6 \cdot 10^{-5}x-2,85 \cdot 10^{-2}$	$(r^2=0,991)$	$(0,02-0,6 \text{ mg/ml})$
Acido elágico	$y=3,3 \cdot 10^{-5}x+8,10 \cdot 10^{-5}$	$(r^2=0,999)$	$(0,002-0,04 \text{ mg/ml})$

donde, x es el área del pico cromatográfico expresado en unidades de integrador, e y la concentración de patrón en mg/ml.

4.3 Análisis de azúcares por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

4.3.1 Bases teóricas.

La enorme difusión de la aplicación de la espectrometría de masas al análisis orgánico ha sido debida, principalmente, al desarrollo de aspectos tan diversos como el acoplamiento de la espectrometría de masas a la cromatografía de gases, a la introducción de métodos químicos de derivatización por los que se consigue el incremento de volatilidad y la estabilización de moléculas térmicamente inestables, y al desarrollo de los sistemas de procesado de datos.

Existe una amplia gama de técnicas de espectrometría de masas, pero todas ellas incluyen procesos que en esencia están dirigidos a conseguir la producción de iones en fase gaseosa, la posterior descomposición de los iones en fragmentos cargados y la separación de éstos en función de la relación masa/carga.

Por otra parte, la complejidad de los equipos de espectrometría de masas es variable y tiene que ver, como antes señalamos, con los sistemas o técnicas empleados

para la producción de iones y el método de separación de los mismos, así como con el sistema de inyección de muestras y en menor medida, con el de detección de dichos iones (Harvey, 1992).

La técnica clásica de espectrometría de masas de impacto electrónico, en la que la producción de iones se realiza mediante bombardeo de la muestra con un haz de electrones de alta energía, viene siendo ampliamente utilizada, desde hace tiempo, en el análisis de hidratos de carbono, en particular. Se trata de una técnica especialmente efectiva cuando se acopla a la cromatografía de gases.

Tanto por su inestabilidad térmica como por la dificultad para volatilizarlos en su estado natural, los azúcares, incluso los monosacáridos, deben ser derivatizados a la forma de metil-, acetil- o trimetilsilil- (TMS-) éteres, para que puedan, así, ser analizados por cromatografía de gases (Harvey, 1992; Pierce, 1993). Concretamente, los metiléteres han sido muy utilizados en los análisis por espectrometría de masas, aunque su preparación resulta relativamente dificultosa, debido al hecho de que la molécula de estos derivados aumenta sólo en 14 unidades de masa por cada grupo funcional, frente a las 42 y 72 unidades de los acetil- y trimetilsilil- derivados, respectivamente. Los TMS-derivados, por el contrario, presentan buenas características para el análisis por cromatografía de gases ya que son térmicamente muy estables, aunque también, pueden dar lugar a varios picos cromatográficos al presentarse en solución los anómeros α y β de las dos formas de anillos, furanósido (5 eslabones) y piranósido (6 eslabones); sin embargo, esta situación puede evitarse con la utilización de las formas alditol (Klock *et al.*, 1981; Oshima *et al.*, 1983). A pesar de todo ello, los TMS-derivados dan espectros de masas de ionización por impacto electrónico muy valiosos e informativos, que pueden ser utilizados para la identificación de los monosacáridos (Harvey, 1992).

La espectrometría de masas, como técnica de detección, presenta también ciertas ventajas cuando el análisis cromatográfico no resulta satisfactorio, ya sea porque la

separación es insuficiente, o porque existen dudas acerca de la identificación de los picos cromatográficos. Así, una detección selectiva de iones permite distinguir los picos procedentes de azúcares y de los de compuestos fenólicos. También aporta información acerca del tamaño del anillo de ciclación de los azúcares (Radford y de Jongh, 1972). Así, el espectro de masas de los TMS-piranósidos presenta un pico base de m/z 204 $\{[(\text{CH}_3)_3\text{Si-O-CH=CH-O-Si}(\text{CH}_3)_3]^+\}$, mientras que los TMS-furanósidos lo tienen a m/z 217 $\{[(\text{CH}_3)_3\text{Si-O=CH-CH=CH-O-Si}(\text{CH}_3)_3]^+\}$. Sin embargo, los espectros de masas de las formas α y β no resultan diferentes.

Volviendo a las técnicas de derivatización en relación con la cromatografía de gases, es preciso, en primer lugar, tener en cuenta algunas consideraciones generales, como las siguientes: los silil-derivados se obtienen por sustitución de hidrógenos activos de ácidos, alcoholes, tioles, aminas, cetonas enolizables y aldehídos por grupos trimetilsililo. El término sililación se usa tanto como abreviatura de trimetilsililación, como para referirnos a la unión con otros grupos sililo, como dimetilsilil $[-\text{SiH}(\text{CH}_3)_2]$, t-butildimetilsilil $[-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3]$ y clorometildimetilsilil $[-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}(\text{CH}_3)_2]$ (Pierce, 1968; Knapp, 1979). Los trimetilsilil derivados presentan la ventaja de la alta estabilidad térmica, como ya se ha señalado; sin embargo, el agua descompone tanto los reactivos como los TMS derivados. Dado que los reactivos de sililación reaccionan con átomos de hidrógeno activos, deben evitarse todos los disolventes que los contengan, o que sean capaces de generarlos. Así se suelen usar, como disolventes, piridina, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y acetonitrilo (Pierce, 1993).

En cuanto a la obtención de TMS derivados de azúcares son varios los reactivos disponibles o descritos en la bibliografía. Sweeley *et al.* (1963) desarrollaron un método que utiliza hexametildisilazano-trimetilclorosilano-piridina (2:1:10) y que ha sido aplicado posteriormente por Arpino *et al.* (1977), por Garcia-Raso *et al.* (1987, 1989) y Martinez-Castro *et al.* (1989). Markham (1982) usa una mezcla de los anteriores reactivos, pero en distintas proporciones. Hay también referencias del empleo de trimetilsililimidazol

(Pierce, 1993; Gómez-Cordovés, 1993, comunicación personal; Garcia-Raso *et al.*, 1987,1992).

En lo que concierne al análisis por cromatografía de gases de los TMS-derivados de azúcares, hay que tener en cuenta un conjunto de consideraciones. En primer lugar, la afinidad que manifiestan los reactivos de sililación y los TMS-derivados por los átomos de hidrógeno activos, condiciona la elección de la columna; así, las que contengan fases estacionarias con ese tipo de grupos pueden verse dañadas irreversiblemente por estos productos. Por ejemplo, no se recomienda el empleo de polietilenglicoles, como el Carbowax, siendo las siliconas las fases estacionarias más utilizadas para el análisis de los TMS-derivados. La alta estabilidad térmica, tanto de dichas fases estacionarias como de los reactivos y derivados, permiten trabajar en un amplio rango de temperaturas. En orden creciente de polaridad, las siliconas más empleadas son: metilsiliconas - SE-30 (Garcia-Raso *et al.*,1987, 1989), OV-1 (Markham, 1982) y OV-101 (Arpino *et al.*, 1977); las fenilmetilsiliconas - OV-17 y OV-25 (Arpino *et al.*, 1977; Garcia-Raso *et al.*, 1987, 1989, 1992), y cianopropilmetilsiliconas y cianopropilfenilmetilsiliconas (Garcia-Raso *et al.*, 1987, 1989).

También es de destacar que debe evitarse el empleo de inyectores de acero inoxidable; se recomienda el empleo de inyectores de vidrio o, simplemente, la inyección directa en columna (Pierce, 1993).

4.3.2 Metodología empleada.

4.3.2.1 Preparación de la muestra.

El análisis, mediante CG-EM, de los azúcares constituyentes de los elagitaninos hubo de realizarse en el extracto en acetato de etilo, obtenido a partir de una solución acuosa del liofilizado; ya que, en la puesta a punto del método, había sido observada la

resencia de azúcares libres en el liofilizado, antes de ser sometido a hidrólisis ácida. Se procedió según el esquema de la figura IV.3.

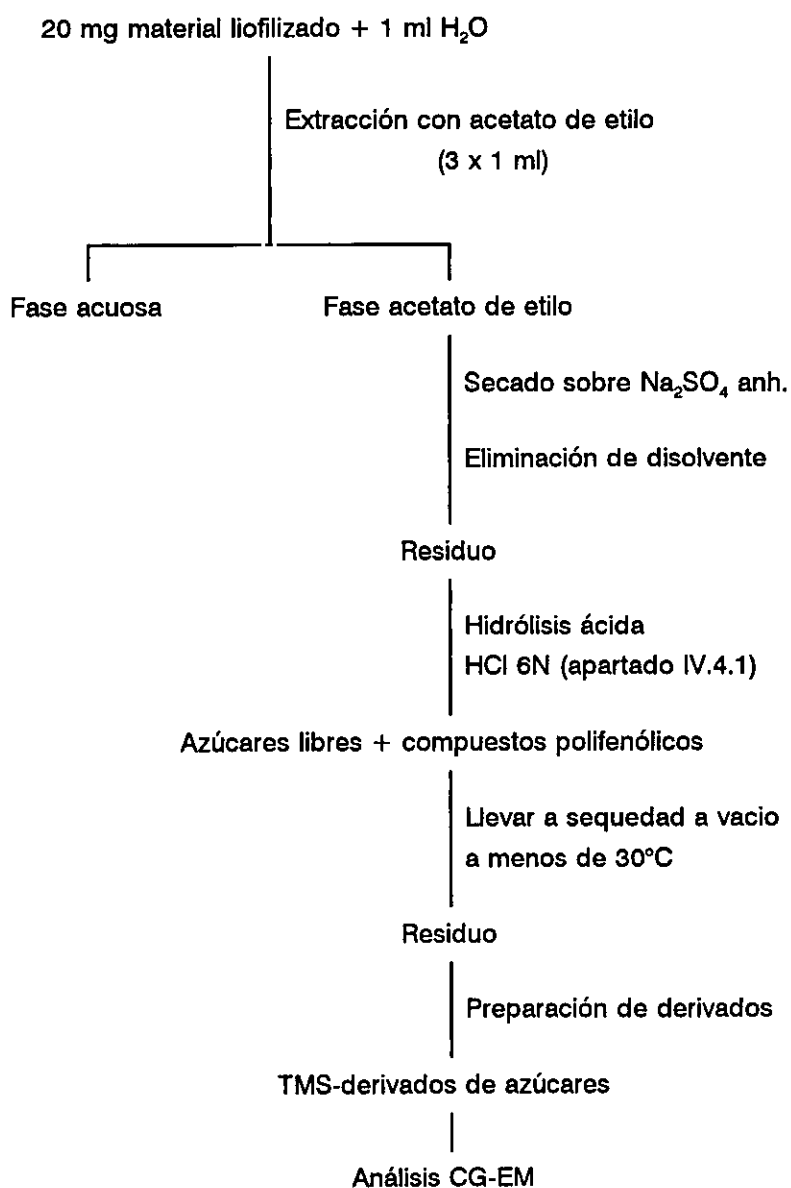


FIGURA IV.3 Esquema de los métodos de preparación de las muestras y de la hidrólisis para el análisis de azúcares por CG-EM.

4.3.2.2 Preparación de los trimetilsilil derivados.

El método seguido fue básicamente el desarrollado por Gil-Alberdi (1987), con las modificaciones introducidas por Conde (1994). Se seleccionó este método, en lugar de otros más específicos de azúcares, con el fin de obtener no sólo los TMS-derivados de los azúcares, sino también, los de los polifenoles que pudieran estar presentes en la solución de hidrólisis. Se utilizaron los siguientes reactivos:

- * N, O-bis (trimetilsilil)-acetamida, BSA (Fluka).
- * Trimetilclorosilano, TMCS (Fluka).
- * Piridina anhidra, preparada mediante destilación sobre hidróxido sódico y dimetilsulfóxido.

Para la obtención de los TMS-derivados, se añade a 1 mg de muestra 0,2 ml de BSA, 0,2 ml de piridina anhidra y 0,1 ml de TMCS. La mezcla se mantuvo en vial cerrado 2 h, a 60°C. Una vez frío, el producto de la reacción se inyecta directamente en el sistema CG-EM.

4.3.2.3 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

El equipo de CG-EM utilizado consta de un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5890, serie II, acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett-Packard 5971. Este detector incluye una fuente de ionización por impacto electrónico y un filtro de masas de cuadrupolo. La energía de ionización fue 70 eV.

Se empleó una columna capilar HP-1 de metilsilicona (12 m x 0,2 mm y 0,33 μm de espesor de película de fase), y se trabajó bajo las siguientes condiciones cromatográficas: temperatura inicial de 75°C y temperatura final de 325°C, con un gradiente de 10°C/min. El sistema se mantuvo a la temperatura final durante 15 minutos.

La temperatura del detector se fijó a 335°C y la del inyector a 300°C.

El volumen y la forma de inyección se establecieron de acuerdo con la concentración de cada muestra.

Las identificaciones se realizaron por comparación del espectro de masas del compuesto problema con los de la librería de espectros NBS54K, incluida en el equipo, y/o con los encontrados en la bibliografía.

Para diferenciar los picos de los azúcares de los correspondientes a otros compuestos con H activos, fundamentalmente polifenoles, se hizo un registro selectivo de los iones m/z 204 y 217.

5. Caracterización de las proantocianidinas.

5.1 Hidrólisis en *n*-BuOH-HCl.

Una técnica habitual en la investigación de la composición de polímeros de proantocianidinas es el estudio de los productos de su degradación oxidativa. Así, la proporción relativa de antocianidinas y su estereoquímica han sido parámetros frecuentemente considerados por los investigadores en el estudio y caracterización de las proantocianidinas (Jones *et al.*, 1976; Foo *et al.*, 1982; Koupai-Abyazani *et al.*, 1993).

La degradación oxidativa de las proantocianidinas, que las transforma en antocianidinas, se ha realizado tradicionalmente por calentamiento del polímero en *n*-BuOH-HCl (95:5, v/v). Este método fue descrito originalmente por Swain y Hillis (1959) y, posteriormente, Bate-Smith (1973a,b) contribuyó a su difusión. La reacción que tiene lugar se esquematiza en figura II.16 de la introducción.

Sin embargo, este procedimiento tiene importantes inconvenientes. Algunos investigadores han puesto de manifiesto la dificultad para reproducir los rendimientos en antocianidinas, y también la dificultad para relacionar el rendimiento en antocianidinas con la concentración inicial de proantocianidinas. Así, se han sugerido algunas modificaciones del método, siendo quizás la más aceptada la de Porter *et al.* (1986). Estos autores realizan un estudio sobre el mecanismo de la reacción conservando el mismo medio que Swain y Hillis (1959), pero introduciendo ligeras modificaciones que han permitido incrementar tanto la reproducibilidad como el rendimiento de la reacción.

La hidrólisis de proantocianidinas a antocianidinas se produce mediante una autooxidación seguida de la ruptura de los enlaces interflavánicos, catalizada por el ácido (fig. II.16.). El rendimiento en antocianidinas viene considerablemente afectado por la presencia de trazas de iones de metales de transición y, además, depende de la concentración de agua en la mezcla de reacción. Es conveniente pues, la adición de sales de hierro en dicho medio de reacción.

Nosotros hemos utilizado este tipo de reacción para determinar los niveles relativos de antocianidinas, producto de la oxidación de unidades flavan-3-ol constituyentes de las cadenas poliméricas de las proantocianidinas.

El método empleado ha sido, básicamente el método de Swain y Hillis (1959), con las modificaciones recomendadas por Porter y colaboradores (1986).

A 20 mg de extracto acuoso liofilizado se le añadió 1 ml de *n*-BuOH-HCl concentrado (95:5, v/v) y 40 μ l de una solución de reactivo férrico ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en HCl 2M, de concentración 2% en p/v). La reacción se llevó a cabo en tubos cerrados a 95°C, durante 1 h.

Una vez dada por finalizada la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad total,

en vacío. El residuo se redisolvió en 1 ml de MeOH acidificado con HCl (0,1%), procediéndose posteriormente a su filtración a través de un filtro de 0,45 μm para su análisis por CLAR.

5.2 Análisis por CLAR de los productos de degradación. Antocianidinas.

Las antocianidinas se analizaron por CLAR en fase inversa, utilizando el instrumental descrito en el apartado 3.1.2. En este caso, el canal principal de adquisición de datos se programó a una longitud de onda de 535 ± 10 nm, específica para antocianidinas. Las condiciones de separación cromatográfica aplicadas fueron, así mismo, las descritas en el apartado 3.1.2., utilizando el gradiente de elución 2.

La identificación de las antocianidinas se realizó directamente por CLAR, mediante comparación de los espectros UV y los tiempos de retención de los picos cromatográficos de las muestras hidrolizadas, con los de los patrones existentes en la librería, según se especifica en el apartado 3.1.3.

Las antocianidinas han sido valoradas mediante rectas de calibrado realizadas con patrones. Se prepararon soluciones, en metanol acidificado (0,1% HCl), de cianidina y de delphinidina, en un rango de concentración de 2 a 40 $\mu\text{g/ml}$, analizándose por CLAR, bajo las mismas condiciones que las muestras. Los valores de las áreas de los picos cromatográficos, obtenidos para cada una de las concentraciones, se ajustaron a una recta de regresión, mediante el método de mínimos cuadrados. Las ecuaciones obtenidas fueron: $y = 2,56 \cdot 10^{-4} + 1,6 \cdot 10^{-5}x$, e $y = 1,96 \cdot 10^{-4} + 1,8 \cdot 10^{-5}x$, respectivamente para cianidina y delphinidina; donde y es la concentración expresada en mg/ml y x, el área del pico cromatográfico, expresada en unidades de integrador. Se calculó después la proporción relativa de las antocianidinas identificadas.

6. Reconocimiento de glicósidos fenólicos.

La identificación de los glicósidos flavonoídicos de las hojas se llevó a cabo mediante el análisis de los aglicones y azúcares constituyentes. Para ello, a partir del extracto en acetato de etilo, obtenido como se detalló en la figura IV.3, se aisló por cromatografía en capa fina preparativa la fracción flavonólica de los extractos de hojas, la cual se sometió a hidrólisis ácida.

6.1 Aislamiento de los flavonoles por cromatografía en capa fina.

El aislamiento de la fracción o fracciones de flavonoles se acometió por cromatografía preparativa en capa fina, utilizándose placas de celulosa Sigmacell microcristalina tipo 20 (Merck), de 20 μm de tamaño de partícula, preparadas según se detalla a continuación. Se mezclaron 15 g de dicha celulosa con 60 ml de agua destilada y 0,2 g de indicador de Fluorescencia F_{254} para CCF (Merck), y la mezcla se extendió sobre placas de 20x20 cm, con un espesor de capa de 0,25 mm, siendo desecadas posteriormente en estufa a 110°C. Las cubetas utilizadas fueron Camag tipo estándar. El desarrollo de la cromatografía fue monodimensional, utilizándose como eluyente AcOH 30% y llevándose a cabo el revelado, solamente en una sección de la placa, con reactivo A de Neu (solución de éster β -aminoetílico del ácido difenilbórico en MeOH 0,6%). Las fracciones que expuestas a la luz UV (254 nm) dieron un color amarillo propio de los flavonoles fueron extraídas de la celulosa con MeOH.

6.2 Hidrólisis de los glicósidos flavonólicos.

Con el objeto de evitar la degradación de los aglicones producidos por la hidrólisis de los glicósidos flavonólicos se aplicó, en este caso, una hidrólisis ácida suave en vacío,

y utilizando ácido trifluoroacético (TFA), ya que éste presenta, frente a otros ácidos, la ventaja de una elevada volatilidad, lo cual facilita considerablemente su posterior eliminación del extracto, requisito indispensable para el análisis de los azúcares. El procedimiento de hidrólisis seguido fue el siguiente:

Muestras de 1-2 ml de las fracciones flavonoídicas se llevaron a sequedad y se les añadió 0,5 ml de TFA 2N. La mezcla, después de congelada, se cerró al vacío en un liofilizador y posteriormente se sometió a calentamiento a 100°C durante 30 min. Una vez dada por finalizada la hidrólisis, y después de su enfriamiento a temperatura ambiente, se añadió a las muestras 1ml de MeOH, se filtraron, y por último se dividieron en dos partes, con objeto de destinar una al análisis de aglicones mediante CLAR (apartado 3.1.2) y la otra al análisis de azúcares por CG-EM (apartado 4.3).

7. Análisis numérico.

7.1 Análisis descriptivo.

El análisis descriptivo incluye los parámetros estadísticos de cada variable en particular, los de centralidad (media aritmética) y los de dispersión (coeficiente de variación y desviación estándar).

7.2 Análisis univariante.

Se trata de un análisis de comparación de medias a través de un modelo de variable simple, por el que se pretende conocer si existen diferencias significativas para cada una de las variables dependientes de la especie y de la procedencia.

Se ha empleado en el análisis de la varianza la técnica de modelo factorial de dos

factores (especie y procedencia):

$$y = m + E_i + P_j + EP_{ij} + E_{k(ij)}$$

donde:

m = media del índice considerado,

E_i = efecto de la especie,

P_j = efecto de la procedencia (lugar de plantación),

EP_{ij} = interacción entre especie y procedencia y

$E_{k(ij)}$ = error experimental o efecto debido al individuo K dentro de la especie i y de la procedencia j .

7.3 Análisis multivariante.

La técnica de análisis multivariante aplicada fue un análisis discriminante canónico, en el que se consideraron todas o algunas de las variables dependientes, según los casos.

El análisis discriminante canónico consiste en el cálculo de las denominadas funciones discriminantes, las cuales tienen numerosas aplicaciones en el campo de la clasificación de individuos de determinadas poblaciones. En general, la clasificación se resuelve por medio de determinadas funciones matemáticas de m variables, seleccionadas entre las n variables analizadas (funciones discriminantes).

Los programas estadísticos utilizados nos han permitido obtener la representación canónica de las muestras analizadas, lo cual consiste en proyectar los puntos del espacio euclideo R^n y representarlos geoméricamente en dos dimensiones. Esta representación goza de notables propiedades: las variables canónicas están correlacionadas entre sí, son ortogonales y las distancias geométricas entre los puntos son idénticas a las distancias estadísticas; por lo que se facilita extraordinariamente la representación geométrica de los estadísticos.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

V. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Estudios preliminares.

1.1 Ajuste de las condiciones de extracción.

En el análisis de taninos objeto de este trabajo nos hemos planteado en primer lugar la optimización de las condiciones de su extracción.

Dada la susceptibilidad tanto de los taninos hidrolizables como de los condensados a reacciones de hidrólisis, isomerización y polimerización, hemos centrado este estudio preliminar sobre los efectos que las condiciones de extracción pudieran tener en estas reacciones, favoreciéndolas en mayor o menor medida.

Así, en particular, se ha estudiado la influencia del tipo de disolvente y su contenido en agua, así como del tiempo de maceración, en el rendimiento total de la extracción y en el contenido de fenoles totales, utilizando el método de extracción descrito en el apartado IV.1.2 y tanto con madera como con corteza de *Eucalyptus globulus* (apartado III.1).

Partiendo de la base de que la luz y la alta temperatura tienen un efecto considerablemente negativo en la estabilidad de los taninos (Cork y Krockenberger, 1991), hemos realizado todos los ensayos a temperatura ambiente y preservando los extractos de la luz directa.

En la tabla V.1-1 se muestran los rendimientos en peso seco del extracto bruto, así como el contenido en fenoles totales, obtenidos a partir de madera o corteza, utilizando los dos disolventes más comúnmente citados en la literatura, metanol al 80% y acetona al 70% y, también metanol al 40%, con el objeto de determinar si una mayor proporción

de agua favorecía la extracción de los taninos.

De los resultados obtenidos se puede deducir que un rendimiento extractivo mayor, no siempre supone un mayor contenido en polifenoles. Así, a partir de madera, el superior rendimiento global obtenido en el caso de la extracción con MeOH 40% en comparación con MeOH 80% (más del doble), no se corresponde con un mayor contenido en fenoles totales, lo que sugiere que la extracción de compuestos más solubles en H₂O, como azúcares, y que no forman parte de la fracción polifenólica de la madera, se ve más favorecida. Sin embargo, en corteza no ocurrió lo mismo, posiblemente porque los compuestos favorecidos en la extracción con MeOH 40% son taninos, los cuales están incluidos en la fracción de fenoles totales.

Es preciso considerar que el aumento del contenido de agua de los disolventes puede favorecer la extracción de taninos pero también a la vez producir su degradación hidrolítica (Lindroth y Pajutee, 1987), pudiendo no resultar incrementado el contenido en fenoles totales del extracto, todo lo que cabría esperar.

La utilización de acetona al 70% frente a metanol al 80% supuso el incremento tanto del rendimiento extractivo como de su contenido en fenoles totales, en ambos casos de madera y corteza, siendo particularmente en ésta última el incremento de los fenoles totales más acusado (tabla V.1-1). Por el contrario, los niveles de proantocianidinas, en este caso de extracción con acetona 70%, resultaron inferiores (tabla V.1-2).

La idoneidad de las mezclas acetona-agua o metanol-agua como disolventes en la extracción de taninos varía probablemente con la especie y el tejido vegetal de que se trate (Hagerman, 1987), pero, a pesar de todo se han formulado algunas generalizaciones. La capacidad extractiva del metanol parece disminuir a medida que aumenta el tamaño de los polímeros tánicos a extraer (Goldstein y Swain, 1963; Foo y Porter, 1980), mientras que tal efecto aparentemente no se da con la acetona (Jones *et al.*, 1976; Foo y Porter,

1980). Parece ser que la acetona rompe o impide las asociaciones tanino-proteína, mientras que el metanol no lo hace (Foo y Porter, 1980; Hagerman y Robbins, 1987).

TABLA V.1-1
Efecto del disolvente de extracción en el rendimiento total de extracción y en el contenido de fenoles totales.

		Rend. % total ¹	Fenoles totales ²
MADERA	MeOH 80%	2,25	6,9 (1,1)
	MeOH 40%	4,93	6,2 (0,1)
	Me ₂ CO 70%	3,23	8,8 (0,8)
CORTEZA	MeOH 80%	9,65	27,9 (0,9)
	MeOH 40%	10,79	29,9 (0,3)
	Me ₂ CO 70%	11,82	41,3 (0,5)

1) g de residuo seco por 100 g de materia seca.

2) Expresados en mg de ácido gálico por g de materia seca.

Los valores son media de dos repeticiones y las cifras entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

TABLA V.1-2
Efecto del disolvente y del tiempo de extracción en el contenido de fenoles totales y proantocianidinas.

		24 Horas		72 Horas	
		Fenoles totales ¹	Proant. ²	Fenoles totales ¹	Proant. ²
MADERA	MeOH 80%	6,1 (0,7)	1,4 (0,2)	4,1 (0,6)	2,4 (0,2)
	Me ₂ CO 70%	7,2 (0,2)	0,8 (0,02)	7,0 (0,3)	0,2 (0,02)
CORTEZA	MeOH 80%	25,9 (0,9)	8,9 (0,4)	24,9 (0,4)	9,6 (0,3)
	Me ₂ CO 70%	34,6 (1,3)	6,6 (0,3)	32,4 (0,9)	6,6 (0,3)

1) Expresado en mg de ácido gálico por g de materia seca.

2) mg/g, calculados en catequina, referidos a materia seca

Los valores son media de dos repeticiones y las cifras entre paréntesis representan las desviaciones estándar.

Hagerman (1988) y Cork y Krockenberger (1991) obtuvieron rendimientos algo superiores en fenoles totales y proantocianidinas, cuando utilizaban acetona acuosa frente a metanol acuoso para la extracción de taninos de hojas de *Eucalyptus spp.* y otras especies vegetales. Sin embargo, otros autores han referido rendimientos iguales o

mayores en la extracción de taninos de madera, corteza y hojas de varias especies cuando utilizan metanol acuoso (Julkunen-Tiito, 1985; Scalbert *et al.*, 1989).

En lo que a nuestros datos se refiere, el aumento del rendimiento en fenoles totales, obtenido al utilizar como disolvente acetona-agua frente a metanol-agua (tabla V.1-2), estaría de acuerdo con la sugerida superior capacidad extractiva de la acetona-agua para los polifenoles poliméricos.

Por otra parte, la reducción antes señalada en el rendimiento en proantocianidinas, cuando utilizamos como disolvente de extracción acetona-agua (tabla V.1-2) podría deberse a varias razones. En primer lugar, los datos de niveles de proantocianidinas, obtenidos mediante el método de la vainillina-ácido, utilizado por nosotros, y el método del BuOH-HCl, utilizado por Hagerman (1988) y Cork y Krockenberger (1991), no son siempre comparables. Ello es debido a las posibles diferencias estructurales de las proantocianidinas según la muestra, ya sea en relación con su grado de polimerización, tipo de unión interflavánica o naturaleza de las unidades monoméricas entre otras causas (Goldstein y Swain, 1963; Butler *et al.*, 1982; Porter *et al.*, 1986).

Mientras que la vainillina reacciona con los flavanoles terminales de las proantocianidinas, con la formación de un cromóforo, sin producirse despolimerización, por lo que este método supone la valoración preferentemente del contenido en polímeros, la valoración de proantocianidinas con BuOH-HCl se basa en la determinación de las antocianidinas producidas por la ruptura oxidativa de los polímeros, y por tanto, en este caso, el rendimiento en dichas antocianidinas sería proporcional a la concentración de flavanoles no terminales del polímero.

Por otra parte, se ha demostrado que los taninos condensados son menos estables en acetona acuosa que en metanol acuoso (Cork y Krockenberger, 1991), y así el contenido menor en proantocianidinas, obtenido de los extractos realizados con acetona-

agua, podría deberse también a la degradación de dichas proantocianidinas. Se ha considerado que un tiempo de maceración de 24 horas es suficientemente largo, como para que puedan tener lugar fenómenos de degradación, con efectos significativos en el contenido en taninos.

En lo que respecta al efecto del tiempo de maceración en la extracción, es de destacar que su prolongación desde 24 a 72 horas no dio como resultado el incremento de los niveles de fenoles totales extraídos, ni en madera ni en corteza, y con ninguno de los dos disolventes estudiados (tabla V.1-2). En cuanto a los niveles de proantocianidinas, tanto en el caso de madera como de corteza, sólo se han visto incrementados en la extracción con metanol-agua, observándose en la extracción con acetona-agua incluso una reducción considerable de estos valores después de 72 horas de maceración frente a los obtenidos al tiempo menor de 24 horas. Estos resultados apoyan también la idea de la mayor labilidad de las proantocianidinas en acetona-agua que en metanol-agua.

A pesar de la importancia de los elagitaninos en el género *Eucalyptus*, no hemos realizado los respectivos análisis cuantitativos de estos compuestos en esta puesta a punto del método de extracción, por no disponer de métodos químicos de valoración sencillos. Sin embargo, sí se han considerado los elagitaninos en los análisis cualitativos complementarios realizados por CLAR.

Así, con el objeto de completar la información sobre las características extractivas de los disolventes bajo estudio, MeOH-H₂O (80% y 40%) y Me₂CO-H₂O (70%), se han analizado por CLAR los distintos tipos de taninos de las fases acuosas liofilizadas de los extractos de madera o corteza, siguiendo la metodología especificada en el apartado IV.1.2 y utilizando el gradiente de elución número 1. De los resultados obtenidos del análisis por CLAR se puede concluir que:

- En lo que a los elagitaninos se refiere, no se han observado diferencias

cualitativas entre los extraídos por los tres disolventes ensayados, tanto a partir de madera como de corteza. Sin embargo, el extracto más rico en elagitaninos ha resultado el obtenido con metanol-agua al 80% para los dos tipos de muestras.

- En cuanto al análisis por CLAR de los otros tipos de taninos es de señalar que se confirma el menor contenido en proantocianidinas de los extractos en acetona. Así, los cromatogramas de los extractos obtenidos de madera y corteza en acetona-agua han presentado menor número de picos con máximo de absorbancia a 280 nm, propio de proantocianidinas.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en este estudio previo, se han seleccionado las siguientes condiciones de extracción para el análisis sistemático de los taninos de eucaliptos objeto de esta Tesis: disolvente MeOH-H₂O al 80%, tiempo de maceración 24 h y temperatura ambiente, según se ha descrito en el apartado 1.2 de metodología.

2. Rendimientos de extracción y niveles de taninos de los extractos.

El estudio sistemático del contenido en polifenoles de la madera, corteza y hojas de las tres especies de *Eucalyptus* consideradas, se ha llevado a cabo mediante la determinación del rendimiento global del extracto en MeOH-H₂O (80:20) y la valoración del contenido en fenoles totales, así como del contenido de los diferentes grupos de taninos del extracto bruto acuoso.

La estimación del contenido polifenólico de los extractos se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu descrito en el apartado IV.2.1. Los resultados se han expresado en mg de ácido gálico por g de material seco extraído. El coeficiente de

extinción molar obtenido para el ácido gálico ha sido de $22,3 \times 10^3$, valor que está en consonancia con los publicados por Singleton y Rossi (1965), de $23,3 \times 10^3$, y por Scarbert *et al.* (1989), de $25,2 \times 10^3$.

En cuanto a los niveles de los taninos condensados, se han determinado por reacción de condensación de las proantocianidinas con vainillina, según hemos descrito en el apartado IV.2.2. Los valores se dan en mg de catequina por g de material vegetal seco. Para la catequina hemos obtenido un coeficiente de extinción molar de $34,3 \times 10^3$.

Tanto las determinaciones de los fenoles totales como las de proantocianidinas, se han realizado por triplicado, ya que los métodos químicos utilizados se basan en reacciones de formación de grupos cromóforos, las cuales dependen considerablemente del tiempo, la temperatura y el disolvente empleados, entre otras muchas variables que determinan velocidades y rendimientos de reacción.

Los elagitaninos han sido valorados también en los extractos acuosos concentrados. Estos extractos se sometieron a hidrólisis, en medio ácido, como se ha descrito en el apartado IV.2.3.1, y el ácido elágico liberado se valoró por CLAR (apartado IV.2.3.2), dándose por tanto los valores en mg de ácido elágico por g de material vegetal.

A continuación se comentan y discuten ampliamente estos resultados en los subapartados correspondientes a madera, corteza y hojas, por este orden.

2.1 Madera.

Los resultados correspondientes a las determinaciones del contenido en los diferentes grupos de taninos, para las muestras de madera de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*, se recogen en la tabla V.2-1. y el correspondiente análisis univariante en la tabla V.2-2.

TABLA V.2-1

Rendimiento en extracto total y contenido en fenoles totales, proantocianidinas y elagitaninos de madera de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*.

Muestra	Extracto en MeOH-H ₂ O (%)	Fenoles totales ^a	Proantocianidinas ^b	Elagitaninos ^c
HEC1	10,03	21,06 (0,11)	9,10 (0,04)	0,34
HEC2	3,51	9,95 (0,22)	2,49 (0,25)	0,40
HEC3	8,07	12,04 (0,22)	3,72 (0,25)	0,52
HEC4	8,48	18,31 (0,29)	6,59 (0,17)	0,38
HEC5	7,14	26,21 (0,44)	10,98 (0,10)	0,35
PEC1	2,40	6,43 (0,40)	4,56 (0,30)	0,36
PEC2	2,84	5,34 (0,37)	4,54 (0,04)	0,22
HEG1	3,61	9,55 (0,47)	2,00 (0,08)	0,65
HEG2	3,43	9,61 (0,07)	2,41 (0,25)	0,55
HEG3	2,71	9,14 (0,71)	2,21 (0,13)	0,36
HEG4	3,83	18,29 (0,18)	5,21 (0,68)	0,26
HEG5	3,84	19,6 (1,14)	4,82 (0,60)	0,37
PEG1	5,65	16,92 (2,11)	0,64 (0,19)	0,98
PEG2	2,79	8,01 (0,34)	0,35 (0,03)	0,16
PEG3	3,92	8,85 (0,65)	0,40 (0,03)	0,16
PEG4	3,76	10,98 (0,64)	0,71 (0,24)	0,27
PEG5	3,17	7,26 (0,22)	1,50 (0,15)	0,28
HER1	3,41	7,79 (0,88)	1,43 (0,42)	0,19
HER2	4,31	12,71 (0,50)	3,57 (0,01)	0,17
HER3	4,98	13,04 (0,57)	4,08 (0,09)	0,13
HER4	4,17	13,89 (0,36)	3,39 (0,68)	0,18
HER5	6,02	9,43 (0,32)	2,37 (0,19)	0,39
PER1	4,47	8,28 (0,29)	1,68 (0,17)	0,28
PER2	5,6	18,76 (0,91)	4,84 (0,36)	0,4
PER3	3,55	9,62 (0,66)	1,73 (0,29)	0,13
PER4	3,15	12,22 (0,84)	2,19 (0,04)	0,07

- H=Huelva. P=Pontevedra. EC=*E. camaldulensis*. EG=*E. globulus*. ER=*E. rudis*.
- % en peso.
- Los datos de a, b y c vienen dados en mg por g de peso seco de madera; siendo expresados respectivamente para a) en base a ácido gálico, para b) en base a catequina y para c) en ácido elágico
- Los valores de a y b son media de tres repeticiones y los valores encerrados entre paréntesis representan las desviaciones estándar correspondientes.

TABLA V.2-2 Análisis univariante de los rendimientos en extracto total y contenido en taninos de los extractos de madera de *Eucalyptus spp.*

PROCEDENCIA	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie	Procedencia	Inter.		
	H			P			H			P			H			P							
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV				Dif.sig/Agrup	Dif.sig/Agrup
Extracto en MeOH-H ₂ O	7,45	2,43	33	2,62	0,31	12	3,49	0,47	13	3,86	1,01	29	4,58	0,98	21	4,19	1,09	26	NO	-GRC-	***	P-H	***
Fenoles totales	17,51	6,63	38	5,89	0,77	3	13,2	5,23	40	10,4	3,90	37	11,3	2,62	23	12,2	4,65	38	NO	-CGR-	**	P-H	*
Proantocianidinas	6,58	3,56	54	4,55	0,01	1	3,33	1,55	47	0,72	0,46	84	2,97	1,06	36	2,61	1,50	58	***	GR-C	**	P-H	NO
Elagitaninos	0,40	0,07	18	0,29	0,09	32	0,44	0,16	36	0,37	0,34	93	0,21	0,10	49	0,22	0,15	68	*	R-C-G	NO	-PH-	NO

x= media.

σ = desviación estándar.

CV= coeficiente de variación.

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza.

Inter.= interacción.

10% ≥ * ≥ 5%, 5% ≥ ** ≥ 1%, 1% ≥ ***.

C= *E. camaldulensis*. G= *E. globulus*. R= *E. rudis*. H= Huelva. P= Pontevedra.

2.1.1 *Eucalyptus camaldulensis*.

En esta especie, los rendimientos globales de extracción y los niveles de fenoles totales han resultado superiores en las muestras procedentes de Huelva (x: 7,45% y 17,51 mg/g respectivamente) que en las de Pontevedra (x: 2,62% y 5,89 mg/g). Se puede deducir además que existe una cierta proporcionalidad entre ambos parámetros, lo que sugiere una importante contribución de los compuestos polifenólicos al rendimiento extractivo.

Por otra parte, los niveles de proantocianidinas han resultado excepcionalmente variables en las maderas procedentes de Huelva (CV=54, tabla V.2-2), obteniéndose valores particularmente elevados en algunas muestras, HEC1 y HEC5 (tabla V.2-1), las cuales también presentaron los correspondientes niveles de fenoles totales muy superiores. Se aprecia cierta correspondencia entre valores de taninos condensados y de fenoles totales. No se puede decir lo mismo para los elagitaninos, ya que las variaciones en las muestras de madera no han resultado proporcionales a las obtenidas para los niveles de fenoles totales. Es preciso considerar que los niveles de elagitaninos han sido estimados en base al ácido elágico liberado mediante la hidrólisis ácida de dichos elagitaninos y así, el rendimiento en ácido elágico puede venir considerablemente afectado por la estructura de los elagitaninos, en particular por el contenido de ácido elágico por molécula de elagitanino.

2.1.2 *Eucalyptus globulus*.

En este caso de *E. globulus* los rendimientos globales de extracción han resultado muy semejantes, con independencia de si las muestras de madera eran procedentes de Huelva (media, 3,49%) o de Pontevedra (media, 3,86%) (tabla V.2-1 y V.2-2), con la excepción de la muestra PEG1 de Pontevedra que dio el máximo rendimiento (5,65%).

En lo que concierne a los niveles de fenoles totales, en esta especie es de destacar su notable variabilidad en las maderas procedentes de las dos localizaciones y la falta total de relación con los valores correspondientes del rendimiento global extractivo.

Por otra parte, los niveles de proantocianidinas han sido considerablemente superiores en las maderas de Huelva (x: 3,33 mg/g), caracterizándose por el contrario las muestras de Pontevedra por su bajísimo contenido en proantocianidinas (x: 0,72 mg/g) y así, los altos niveles en fenoles totales, obtenidos en las maderas de Pontevedra, parecen deberse a la extracción de polifenoles de naturaleza no tánica. Las maderas de *E. globulus* procedentes de Pontevedra han presentado, también, niveles de elagitaninos, en general, inferiores a las de Huelva (x: Pontevedra 0,37 mg/g, Huelva 0,44 mg/g), con la excepción de la muestra PEG1.

En la literatura existe un trabajo publicado por Scalbert *et al.* (1989), en el que se determinan los niveles de polifenoles de madera de cinco especies de gymnospermas y doce de angiospermas, incluyendo entre éstas *Eucalyptus globulus*. La madera de esta especie, según el contenido en fenoles totales (24,0 mg/g en ácido gálico) ocupa el cuarto lugar, el sexto según el nivel de proantocianidinas (0,24 mg/g en catequina) y el tercero en cuanto al contenido en elagitaninos (21,3 mg/g en 4,6-hexahidroxidifenoil-glucosa). A pesar de que los valores de fenoles totales y proantocianidinas dados por Scalbert *et al.* (1989), se basan sólo en el estudio de una muestra de madera, es preciso señalar que están de acuerdo con los obtenidos por nosotros. En particular, los datos sobre fenoles totales dados por estos autores se acercan más a nuestras estimaciones en maderas procedentes de Huelva (9,55-19,60 mg/g en ácido gálico), mientras que el contenido en proantocianidinas está más acorde con los correspondientes a los datos de maderas procedentes de Pontevedra (0,35-1,50 mg/g en catequina). Además, es preciso considerar que tanto los resultados correspondientes a los fenoles como a las proantocianidinas son susceptibles de ser comparados, puesto que en ambos trabajos, se ha utilizado la misma metodología y el mismo compuesto de referencia. No ocurre lo mismo, en el caso de la

valoración de los elagitaninos, por lo que los resultados de Scalbert *et al.* y los nuestros no pueden ser en absoluto comparables.

Otros autores han considerado también la madera de *E. globulus* como una de las ricas en elagitaninos (Yazaki y Hillis, 1976), aunque se limitan a realizar sólo el aislamiento e identificación de algunos de ellos, sin haber llegado a la valoración de sus niveles.

2.1.3 *Eucalyptus rudis*

En las muestras de madera de *E. rudis* no se han observado importantes diferencias dependientes del origen ni en el rendimiento de la extracción, ni en el nivel de fenoles totales ni en el de proantocianidinas. Pero las muestras procedentes de Pontevedra se han caracterizado por una gran variabilidad en los contenidos de elagitaninos, habiéndose obtenido valores desde 0,07 mg/g a 0,40 mg/g, correspondientes a las muestras PER4 y PER2 respectivamente, y un CV para la población de 68 (tablas V.2-1 y V.2-2).

2.1.4 Análisis numérico.

Análisis univariante

La tabla V.2-2 recoge los resultados de los análisis univariantes relativos a los rendimientos de extracción, y a los niveles de fenoles totales, proantocianidinas y elagitaninos de los extractos de madera de las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas. Se incluyen medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación, así como las diferencias significativas y los agrupamientos por especies y por procedencias, respecto de cada una de las variables. Se da así mismo la interacción entre especie y procedencia.

De la comparación de los resultados obtenidos en los análisis univariantes, se puede

deducir la existencia de diferencias significativas entre las tres especies de *Eucalyptus*, en cuanto al contenido en elagitaninos del extracto de madera. Los rendimientos globales y los niveles de fenoles totales no han resultado significativamente diferentes en las maderas de las tres especies y los contenidos en proantocianidinas han sido significativamente superiores en las de *E. camaldulensis*, respecto de las de *E. globulus* y *E. rudis*.

En cuanto al análisis realizado considerando la procedencia, es de destacar su influencia en el rendimiento global de extracción, en el contenido de fenoles totales y en el de proantocianidinas. En los niveles de elagitaninos, por el contrario, no se han obtenido diferencias significativas en relación con el origen.

Por otra parte, se ha obtenido una considerable interacción entre especie y origen para la variable rendimiento extractivo, lo que significa que el origen va a influir en menor o mayor grado sobre el rendimiento extractivo, según la especie considerada.

Análisis multivariante

Con el objetivo de determinar si el conjunto de las variables estudiadas en los extractos de madera de *Eucalyptus*, rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos, hacían posible la diferenciación de las muestras según la especie a la que pertenecen o según la procedencia, se realizó un análisis discriminante canónico, considerando dichas variables.

En la figura V.2-1 se muestra la representación canónica de las muestras de madera estudiadas, en el plano definido por las dos funciones canónicas de mayor poder de discriminación, las cuales explican el 92,9% de la varianza total y presentan coeficientes de correlación con las variables consideradas de 0,9122 y 0,8022 (tabla V.2-3). Como podemos observar, se produce un considerable solapamiento entre las especies *E. globulus*

TABLA V.2-3 Análisis discriminante canónico para las variables rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos de los extractos de madera de *Eucalyptus spp.*

ANÁLISIS DISCRIMINANTE			
Función discriminante (FD)	Autovalor	Porcentaje relativo	Correlación Canónica
1	4,9562044	68,11	0,91220
2	1,8055133	24,81	0,80222
3	0,4274231	5,87	0,54721
4	0,0880009	1,21	0,28440

COEFICIENTES ESTANDARIZADOS DE LAS FUNCIONES DISCRIMINANTES				
Variable	FD1	FD2	FD3	FD4
Rend. extractivo	-0,50014	-1,17032	-0,32953	-0,46719
Fenoles totales	-2,13831	0,02875	0,78282	0,79006
Proantocianidinas	2,62716	0,11332	-0,04333	0,14649
Elagitaninos	0,92267	0,48586	0,79462	-0,52870

La representación canónica correspondiente se muestra en la figura V.2-1.

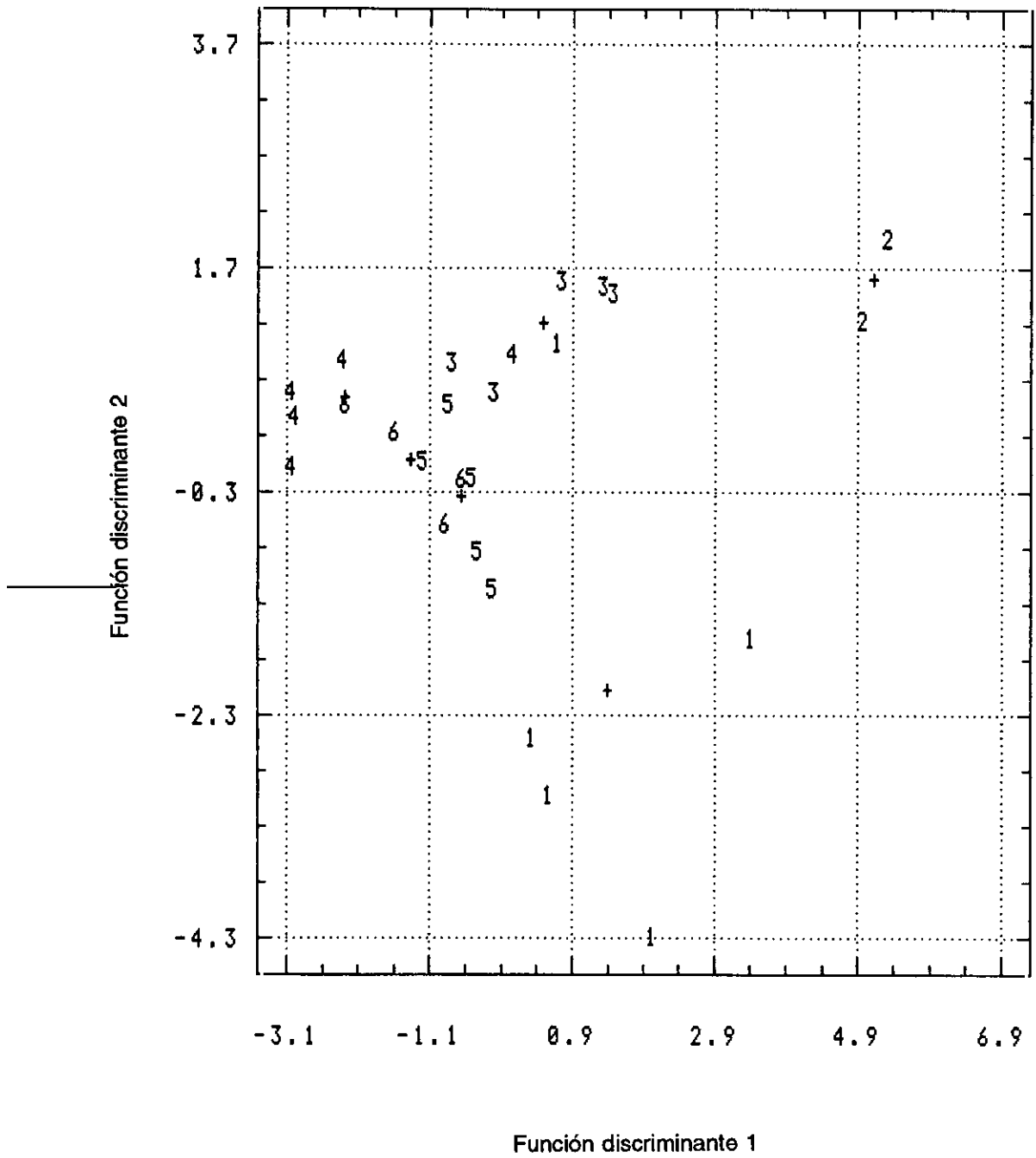


FIGURA V.2-1 Análisis discriminante canónico, para las variables: rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos, de los extractos de madera de *Eucalyptus spp.* 1=HEC, 2=PEC, 3=HEG, 4=PEG, 5=HER, 6=PER.

y *E. rudis*, en las cuales, por otra parte, no se han podido discriminar las dos poblaciones procedentes de Huelva y de Pontevedra. La especie *E. camaldulensis* es la que se ha presentado más distante respecto de las otras dos y en ella se han podido diferenciar a su vez dos grupos de individuos, relacionados con la procedencia.

V.1.5 Conclusiones.

- 1- La madera de las especies de *Eucalyptus*: *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* de dos localizaciones diferentes de la Península, Huelva y Pontevedra, presenta una gran variabilidad en cuanto al contenido de taninos, como se deduce de la elevada dispersión en los valores de las cuatro variables analizadas: rendimiento extractivo, niveles de fenoles totales, de proantocianidinas y de elagitaninos.
- 2- De las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas, la madera de *E. camaldulensis* es la que ha presentado contenidos en proantocianidinas mayores, mientras que la de *E. globulus* ha resultado ser la más rica en elagitaninos, seguida de *E. camaldulensis* y de *E. rudis*. Sin embargo, en lo que respecta al rendimiento global de extracción y contenido en fenoles totales, las maderas de las tres especies han resultado similares.
- 3- En general, se ha observado en las maderas *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* una cierta relación de proporcionalidad entre el rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales y contenido en proantocianidinas.
- 4- Considerando por un lado el conjunto de las maderas procedentes de Huelva y por otro el de las de Pontevedra, las primeras han presentado, en general, contenidos de fenoles totales y proantocianidinas superiores, así como valores superiores en el rendimiento global de extracción.

- 5- El rendimiento extractivo, el contenido en fenoles totales y el contenido en proantocianidinas han resultado influidas principalmente por la procedencia de las maderas, mientras que el contenido en elagitaninos ha resultado más relacionado con la especie a la que pertenecían las maderas en estudio.

- 6- De los resultados obtenidos en los análisis estadísticos univariante y discriminante canónico, se puede concluir que las variables consideradas, rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos en los extractos de madera, no sirven como factores discriminantes ni entre especies ni entre procedencias.

2.2 Corteza.

Los resultados correspondientes a las estimaciones de los rendimientos de extracción y de los niveles de fenoles totales, proantocianidinas y elagitaninos, en extractos de corteza de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*, se encuentran en la tabla V.2-4 y el correspondiente análisis univariante, en la tabla V.2-5.

2.2.1 *Eucalyptus camaldulensis*

Las cortezas de *E. camaldulensis* procedentes de Huelva han resultado ser más ricas en extraíbles (media, 17,88 mg/g) y en fenoles totales (media, 93,30 mg/g), que las de Pontevedra (media, 2,88 mg/g y 2,58 mg/g), al igual que había ocurrido en madera. Los niveles de proantocianidinas y elagitaninos también han sido considerablemente superiores en los extractos de corteza procedentes de Huelva (media, 39,21 mg/g y 0,87 mg/g) frente a los de Pontevedra (media, 0,49 mg/g y 0,10 mg/g). Es de destacar además, la notable variabilidad en los rendimientos de extracción y en los niveles de polifenoles y de taninos en las muestras de Huelva (CV=71-86, tabla V.2-5).

TABLA V.2-4

Rendimiento en extracto total y contenido en fenoles totales, proantocianidinas y elagitaninos de corteza de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*.

Muestra	Extracto en MeOH-H ₂ O (%)	Fenoles totales ^a	Proantocianidinas ^b	Elagitaninos ^c
HEC1	18,22	85,97 (0,23)	38,94 (1,19)	0,76
HEC2	8,73	50,51 (3,56)	17,03 (0,30)	0,23
HEC3	36,16	195,21 (10,07)	86,42 (3,42)	1,31
HEC4	3,69	17,62 (0,45)	4,70 (0,13)	0,14
HEC5	22,61	117,18 (3,95)	48,95 (0,20)	1,93
PEC1	2,77	2,20 (0,02)	0,40 (0,01)	0,11
PEC2	2,87	2,97 (0,07)	0,58 (0,03)	0,09
HEG1	12,27	33,97 (0,30)	12,13 (0,20)	0,56
HEG2	7,78	33,16 (0,15)	11,63 (1,06)	0,49
HEG3	4,47	11,50 (1,43)	3,09 (0,16)	0,07
HEG4	8,23	19,56 (0,26)	6,15 (0,29)	0,60
HEG5	6,08	15,96 (0,10)	4,18 (0,33)	0,98
PEG1	9,91	36,82 (0,50)	9,64 (0,16)	2,55
PEG2	2,80	8,61 (0,09)	1,40 (0,05)	0,94
PEG3	4,13	9,67 (0,01)	2,38 (0,11)	0,86
PEG4	3,89	9,29 (0,12)	1,97 (0,09)	0,76
PEG5	2,80	6,58 (0,12)	1,00 (0,09)	0,40
HER1	3,18	2,83 (0,05)	0,43 (0,03)	0,07
HER2	2,03	4,93 (0,19)	0,65 (0,05)	0,03
HER3	1,33	1,99 (0,19)	0,23 (0,02)	0,04
HER4	2,40	4,53 (0,10)	0,56 (0,03)	0,07
HER5	2,27	3,15 (0,02)	0,46 (0,01)	0,09
PER1	6,77	7,81 (0,06)	2,34 (0,09)	0,03
PER2	6,36	7,64 (0,04)	3,25 (0,02)	0,02
PER3	3,53	1,53 (0,08)	0,53 (0,02)	0,03
PER4	4,72	8,52 (0,36)	2,23 (0,08)	0,03

- H=Huelva. P=Pontevedra. EC=*E. camaldulensis*. EG=*E. globulus*. ER=*E. rudis*.
- % en peso.
- Los datos de a, b y c vienen dados en mg por g de peso seco de corteza; siendo expresados respectivamente para a) en base a ácido gálico, para b) en base a catequina y para c) en ácido elágico
- Los valores de a y b son media de tres repeticiones y los valores encerrados entre paréntesis representan las desviaciones estándar correspondientes.

TABLA V.2-5 Análisis univariante de los rendimientos en extracto total y contenido en taninos de los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.*

PROCEDENCIA	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>										
	H			P			H			P			H			P			Especie	Procedencia	Inter.		
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	Dif.sig/Agrup.	Dif.sig/Agrup.			
Extracto en MeOH-H ₂ O	17,88	12,66	71	2,82	0,07	2	7,77	2,93	38	4,70	2,97	63	2,24	0,67	30	5,34	1,50	28	NO	-RGC-	NO	-PH-	**
Fenoles totales	93,30	68,13	73	2,58	0,55	21	22,83	10,21	45	14,19	12,70	90	3,49	1,22	35	6,37	3,26	51	*	R-G-C	**	P-H	**
Proantocianidinas	39,21	31,65	81	0,49	0,13	28	7,43	4,21	57	3,28	3,59	110	0,47	0,16	34	2,09	1,13	54	*	R-G-C	**	P-H	**
Elagitaninos	0,87	0,75	78	0,10	0,01	14	0,54	0,33	60	1,10	0,84	76	0,06	0,02	40	0,03	0,01	18	**	R-C-G	NO	-PH-	*

x= media.

σ = desviación estándar.

CV= coeficiente de variación.

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza.

Inter.= interacción.

10% ≥ * ≥ 5%, 5% ≥ ** ≥ 1%, 1% ≥ ***.

C= *E. camaldulensis*. G= *E. globulus*. R= *E. rudis*. H= Huelva. P= Pontevedra.

Sin embargo, se ha observado una cierta proporcionalidad entre las cuatro variables estudiadas, lo que sugiere que la contribución al contenido de fenoles totales y rendimiento extractivo de los polifenoles poliméricos del tipo tanino es máxima.

2.2.2 *Eucalyptus globulus*

Las cortezas de árboles de *E. globulus*, procedentes de Huelva, también, han presentado, como en el caso de *E. camaldulensis*, extractos con valores superiores en rendimiento de extracción, en fenoles totales y en proantocianidinas, frente a las muestras procedentes de Pontevedra con la excepción de la muestra PEG1 que ha sido con diferencia la más rica en fenoles totales, proantocianidinas y elagitaninos.

Los niveles de elagitaninos por el contrario son, en general, inferiores en las muestras de corteza procedentes de Huelva, siendo de destacar el valor especialmente bajo obtenido para la muestra HEG3 (0,07 mg/g frente a la media de la población de Huelva de 0,54 mg/g) y por otro lado, el valor especialmente alto obtenido para la muestra PEG1 (2,55 mg/g frente a la media de la población de Pontevedra de 1,10 mg/g).

2.2.3 *Eucalyptus rudis*

Los extractos de corteza de *E. rudis* se caracterizan por el bajo contenido, tanto en extraíbles totales como en fenoles totales y en proantocianidinas, de las muestras procedentes de Huelva, resultado que está en contraposición con los de las otras dos especies estudiadas, en las que las muestras de Huelva resultaron más ricas en polifenoles en general (tabla V.2-4 y V.2-5).

Además, son de considerar los bajísimos niveles de elagitaninos obtenidos en las cortezas de esta especie, con independencia del origen de las muestras (0,02-0,09 mg/g).

Por otro lado, se ha observado una importante diferenciación morfológica en las cortezas, así como en las maderas, de los árboles de distinta procedencia, haciéndose evidente una deficiente adaptación de esta especie a las condiciones climáticas de Galicia.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, las variaciones en los contenidos en polifenoles según el origen de las muestras, en general, podrían estar relacionadas con los mecanismos de adaptación a las condiciones medioambientales, especialmente a las condiciones de estrés ambiental.

2.2.4 Análisis numérico.

Análisis univariante

Los resultados de los análisis univariantes relativos a los rendimientos de extracción y a los niveles de taninos en los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.* se muestran en la tabla V.2-5.

En el caso del análisis univariante según las especies, se han obtenido agrupamientos semejantes en cuanto a los niveles de fenoles totales y de proantocianidinas, siendo significativamente superiores en las cortezas de la especie *E. camaldulensis*, respecto de *E. globulus* y *E. rudis*. No ocurre lo mismo para los niveles de elagitaninos, los cuales han sido significativamente superiores en la especie *E. globulus*.

Por otra parte, considerando el análisis según el origen se puede decir que las cortezas procedentes de Huelva, contempladas en su conjunto, han resultado significativamente más ricas en fenoles totales y proantocianidinas que las de Pontevedra; no encontrándose diferencias significativas en los niveles de elagitaninos, así como tampoco en el rendimiento extractivo, entre las muestras de las dos procedencias.

En lo que respecta a la interacción entre especie y procedencia, ésta ha resultado positiva para las cuatro variables consideradas en este estudio.

Análisis multivariante

Los resultados obtenidos para el análisis discriminante canónico, realizado considerando las variables rendimiento extractivo, niveles de fenoles totales, de proantocianidinas y de elagitaninos, de los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.*, se presentan en la tabla V.2-6 y en la figura V.2-2.

Se puede observar un solapamiento entre las diferentes especies de *Eucalyptus* más acusado aún que el obtenido para las muestras de madera. Sin embargo, dentro de cada una de las especies, los individuos se han agrupado según la procedencia.

2.2.5 Conclusiones.

- 1- Entre las tres especies de *Eucalyptus* en estudio, las cortezas de *E. camaldulensis* y de *E. globulus*, en comparación con la madera, se han caracterizado por sus altos contenidos en fenoles totales, proantocianidinas y elagitaninos, así como por sus altos rendimientos globales de extracción. Por el contrario, la corteza de *E. rudis*, ha presentado niveles de taninos, en general, inferiores a los correspondientes de madera.
- 2- La corteza de *E. camaldulensis* ha presentado los valores más altos de rendimiento extractivo, de contenido en fenoles totales y proantocianidinas, mientras que la de *E. globulus* ha resultado la más rica en elagitaninos.
3. Las cortezas de *E. camaldulensis* procedentes de Huelva han resultado ser, con diferencia, más ricas en extracto global, fenoles totales y proantocianidinas que

TABLA V.2-6 Análisis discriminante canónico para las variables rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos de los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.*

ANÁLISIS DISCRIMINANTE			
Función discriminante (FD)	Autovalor	Porcentaje relativo	Correlación Canónica
1	2,8354130	53,81	0,85981
2	1,6748781	31,78	0,79130
3	0,7058011	13,39	0,64325
4	0,0533891	1,01	0,22513

COEFICIENTES ESTANDARIZADOS DE LAS FUNCIONES DISCRIMINANTES				
Variable	FD1	FD2	FD3	FD4
Rend. extractivo	3,19680	-4,32550	-2,51349	0,84330
Fenoles totales	-7,72986	-3,79020	-3,96919	-8,93007
Proantocianidinas	3,80991	6,90116	6,49568	8,38557
Elagitaninos	0,20572	1,52387	0,35108	0,70578

La representación canónica correspondiente se muestra en la figura V.2-2.

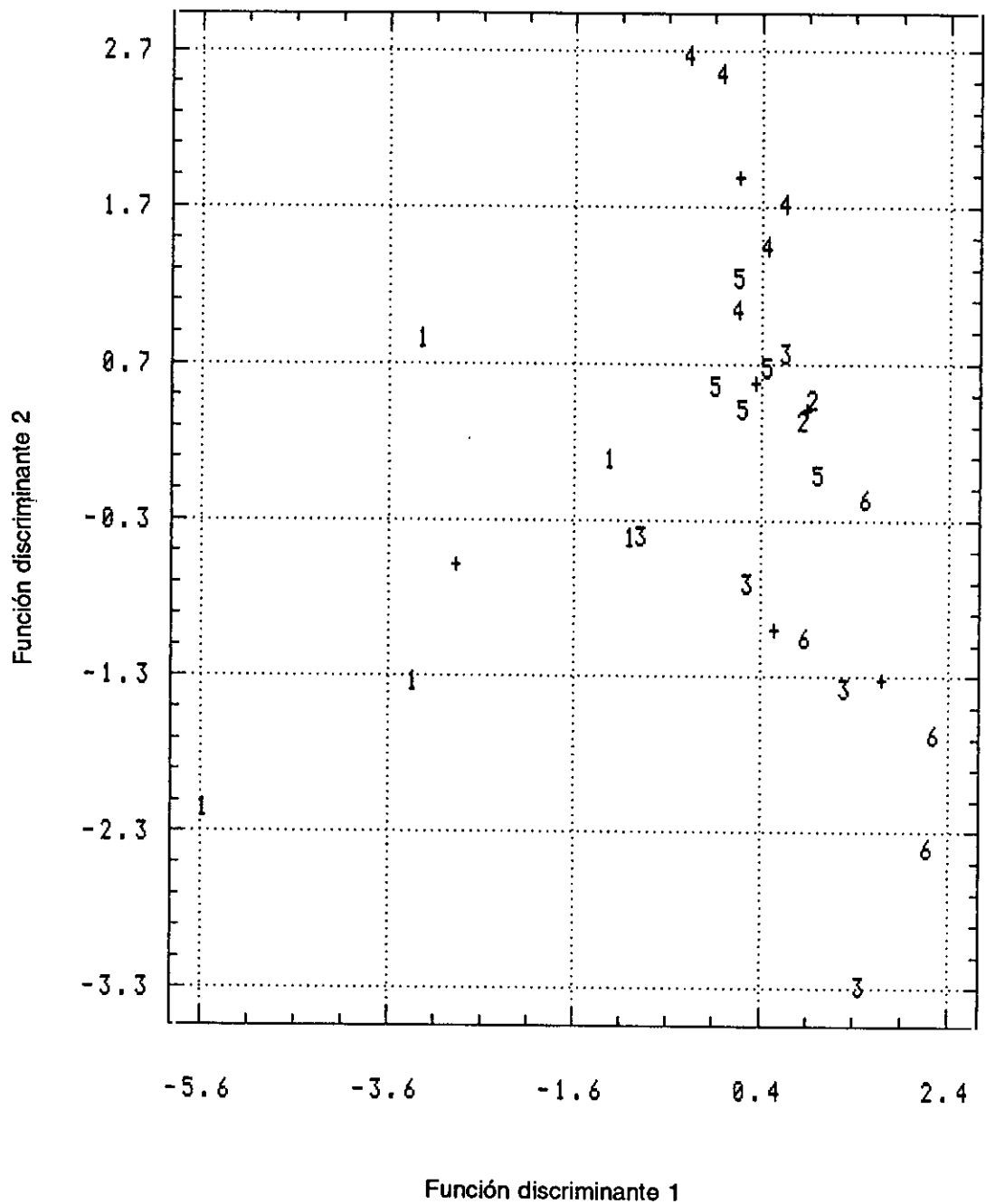


FIGURA V.2-2 Análisis discriminante canónico para las variables: rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos, de los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.* 1=HEC, 2=PEC, 3=HEG, 4=PEG, 5=HER, 6=PER.

las del resto de las poblaciones estudiadas, no siendo así en lo que respecta a los elagitaninos para los que las cortezas de *E. globulus* procedentes de Pontevedra han resultado ser las más ricas.

4. Es de destacar la gran proporcionalidad puesta de manifiesto entre rendimiento global de extracción, contenido en fenoles totales y contenido en proantocianidinas de las cortezas de las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas.
5. De los análisis estadísticos se deduce que en las cortezas las variables rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos, no se pueden considerar como caracteres diferenciadores entre especies de *Eucalyptus*.

2.3 Hojas.

Los rendimientos de extracción, los niveles de fenoles totales, de proantocianidinas y de elagitaninos, obtenidos en los extractos metanólicos de hojas de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*, se muestran en la tabla V.2-7 y el correspondiente análisis univariante en la V.2-8.

2.3.1 *Eucalyptus camaldulensis*.

Los extractos de hojas de *E. camaldulensis* han presentado en general valores del rendimiento de extracción y de niveles de fenoles totales muy superiores a los de corteza y de madera.

En lo que se refiere a los taninos, las hojas de *E. camaldulensis* se caracterizan por un alto contenido de elagitaninos (1,29-7,53 mg/g) y bajos niveles de proantocianidinas

TABLA V.2-7

Rendimiento en extracto total y contenido en fenoles totales, proantocianidinas y elagitaninos de hojas de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*.

Muestra	Extracto en MeOH-H ₂ O (%)	Fenoles totales ^a	Proantocianidinas ^b	Elagitaninos ^c
HEC1	36,32	87,61 (0,72)	2,39 (0,07)	7,53
HEC2	32,86	75,17 (0,18)	2,71 (0,14)	5,55
HEC3	41,21	75,76 (5,13)	3,52 (0,15)	3,80
HEC4	36,62	96,40 (1,52)	3,61 (0,09)	7,10
HEC5	36,23	94,46 (0,89)	2,52 (0,12)	3,81
PEC1	21,41	46,72 (2,92)	4,33 (0,21)	1,29
PEC2	26,70	37,40 (2,23)	4,36 (0,21)	2,07
HEG1	23,52	56,27 (0,69)	2,02 (0,16)	3,99
HEG2	26,36	51,69 (0,17)	3,13 (0,13)	4,38
HEG3	27,70	63,92 (4,45)	4,38 (0,15)	4,03
HEG4	26,02	74,33 (3,39)	5,08 (0,04)	2,74
HEG5	24,72	51,01 (1,44)	2,87 (0,23)	3,22
PEG1	21,59	44,99 (0,72)	0,95 (0,08)	3,33
PEG2	19,48	31,14 (0,98)	1,02 (0,14)	1,26
PEG3	24,94	54,98 (0,80)	1,79 (0,13)	6,69
PEG4	35,40	70,58 (0,52)	4,41 (0,16)	4,01
PEG5	22,10	54,23 (1,07)	2,57 (0,23)	3,61
HER1	29,44	63,22 (1,17)	1,41 (0,40)	4,65
HER2	30,66	56,40 (1,29)	1,51 (0,43)	2,87
HER3	17,33	55,13 (1,79)	1,13 (0,32)	1,95
HER4	26,35	64,62 (0,34)	3,09 (0,88)	3,74
HER5	32,76	67,24 (1,73)	1,53 (0,43)	7,57
PER1	26,87	65,07 (1,82)	1,92 (0,54)	8,13
PER2	28,41	76,41 (3,67)	1,21 (0,34)	5,76
PER3	25,50	48,19 (0,35)	1,99 (0,56)	3,12
PER4	30,11	67,38 (1,47)	2,27 (0,64)	4,43

- H=Huelva. P=Pontevedra. EC=*E. camaldulensis*. EG=*E. globulus*. ER=*E. rudis*.
- % en peso.
- Los datos de a, b y c vienen dados en mg por g de peso seco de hojas; siendo expresados respectivamente para a) en base a ácido gálico, para b) en base a catequina y para c) en ácido elágico
- Los valores de a y b son media de tres repeticiones y los valores encerrados entre paréntesis representan las desviaciones estándar correspondientes.

TABLA V.2-8 | Análisis univariante de los rendimientos en extracto total y contenido en taninos de los extractos de hojas de *Eucalyptus* spp.

PROCEDENCIA	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie	Procedencia	Inter.		
	H			P			H			P			H			P							
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV				Dif.sig/Agrup.	Dif.sig/Agrup.
Extracto en MeOH-H ₂ O	38,65	2,98	8	24,06	3,74	16	25,67	1,60	6	24,70	6,29	25	27,31	6,04	22	27,72	1,99	7	*	G-R-C	**	P--H	**
Fenoles totales	85,88	10,05	12	42,06	6,59	16	59,44	9,78	16	51,18	14,49	28	61,32	5,29	9	64,28	11,78	18	NO	-GRC-	***	P--H	***
Proantocianidinas	2,95	8,57	19	4,34	0,02	1	3,50	1,22	35	2,15	1,43	66	1,74	0,78	45	1,85	0,45	24	***	R--GC	NO	-PH-	**
Elagitaninos	5,56	1,76	32	1,68	0,55	33	3,67	0,67	18	3,78	1,94	51	4,16	2,16	52	5,36	2,14	40	NO	-CGR-	NO	-PH-	**

x= media.

σ = desviación estándar.

CV= coeficiente de variación.

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza.

Inter.= interacción.

10% ≥ * ≥ 5%, 5% ≥ ** ≥ 1%, 1% ≥ ***.

C= *E. camaldulensis*. G= *E. globulus*. R= *E. rudis*. H= Huelva. P= Pontevedra.

(2,39-4,36 mg/g), respecto de *E. globulus* y *E. rudis*, como se puede deducir de las tablas V.2-7 y V.2-8.

Una vez más, como en el caso de madera y corteza, las hojas procedentes de árboles de Huelva resultaron ser más ricas en extraíbles que las de Pontevedra, en particular en fenoles totales (x: Huelva 85,88 mg/g, Pontevedra 42,06 mg/g) y en elagitaninos (x: Huelva 5,56 mg/g, Pontevedra 1,68 mg/g). Las proantocianidinas, sin embargo, resultaron más abundantes en las procedentes de Pontevedra (x: Huelva 2,95 mg/g, Pontevedra 4,34 mg/g).

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto una cierta proporcionalidad entre los niveles de proantocianidinas y de elagitaninos, y los niveles de fenoles totales, aunque no con los rendimientos de extracción.

2.3.2 *Eucalyptus globulus*.

En cuanto al análisis de los resultados correspondientes a los extractos de hojas de *E. globulus*, se podrían establecer generalizaciones semejantes a las comentadas para *E. camaldulensis*. Se puede decir que no presentan ninguna particularidad con respecto a los de *E. camaldulensis*. No obstante, hay que señalar que el contenido en fenoles totales y el rendimiento extractivo fue en la especie que nos ocupa ligeramente inferior y, por otra parte, se ha puesto de manifiesto la proporcionalidad entre el conjunto de las proantocianidinas y elagitaninos, y el contenido en fenoles totales (tablas V.2-7 y V.2-8).

2.3.3 *Eucalyptus rudis*.

Al igual que ocurrió en las especies *E. camaldulensis* y *E. globulus*, en los extractos de hojas de *E. rudis* se han obtenido rendimientos de extracción, niveles de fenoles y de taninos considerablemente superiores a los obtenidos en madera y corteza. A pesar de

que la madera y corteza de esta especie (tablas V.2-1 y V.2-3), frecuentemente, presentan los niveles mínimos de proantocianidinas y elagitaninos, en las hojas se han encontrado niveles equiparables a los de las otras dos especies estudiadas (tablas V.2-7 y V.2-8).

Por otro lado, no han sido observadas diferencias en los contenidos de fenoles totales y proantocianidinas en relación con la procedencia de las muestras, mientras que los niveles de elagitaninos resultaron algo superiores en las muestras correspondientes a Pontevedra.

2.3.4 Análisis numérico.

Análisis univariante

Los resultados de los análisis univariantes, relativos a los rendimientos extractivos y a los niveles de taninos de los extractos de hojas de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* se resumen en la tabla V.2-8.

Cuando se consideran las distintas especies, el análisis pone de manifiesto agrupamientos diferentes para cada una de las variables. Se observa una cierta correspondencia entre rendimiento extractivo y contenido en fenoles totales, ya que las especies se han ordenado de forma similar, aunque para la segunda variable, contenido en fenoles, las diferencias entre especies no hayan resultado significativas. El agrupamiento obtenido para la variable contenido en proantocianidinas refleja que en hojas de *E. camaldulensis* y *E. globulus* los valores son significativamente superiores respecto de los de *E. rudis*; sin embargo, no se han obtenido diferencias significativas entre las tres especies de *Eucalyptus*, en lo que respecta al contenido en elagitaninos de las hojas.

Tomando en consideración la diferente procedencia de las muestras, hay que señalar que este factor tiene influencia significativa en las variables rendimiento extractivo y fenoles totales, siendo los valores significativamente superiores en las hojas procedentes de Huelva, al igual que ha ocurrido en madera y corteza. Por el contrario, los niveles de proantocianidinas y de elagitaninos no han diferido significativamente, considerando en conjunto las muestras procedentes de Pontevedra y de Huelva.

Por otro lado, es preciso resaltar que la significación de la interacción entre especie y origen es considerable y, así, los resultados de los análisis teniendo en cuenta los orígenes pueden variar según la especie. Por ejemplo, aunque no se han obtenido diferencias significativas entre las muestras procedentes de Huelva y de Pontevedra, en cuanto a los niveles de elagitaninos sí se obtienen diferencias significativas si consideramos únicamente la especie *E. camaldulensis*, en la cual las muestras de Huelva presentan niveles significativamente superiores a las de Pontevedra.

Análisis multivariante

Los resultados obtenidos en el análisis discriminante realizado para las variables: rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos de los extractos metanólicos de hojas de *Eucalyptus spp.*, se presentan en la tabla V.2-9 y la figura V.2-3.

En dicho análisis se pone de manifiesto una vez más el solapamiento existente entre las hojas de las poblaciones de *Eucalyptus spp.* estudiadas, teniendo en cuenta los diferentes orígenes y las diferentes especies, por lo que las variables consideradas no parecen ser adecuadas en la diferenciación entre especies y entre procedencias. Al igual que en las muestras de madera y de corteza, en las hojas se observa una apreciable diferenciación entre las muestras de Huelva y las de Pontevedra de *E. camaldulensis*.

TABLA V.2-9 Análisis discriminante canónico para las variables rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos de los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

ANÁLISIS DISCRIMINANTE			
Función discriminante (FD)	Autovalor	Porcentaje relativo	Correlación Canónica
1	4,9627064	83,92	0,91230
2	0,7887514	13,34	0,66404
3	0,1270722	2,15	0,33578
4	0,0347487	0,59	0,18325

COEFICIENTES ESTANDARIZADOS DE LAS FUNCIONES DISCRIMINANTES				
Variable	FD1	FD2	FD3	FD4
Rend. extractivo	-0,66989	0,20931	-0,95469	0,52424
Fenoles totales	-1,00530	0,22189	0,50511	-0,77827
Proantocianidinas	1,12533	0,73528	0,33228	0,21721
Elagitaninos	0,34354	-0,21934	0,70994	0,88789

La representación canónica correspondiente se muestra en la figura V.2-3.

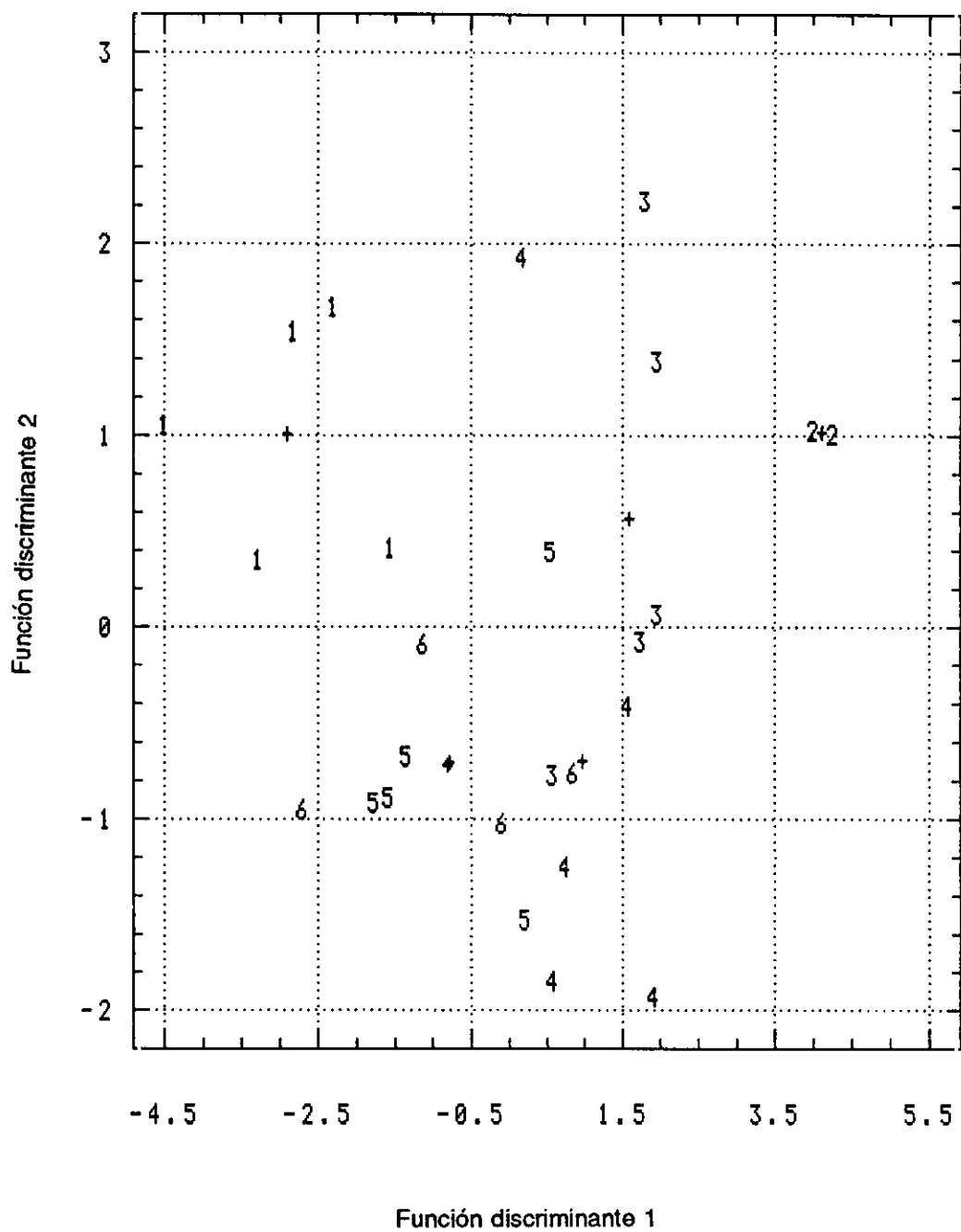


FIGURA V.2-3 Análisis discriminante canónico para las variables: rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos, de los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.* 1=HEC, 2=PEC, 3=HEG, 4=PEG, 5=HER, 6=PER.

2.3.5 Conclusiones.

- 1- En comparación con la madera y la corteza, las hojas han sido la parte del árbol en la cual se han obtenido, con diferencia, los mayores rendimientos de extracción y los mayores niveles de fenoles totales y de elagitaninos en el extracto metanólico, para las tres especies de *Eucalyptus* en estudio. Sin embargo, los niveles de proantocianidinas han resultado, en general, inferiores a los estimados en madera y, sobre todo, en corteza.
- 2- Las hojas de *E. camaldulensis* han sido las más ricas en extracto global, fenoles totales y, junto con las de *E. globulus*, proantocianidinas. Los niveles de elagitaninos resultaron similares en las tres especies.
- 3- Se ha observado una relación de proporcionalidad entre rendimientos de extracción globales y contenido en fenoles, pero no entre ninguna de estas dos variables y los niveles de proantocianidinas y elagitaninos. Esto indica la existencia en el extracto de otros compuestos fenólicos, no tánicos, que contribuyen considerablemente al contenido de fenoles totales.
- 4- Considerando los resultados obtenidos en el análisis estadístico para las variables rendimiento extractivo, contenido en fenoles totales, en proantocianidinas y en elagitaninos de los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*, se puede concluir que dichas variables no son adecuadas para la diferenciación entre especies de *Eucalyptus*.

3. Análisis por CLAR en fase inversa.

3.1 Optimización de los análisis por CLAR.

El primer problema que se plantea en el estudio de los taninos, proantocianidinas y elagitaninos es la inexistencia de patrones comercializados que faciliten la puesta a punto de los métodos de análisis.

Para la optimización de las condiciones de análisis por CLAR en fase inversa, se utilizaron las fases acuosas liofilizadas de muestras de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*. Se eligieron muestras de esta especie ya que resultó, en general, rica tanto en elagitaninos como en proantocianidinas, según revelan los resultados de las valoraciones cuantitativas de estos compuestos, los cuales se han expuesto en el apartado V.2.

En orden a la optimización de los análisis por CLAR se consideraron los siguientes parámetros:

- 1) disolvente empleado en la disolución de la muestra liofilizada.
- 2) agente acidificante de la fase móvil.
- 3) gradiente de elución.

Disolvente para la disolución de la muestra. El disolvente utilizado para la disolución de la muestra ha tenido una gran influencia en el perfil cromatográfico obtenido por CLAR. Cuando los liofilizados fueron disueltos en MeOH, se observó un desdoblamiento y/o ensanchamiento de algunos de los picos cromatográficos, que se eliminan, generalmente, con la utilización de H₂O, produciéndose en este último caso cromatogramas con una mayor resolución.

En las figuras V.3.1 y V.3.2 se muestran ejemplos de los cromatogramas obtenidos de las fases acuosas liofilizadas, de hojas y madera de *E. camaldulensis*, disueltas en MeOH y en H₂O. En el caso de hojas, los mejores cromatogramas se han obtenido, cuando las muestras fueron disueltas en H₂O o H₂O con una pequeña proporción de MeOH. En madera y corteza la elección del disolvente se presenta más dificultosa ya que no parece haber diferencia entre los resultados obtenidos con H₂O y con MeOH-H₂O como disolventes.

Han sido descritas anomalías en los picos cromatográficos por Hatano *et al.* (1988), para taninos hidrolizables con grupos deshidrohexahidroxidifenilo, cuando sus soluciones alcohólicas fueron sometidas a cromatografía líquida de alta resolución, y que se han atribuido a la formación de aductos de metanol con los grupos DHHDP de los citados elagitaninos.

También se han observado anomalías en otros elagitaninos considerados muy polares, como castalagina y vescalagina, cuando se utiliza MeOH para su disolución. En este caso se han atribuido a autoasociaciones de estos compuestos que conducen a la formación de complejos, cuya solubilidad en disolventes orgánicos es limitada y la solvatación por agua podría producir la disociación de dichos complejos solubles (Scalbert *et al.* 1990).

Como parte de este estudio previo para la optimización de los análisis por CLAR, se han ensayado, sometidos a las mismas condiciones de disolución y cromatográficas, algunos de los polifenoles monoméricos constituyentes de los taninos, en particular, aquellos de los que disponíamos de patrón: ácido elágico, ácido gálico, (±) catequina y (±) epicatequina, así como ácido tánico (mezcla de galotaninos). Cuando el disolvente utilizado para la disolución y posterior análisis por CLAR fue MeOH, sus perfiles cromatográficos presentaron doble pico, el primero de ellos considerablemente deformado. En el caso del ácido tánico, también se observaron deformaciones y

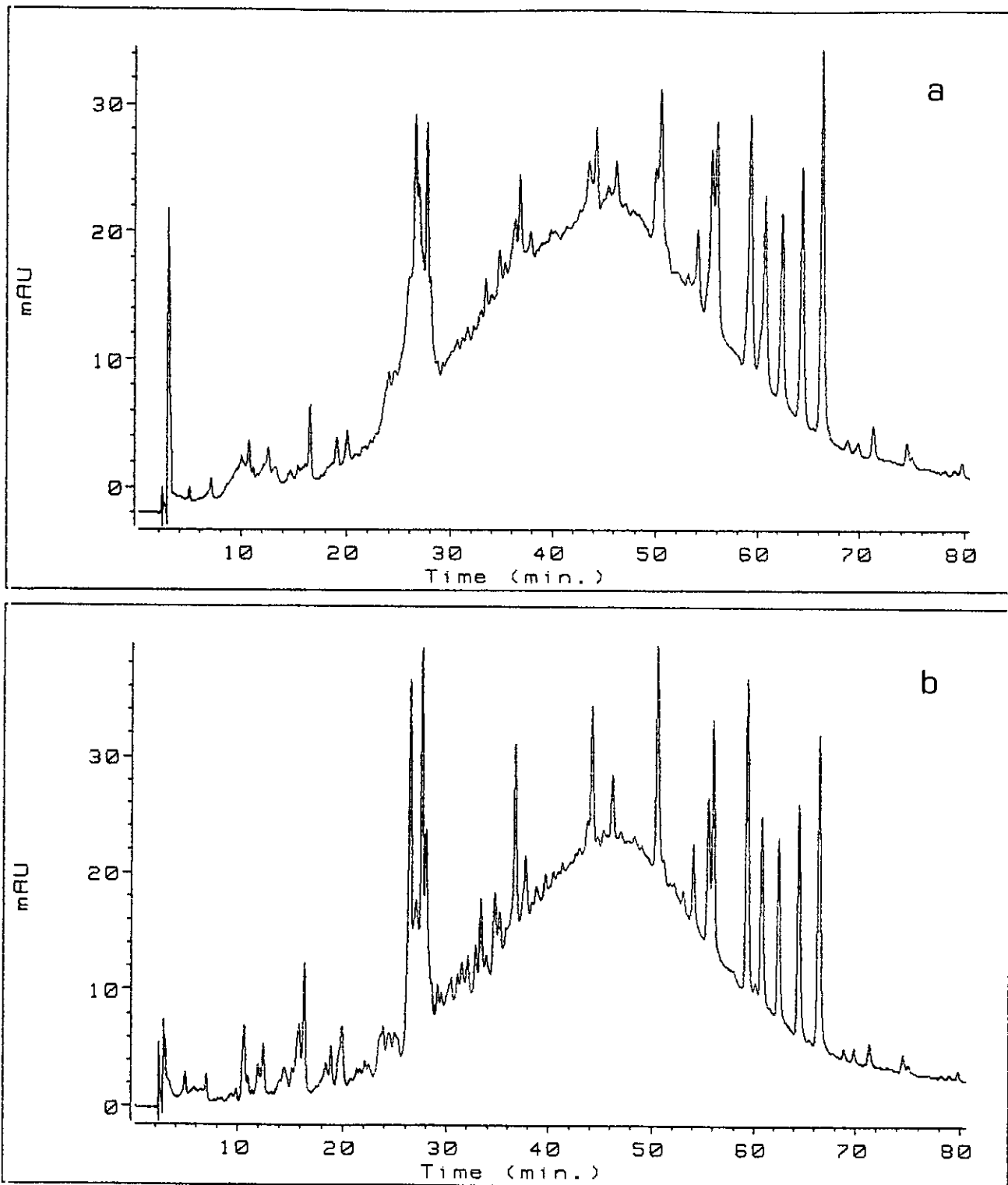


FIGURA V.3-1 Cromatogramas de extractos acuosos liofilizados de madera de *E. camaldulensis*. a: disueltos en MeOH. b: disueltos en MeOH-H₂O (1:1). Condiciones de CLAR: apartado IV.3.1.2, gradiente n°1. Absorbancia 270±15 nm.

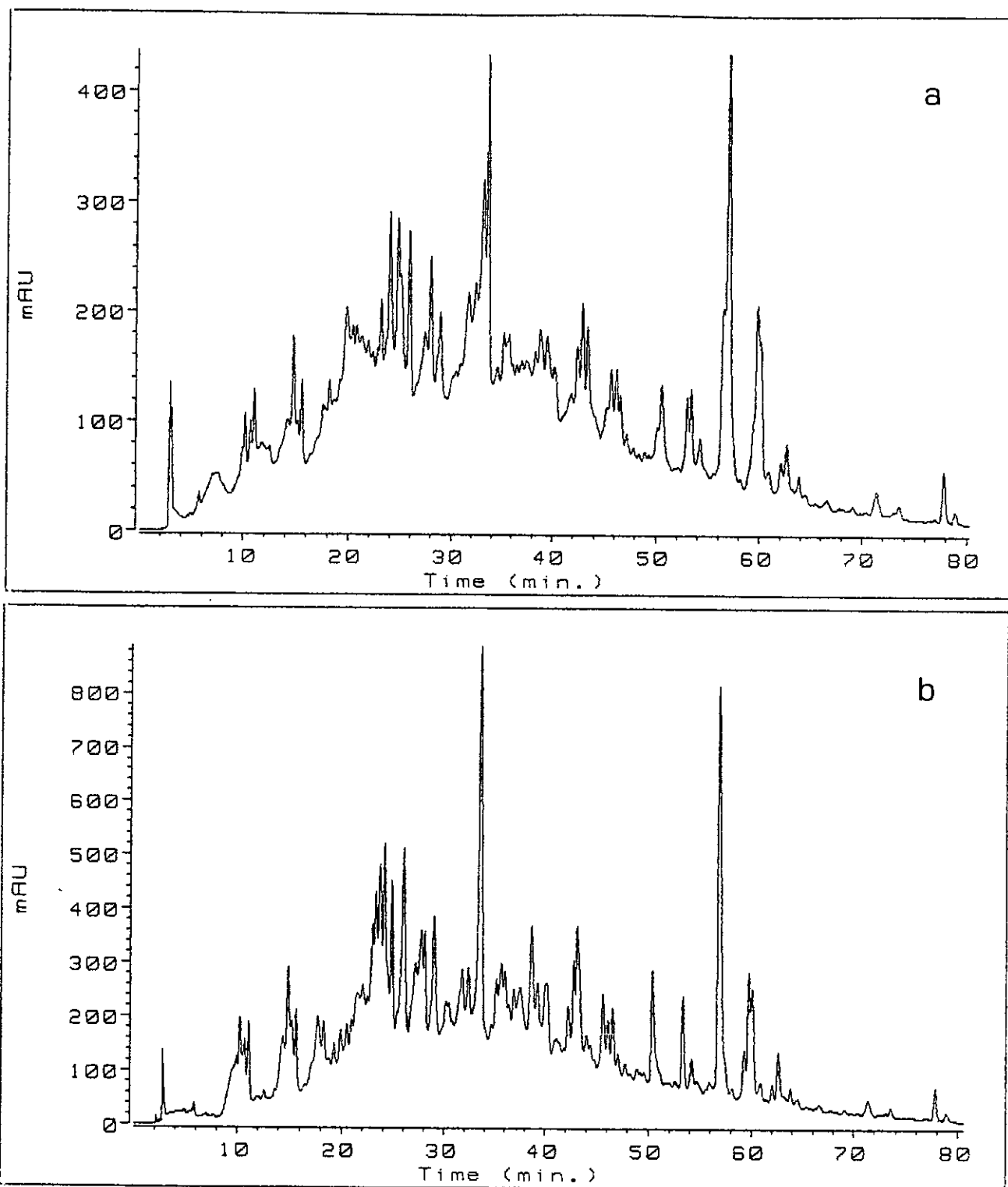


FIGURA V.3-2 Cromatogramas de extractos acuosos liofilizados de hojas de *E. camaldulensis*. a: disueltos en MeOH. b: disueltos en MeOH-H₂O (1:1). Condiciones de CLAR: apartado IV.3.1.2, gradiente de elución n° 1. Absorbancia 270±15 nm.

desdoblamiento de los picos cuando fue disuelto en MeOH.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos se seleccionó como disolvente para la disolución de las muestras a analizar por CLAR, MeOH-H₂O (1:1).

Agente acidificante de la fase móvil MeOH-H₂O. Los acidificantes del eluyente ensayados fueron el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido fosfórico, ajustando sus concentraciones en dicho eluyente de tal forma que se obtuviese el mismo pH (2-2,5) para los tres casos. Se seleccionó como agente acidificante definitivo el ácido fosfórico en una concentración de 1‰, ya que con él se obtuvieron los mejores cromatogramas.

Por otra parte, se comprobó la necesidad de acidificar por igual los dos componentes de la mezcla eluyente, es decir el MeOH y el H₂O, ya que, al utilizar detector de fotodiodos, si sólo se acidificaba el H₂O, se producía una variación en la concentración de ácido a lo largo del gradiente y, por tanto, de la absorción UV de la mezcla eluyente, que provocaba un desajuste en el detector.

Gradiente de elución. Una vez seleccionado el eluyente y el agente acidificante, solución A: MeOH-H₃PO₄ (999:1) y B: H₂O-H₃PO₄ (999:1); se abordó la optimización del gradiente de elución, ensayando en un primer momento el gradiente lineal de elución utilizado por Conde *et al.* (1994, 1995), para el análisis de flavonoides de extractos etéreos de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.* y que ha sido descrito en el apartado IV.3.1.2 (gradiente 2).

Las mencionadas condiciones de elución no proporcionaron en nuestro caso una adecuada resolución, dando un pico ensanchado y poco resuelto en la parte primera del cromatograma, lo que indicaba la presencia de compuestos polares y con tiempos de retención en la columna cromatográfica muy pequeños, bajo las condiciones de elución citadas. Se observó que la mayoría de los picos cromatográficos de las tres muestras

modelo de *E. camaldulensis* en estudio, eluían antes de que la fase móvil alcanzase un 60% de MeOH, y así se ajustaron las condiciones de elución a un gradiente más lento al principio del cromatograma, llegándose a un compromiso entre resolución del cromatograma y tiempo de análisis. El gradiente seleccionado como definitivo fue el nº 1 descrito en el apartado IV.3.1.2.

Dado que, la línea base de los cromatogramas obtenidos tendía a elevarse, especialmente en el caso de las muestras de madera y corteza, se ensayó también el eluyente acetonitrilo-H₂O, y, por otra parte, diferentes concentraciones de acetonitrilo, utilizado como modificador orgánico, en el eluyente MeOH-H₂O. Ninguna de las opciones estudiadas contribuyó a la mejora de la resolución y de la línea base en dichos cromatogramas, sino que, por el contrario, los resultados obtenidos fueron peores.

A continuación, se dan los tiempos de retención t_R de algunos de los constituyentes de las unidades básicas monoméricas de los taninos, sometidos a las condiciones seleccionadas para los análisis sistemáticos por CLAR (gradiente 1).

Patrón	t_R (min)
Acido gálico	10,21
Acido elágico	60,10
Catequina	27,05
Epicatequina	35,81

3.2 Madera.

Los análisis por CLAR, de los extractos acuosos liofilizados de las muestras de madera de *Eucalyptus spp.*, se realizaron según se ha descrito en el apartado IV.3.1.2, utilizándose las condiciones de elución correspondientes al gradiente 1. Se consideraron,

simultáneamente, dos canales de detección en el UV, uno general de taninos a 270 ± 15 nm, con el objeto de detectar conjuntamente proantocianidinas (máximo de absorción 270-280 nm) y elagitaninos (250-260 nm) y, otro, específico de elagitaninos, aprovechando la particularidad de que estos compuestos muestran en su espectro UV otro máximo de absorción a aproximadamente 365 nm aunque de menor intensidad.

Ya que disponíamos de detector de fotodiodos, fue posible la obtención del espectro UV de cada pico cromatográfico y, así, la asignación de cada uno de ellos a una familia química de taninos.

En las figuras de V.3-3 a V.3-8, se presentan cromatogramas modelo de los extractos acuosos de las muestras de madera de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*. En ellos se han podido diferenciar, las dos clases de taninos principales, proantocianidinas y elagitaninos según los espectros UV, obtenidos para cada uno de los picos (fig. V.3-9 y V.3-10).

En la primera mitad de los cromatogramas se ha observado una amplia variedad de picos, que presentan un máximo de absorción alrededor de 270 nm (fig. V.3-9) y que no absorben a longitudes de onda mayores, presentando espectros UV característicos de proantocianidinas (Lunte, 1987; Putman y Butler, 1989; Mueller-Harvey *et al.*, 1987).

El espectro de los flavanoides monoméricos y poliméricos está formado por dos bandas de absorción debidas a los anillos aromáticos con grupos hidroxilos. El primer máximo de absorción (230-240 nm), es idéntico para todos los compuestos, pero sin embargo el máximo a 270-280 nm presenta ligeras diferencias y ha permitido en algunas ocasiones la diferenciación de distintos tipos de proantocianidinas (Putman y Butler, 1989; Bartolomé Sualdea, 1994).

En los cromatogramas correspondientes a las muestras de madera hemos detectado

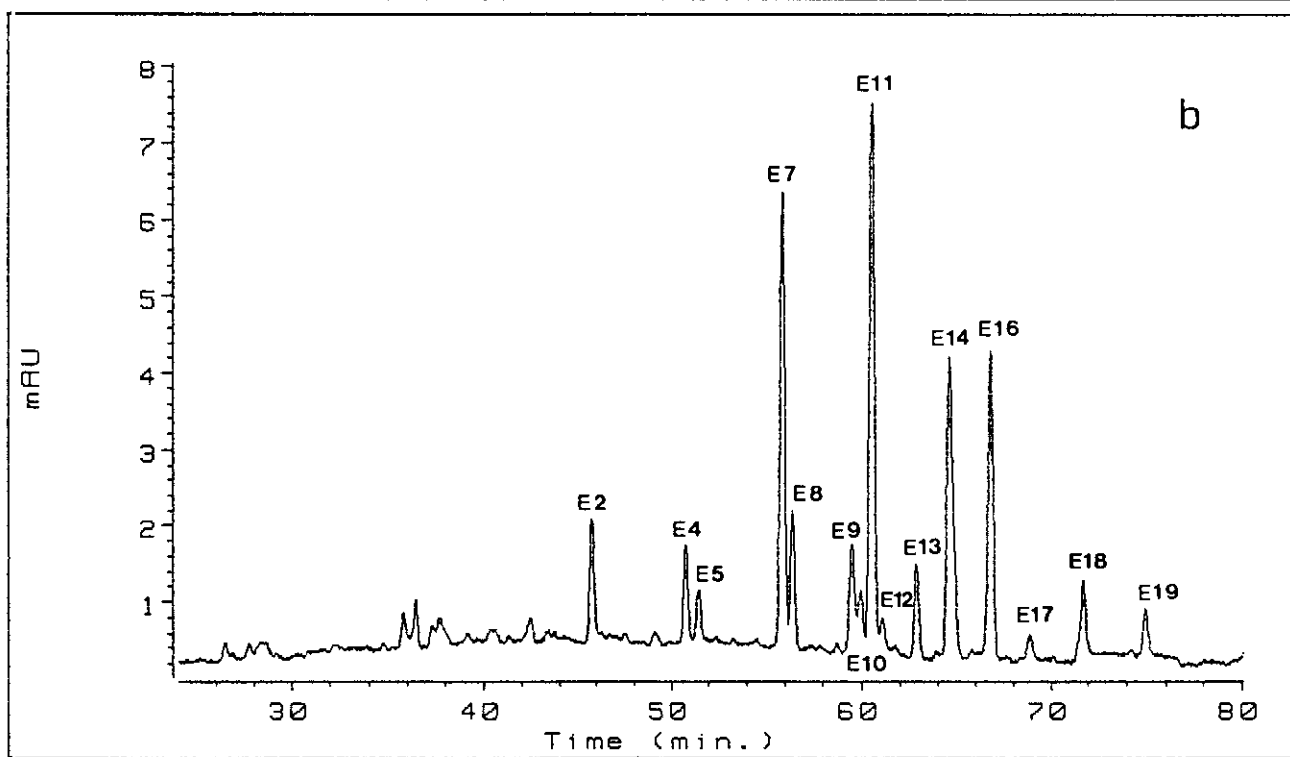
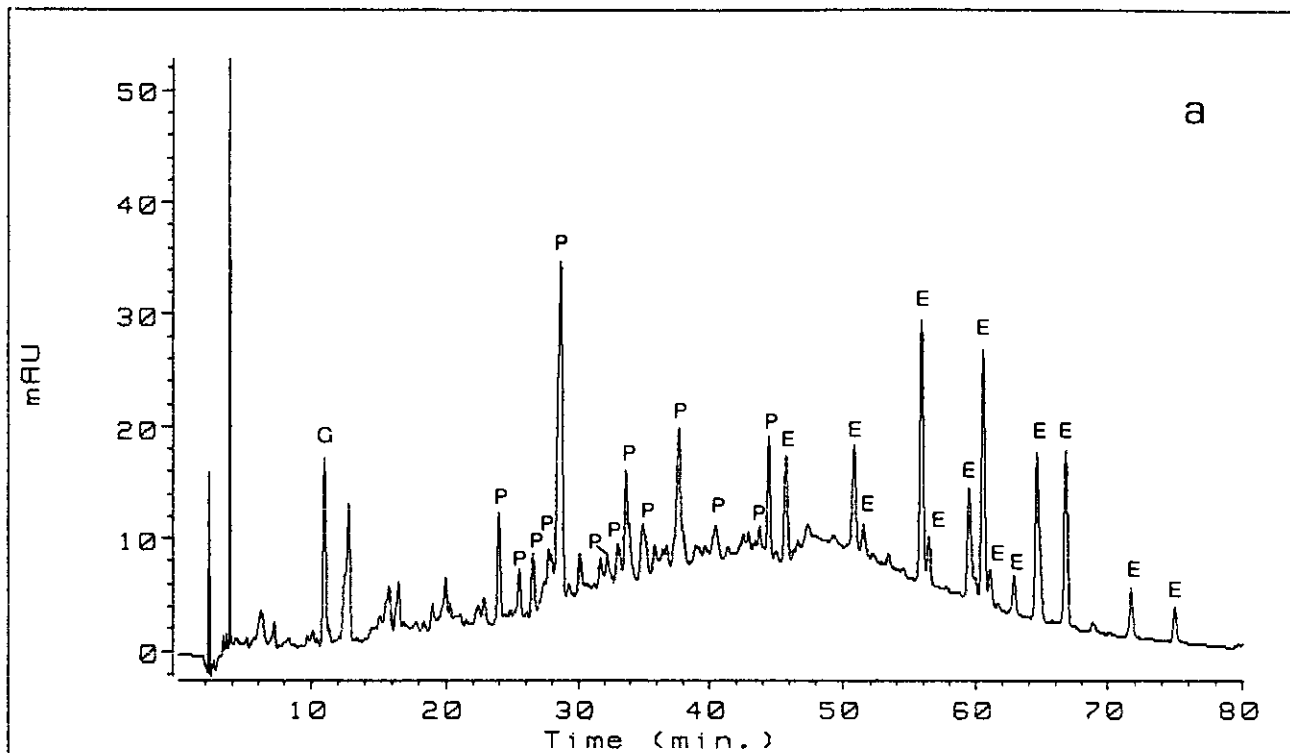


FIGURA V.3-3 Cromatograma tipo de los extractos de madera de *E. camaldulensis* de Huelva (HEC2). a: absorbancia 270±15 nm. b: 365±2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

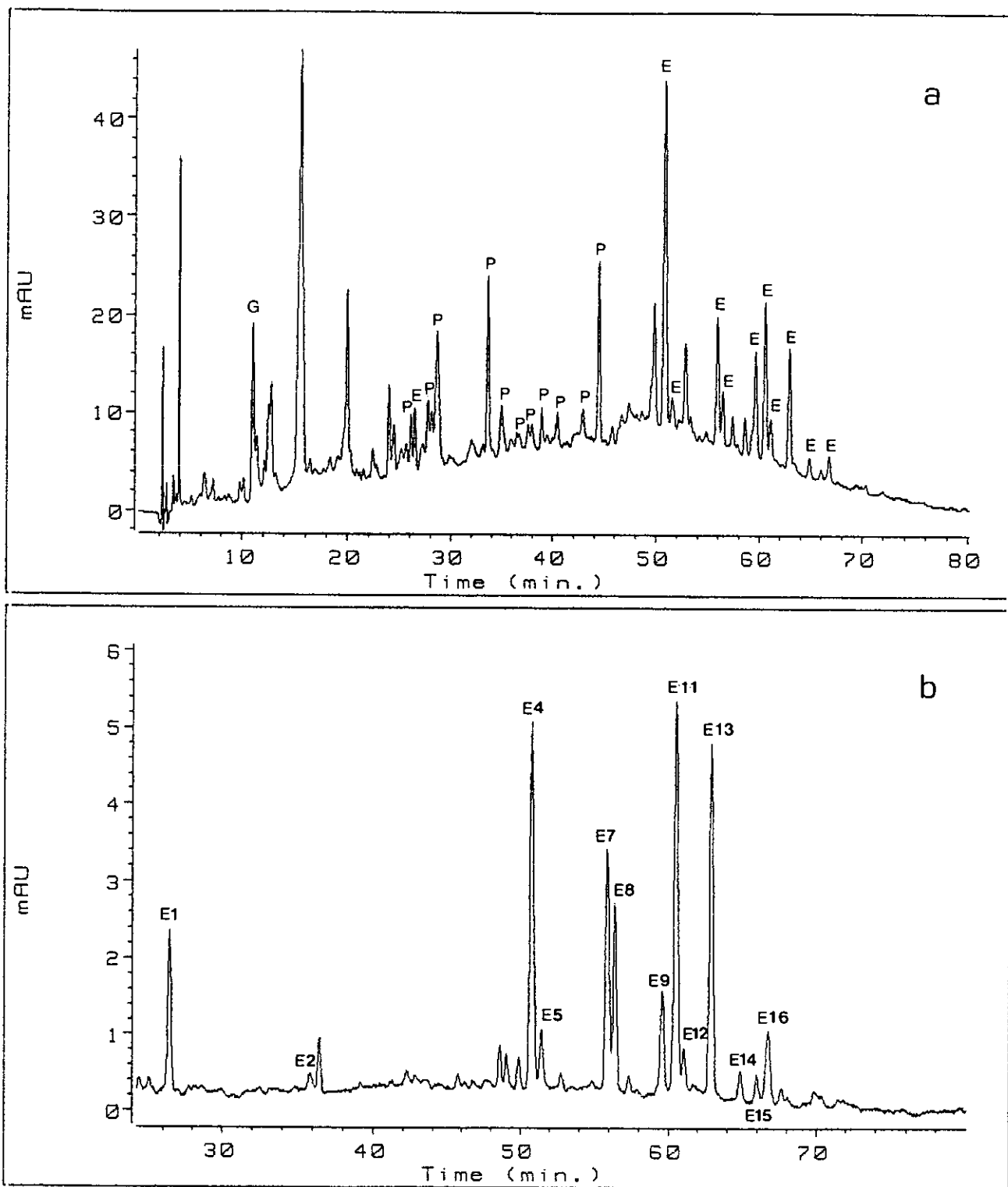


FIGURA V.3-4 Cromatograma tipo de los extractos de madera de *E. camaldulensis* de Pontevedra (PEC2). a: absorbancia 270 ± 15 nm. b: 365 ± 2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

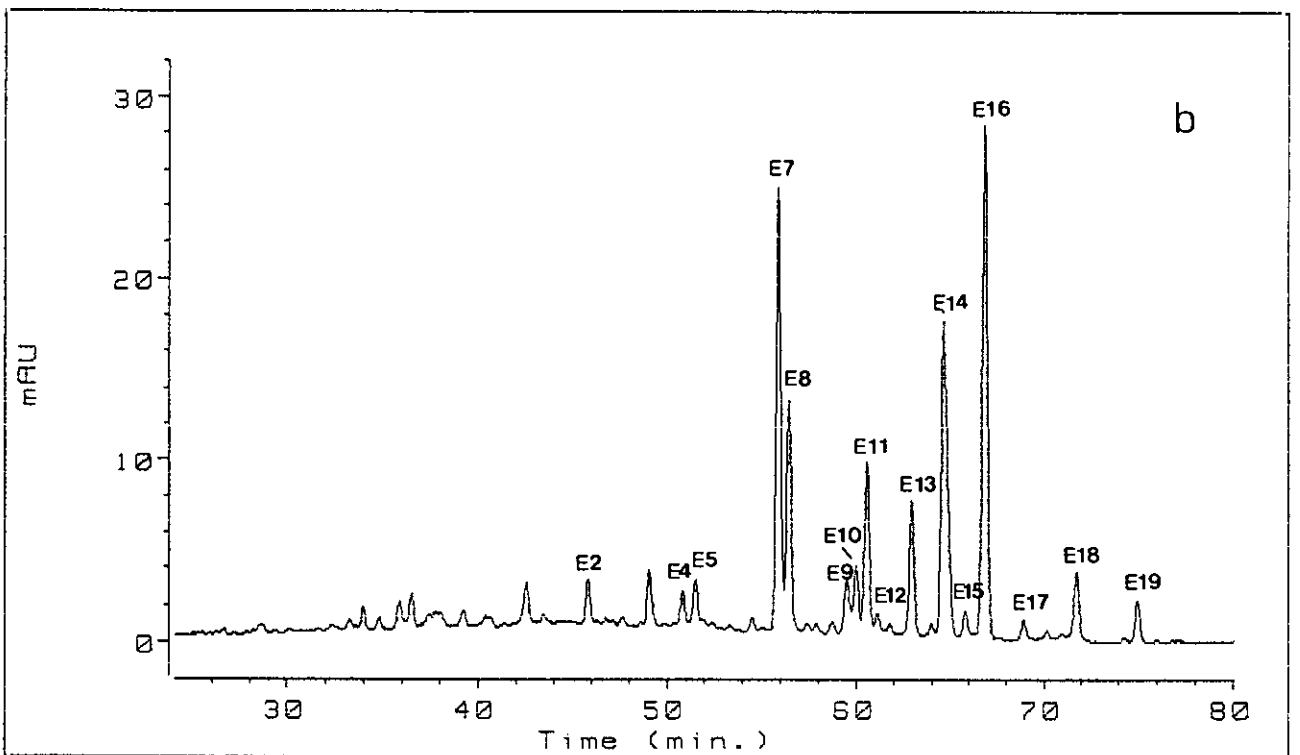
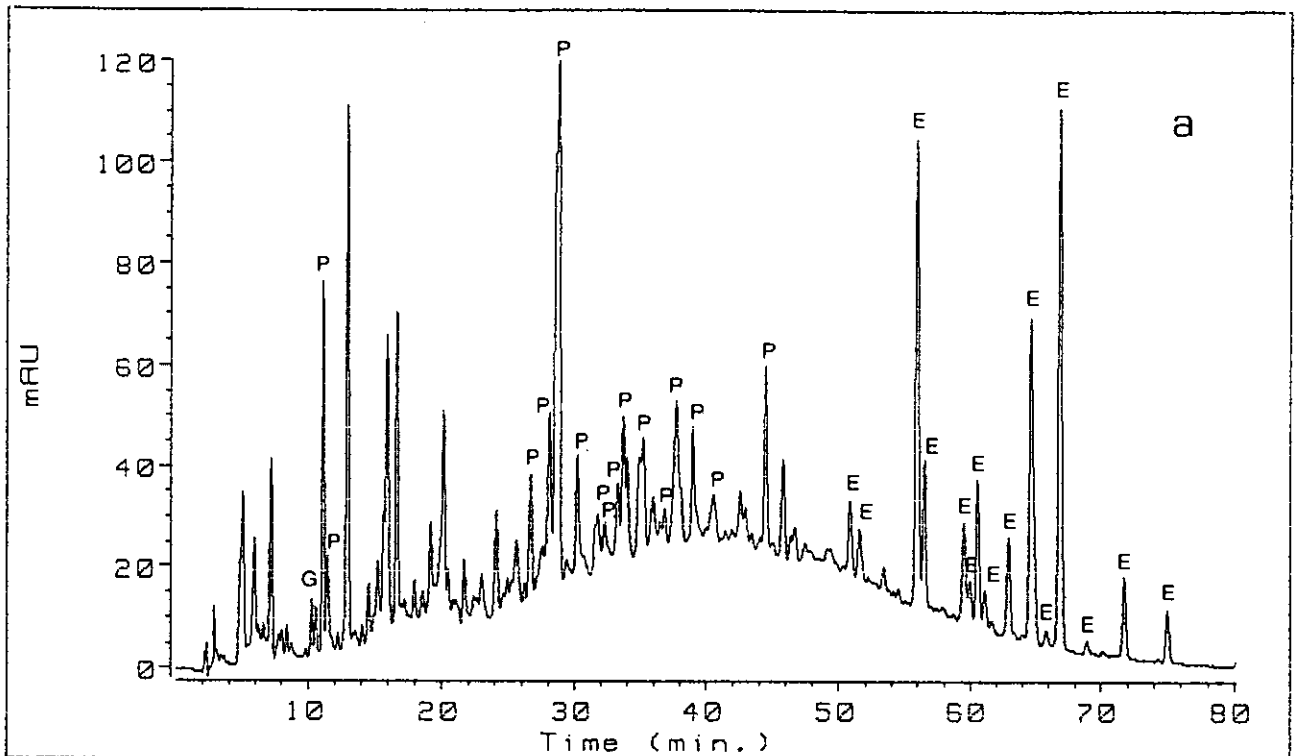


FIGURA V.3-5 Cromatograma tipo de los extractos de madera de *E. globulus* de Huelva (HEG3). a: absorbancia 270 ± 15 nm. b: 365 ± 2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

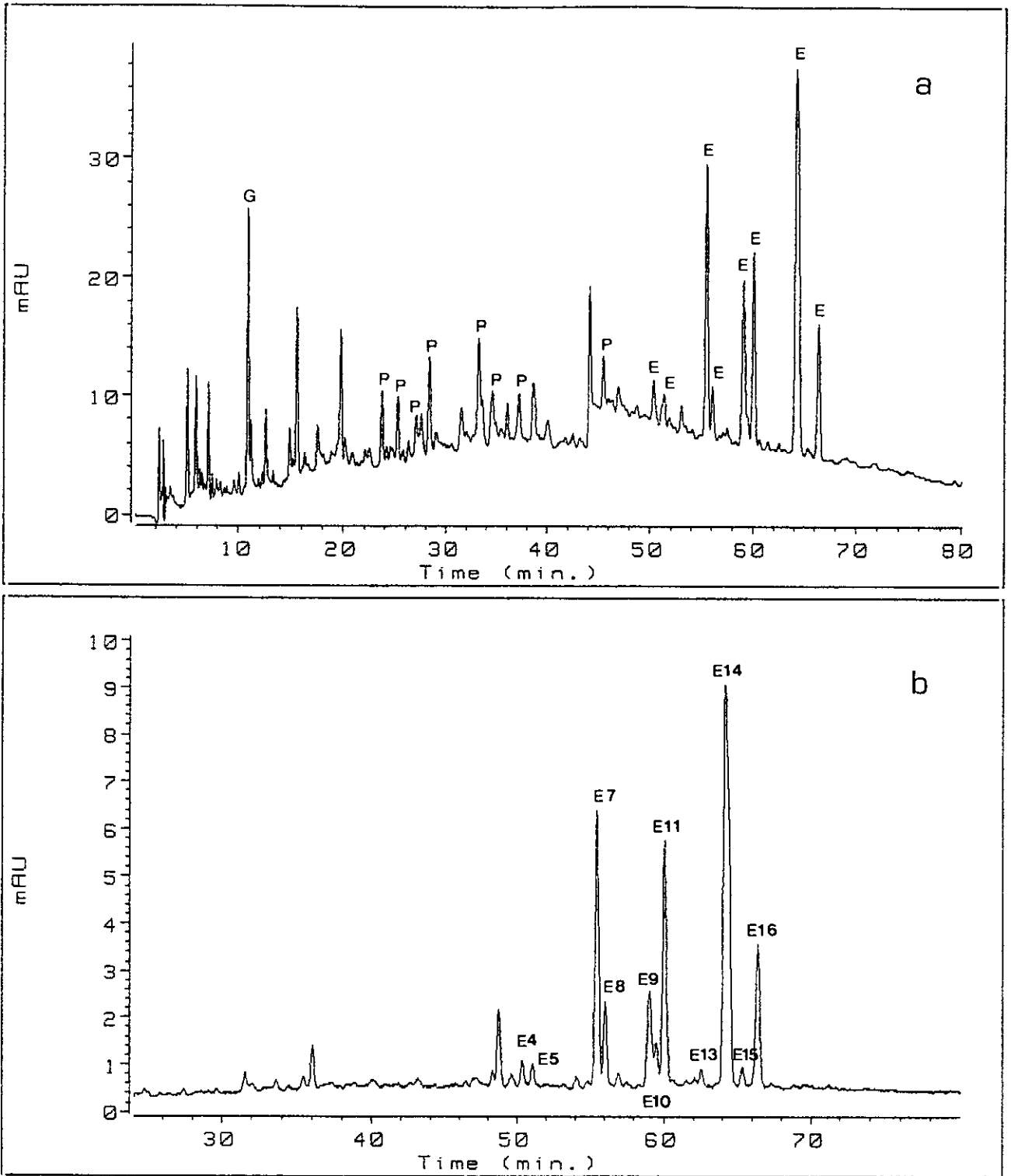


FIGURA V.3-6 Cromatograma tipo de los extractos de madera de *E. globulus* de Pontevedra (PEG3). a: absorbancia 270±15 nm. b: 365±2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

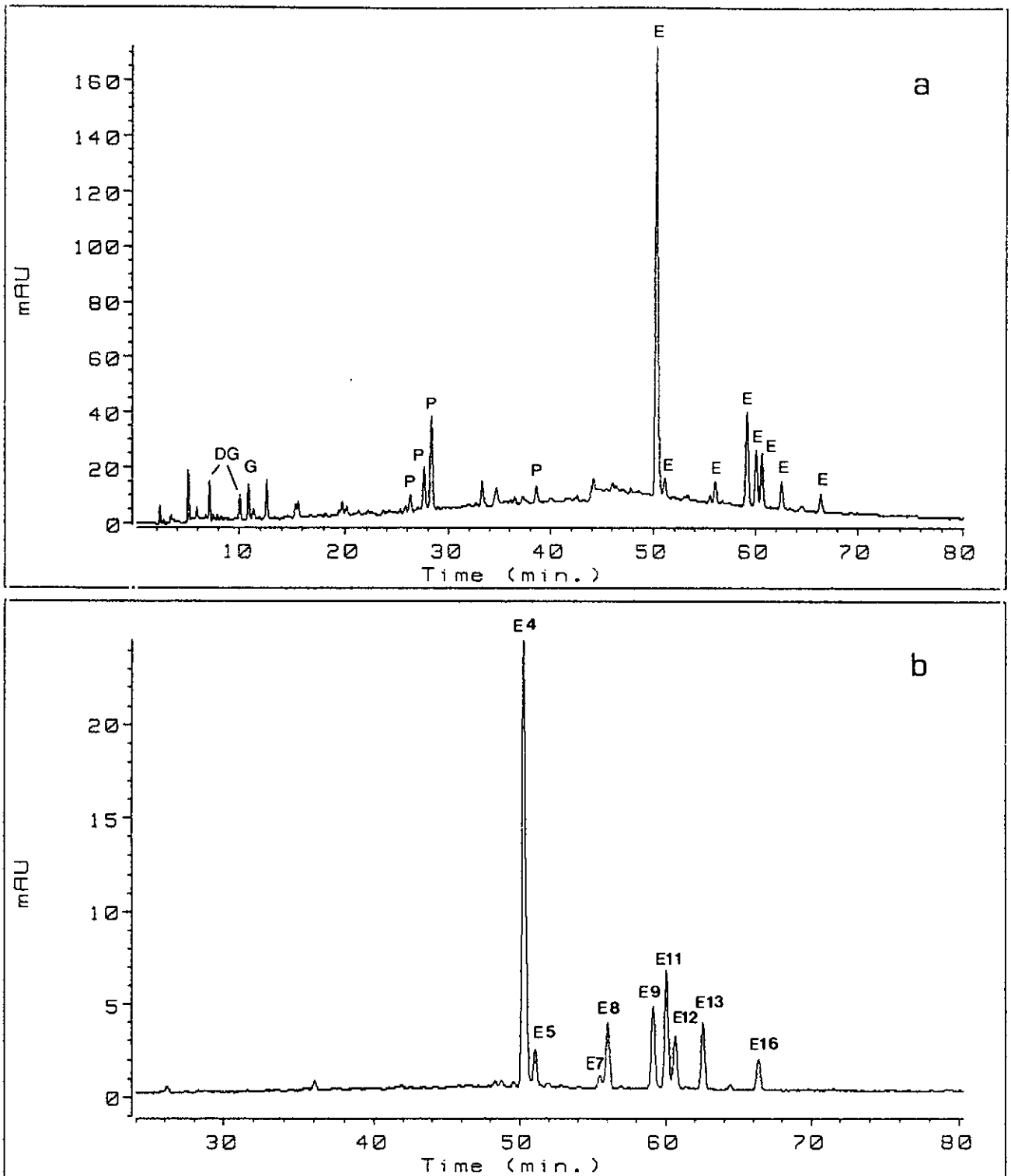


FIGURA V.3-7 Cromatograma tipo de los extractos de madera de *E. rudis* de Huelva (HER3). a: absorbancia 270±15 nm. b: 365±2 nm. G: ácido gálico. DG: derivado de ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

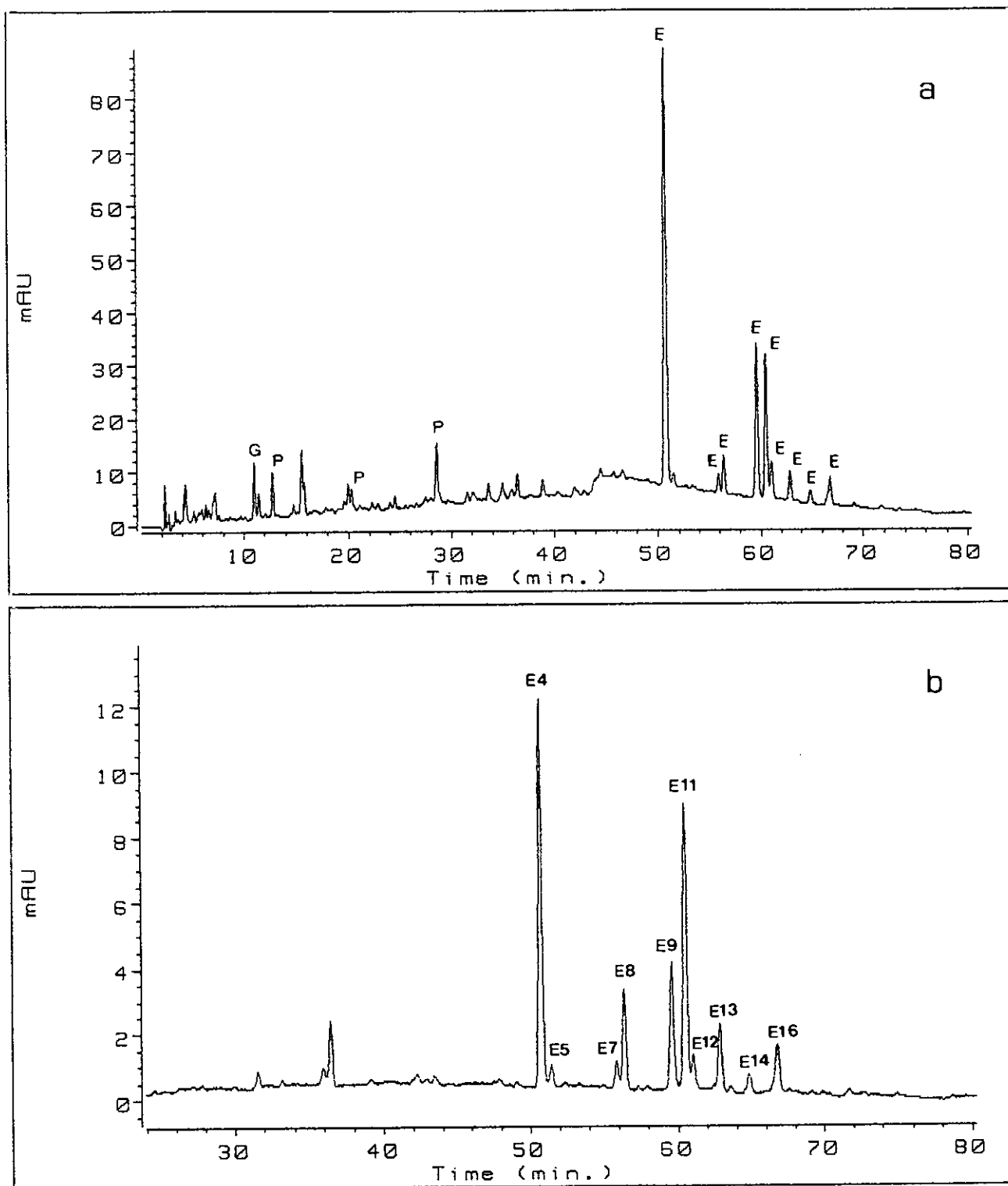


FIGURA V.3-8 Cromatograma tipo de los extractos de madera de *E. rudis* de Pontevedra (PER1). a: absorbancia 270±15 nm. b: 365±2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

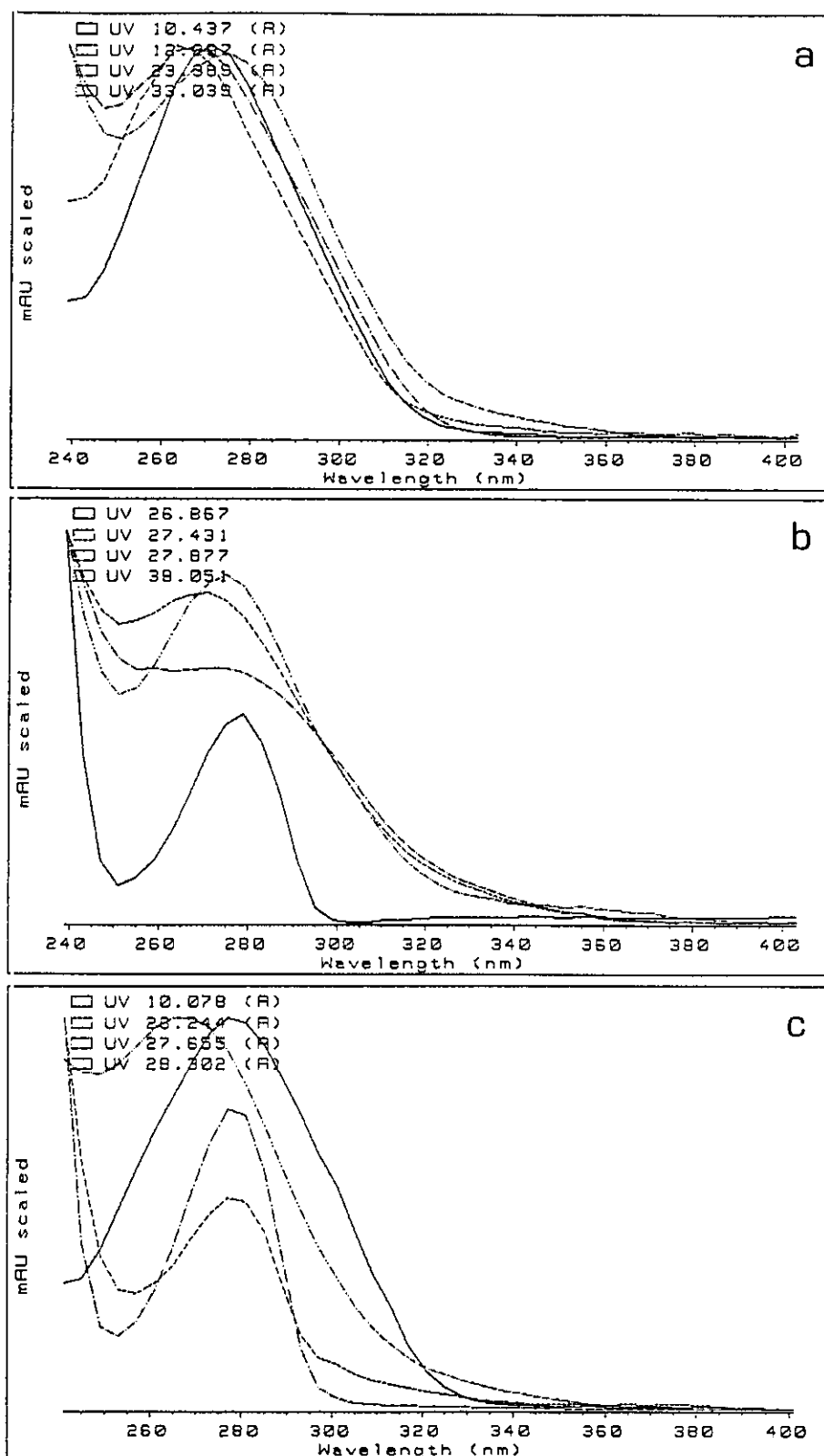


FIGURA V.3-9 Ejemplos de los espectros UV de los picos G y P de los cromatogramas obtenidos por CLAR (fig. V.3-3 a V.3-8), de los extractos de madera de (a) *E. camaldulensis*, (b) *E. globulus* y (c) *E. rudis*.

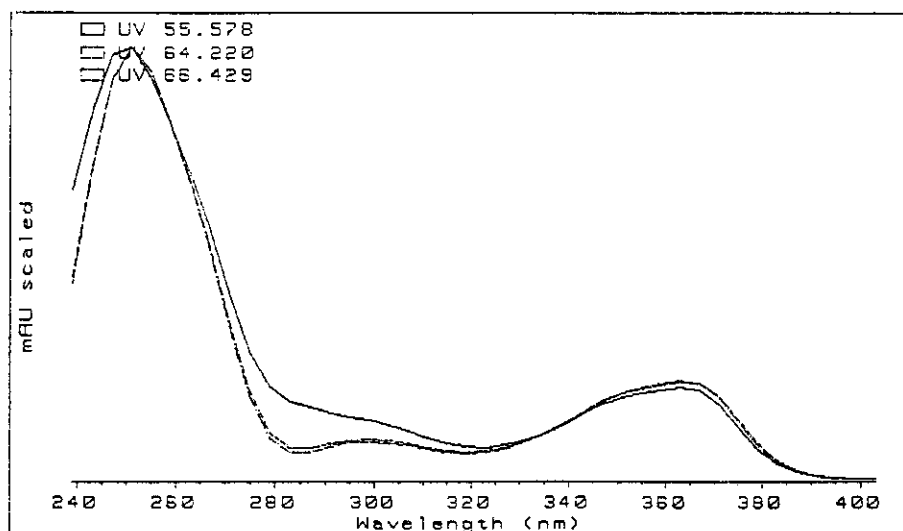


FIGURA V.3-10 Ejemplos de los espectros UV de los picos E, obtenidos mediante CLAR (Fig. V.3-3 a V.3-8), de los extractos de madera de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*.

diferentes espectros UV en los cuales el segundo máximo de absorción varía en un amplio rango de longitudes de onda, como se muestra en la figura V.3-9. Se han observado así, máximos de absorción desde 260 nm a 280 nm y, además, el intervalo de convexidad varía en su amplitud, además de en la longitud de onda a la que se alcanza el máximo de absorción.

En principio, espectros UV muy parecidos entre dos picos cromatográficos sugieren patrones de hidroxilación y estados de oxidación de los anillos heterocíclicos de las proantocianidinas semejantes, ya que dichas propiedades afectan considerablemente los espectros UV de los flavanoles y así, picos cromatográficos con espectros UV semejantes podrían ser atribuidos a taninos con diferencias en la longitud de la cadena polimérica (Putman y Butler, 1989).

Se ha intentado relacionar la longitud de onda del máximo de absorción y el intervalo de convexidad, con la estructura de las unidades constituyentes de las proantocianidinas. Así, máximos de absorción a 279 nm han sido asociados a monómeros y polímeros de (+)catequina y (-)epicatequina, máximos a 274,5 nm a los galatos de (-)epigallocatequina y máximos de 270,6 nm a polímeros compuestos de (-)epigallocatequina. Además, se han atribuido intervalos de convexidad mayores a los galatos que al resto de los tipos de proantocianidinas (Bartolomé Sualdea, 1994).

Sin embargo, es preciso señalar que las anteriores observaciones han sido realizadas con proantocianidinas monó-, dí- y triméricas de estructuras sencillas y además los parámetros espectrales no han sido, en muchos casos, significativamente diferentes. Por otra parte, Lunte (1987) da una amplia variedad de máximos de absorción del espectro UV, para proantocianidinas de estructura desconocida que oscilan entre 276 nm y 280 nm.

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas, en los cromatogramas obtenidos para las muestras de madera, se puede prever una amplia variedad de tipos de proantocianidinas, con patrones de hidroxilación y estados de oxidación de sus unidades monoméricas diferentes, que responderían a la amplia variedad obtenida de espectros UV, de los que se da una muestra en la figura V.3-9; y, a su vez, una amplia variedad de moléculas poliméricas, posiblemente con unidades básicas estructurales semejantes pero diferentes en cuanto a su grado de polimerización, ya que se han obtenido también picos con diferentes tiempos de retención pero con espectros UV, prácticamente idénticos.

En la segunda mitad de los cromatogramas (fig. V.3-3a - V.3-8a) obtenidos para las muestras de madera, en general a partir del minuto 40, los picos cromatográficos se han reconocido en su mayoría como elagitaninos. Estos compuestos al tratarse de derivados del ácido elágico, en particular, de ésteres del ácido elágico con azúcares, presentan un espectro UV prácticamente idéntico al de dicho ácido, con dos máximos de

absorción a 255 nm y 365 nm aproximadamente (fig. V.3-10). En este caso es de destacar la casi ausencia de variabilidad en cuanto a los espectros UV.

La existencia de un máximo de absorción a 365 nm, que aunque es mucho menos intenso es específico de los elagitaninos, nos ha permitido la obtención de los cromatogramas de las figuras V.3-3b a V.3-8b, en los cuales se han detectado los elagitaninos sin la interferencia de las proantocianidinas y, así, ha sido posible el análisis semicuantitativo de estos compuestos.

3.2.1 *Eucalyptus camaldulensis*.

De la observación de los cromatogramas obtenidos para las muestras de madera de *E. camaldulensis* procedentes de Huelva (fig. V.3-2a) y de Pontevedra (fig. V.3-3a), se desprende un comportamiento semejante, en lo que respecta a los perfiles cromatográficos, para muestras de ambas procedencias. Las proantocianidinas tienden a tener un tiempo de retención menor que los elagitaninos y, así estos últimos salen en la segunda parte del cromatograma. Es de destacar también, en ambos cromatogramas, una tendencia de la línea base a elevarse a lo largo del gradiente de elución, posiblemente debido a la presencia de proantocianidinas de alto peso molecular, susceptibles de fenómenos de adsorción en la fase estacionaria de la columna cromatográfica, lo que dificulta su separación cromatográfica.

Tanto en las muestras de Huelva como en las de Pontevedra, se ha observado la presencia de ácido gálico (pico G, $t_R=10,04$ min), identificado por su espectro UV (fig.V.3-9a) y por el método de enriquecimiento de pico. También se han detectado algunos picos considerados como debidos a derivados de dicho ácido, ya que presentan espectros UV idénticos al del ácido gálico.

Por otra parte, se han reconocido como proantocianidinas una serie de picos, con tiempos de retención comprendidos entre 25 y 45 min, cuyos espectros UV han presentado máximos de absorción comprendidos entre 260-265 nm en unos casos y 270-275 nm en otros; de los cuales se muestran algunos ejemplos en la figura V.3-9a. Sin embargo, en ocasiones aparecen picos con máximos de absorción intermedios entre ambas longitudes de onda, y además los intervalos de convexidad también han resultado muy variables, por lo que no se ha podido establecer una clara y evidente clasificación de las proantocianidinas que nos permitiese una comparación entre individuos, poblaciones y especies, como ha podido hacerse para los elagitaninos.

En lo que respecta a la composición en elagitaninos, las figuras V.3-3b y V.3-4b, muestran un modelo de los perfiles cromatográficos, obtenidos a una longitud de onda de 365 ± 2 nm, para la madera de *E. camaldulensis* de ambas procedencias y en la tabla V.3-1, la valoración semicuantitativa, realizada por CLAR, de cada uno de los elagitaninos presentes.

A la vista de los cromatogramas obtenidos, se puede considerar que la especie *E. camaldulensis* presenta una amplia variedad de formas moleculares de elagitaninos, cuyos espectros UV han resultado semejantes al del ácido elágico. Se han separado mediante CLAR 19 picos diferentes, de los cuales, 7 se encuentran con una abundancia relativa considerable.

Por otra parte, es de señalar, que las diferencias entre las muestras procedentes de Huelva y de Pontevedra, así como entre las de madera de una misma procedencia son principalmente cuantitativas, como puede deducirse de la tabla V.3-1. La mayor parte de los picos de elagitaninos están presentes en muestras de ambas procedencias, y únicamente picos poco abundantes, como E1, E17, E18 y E19, han resultado exclusivos de una de ellas.

TABLA V.3-1 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de madera de *E. camaldulensis*.

Elagitanino	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	0	0	0	0	0	10	7
2	1	4	1	2	0	1	1
3	0	0	0	0	0	0	0
4	7	3	11	9	6	17	18
5	1	2	1	0	2	1	2
6	1	0	0	0	1	0	0
7	8	17	3	2	16	7	12
8	18	5	13	11	13	2	9
9	10	5	27	35	11	14	6
10	0	2	0	0	0	0	0
11	4	22	12	11	2	30	20
12	6	1	8	11	3	3	2
13	11	3	9	4	8	6	16
14	13	15	8	6	22	3	2
15	0	0	0	0	0	0	1
16	18	13	7	8	15	7	4
17	0	1	0	0	0	0	0
18	1	3	0	0	1	0	0
19	1	2	0	0	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. EC= *E. camaldulensis*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

3.2.2 *Eucalyptus globulus*.

Los cromatogramas obtenidos de las muestras de madera de *E. globulus*, de los cuales se muestra un modelo para cada una de las procedencias en las figuras V.3-5 y V.3-6, indican una composición en taninos condensados y taninos hidrolizables muy semejante a *E. camaldulensis*. Entre los minutos 25 y 45, se vuelven a obtener una serie de picos con espectros UV propios de las proantocianidinas, destacándose mayor abundancia y variedad de picos en las muestras procedentes de Huelva. En la figura V.3-9b, se muestran algunos de los espectros obtenidos para dichas proantocianidinas. En *E. globulus* se puede señalar como novedad respecto de *E. camaldulensis* que se han detectado algunas proantocianidinas con máximos de absorción alrededor de los 280 nm (fig. V.3-9b).

En cuanto a la composición en taninos hidrolizables de las maderas de *E. globulus*, como se deduce de las figuras V.3-5b y V.3-6b y de la tabla V.3-2, las procedentes de Huelva, también han presentado mayor abundancia de elagitaninos, que las de Pontevedra. Igual que en *E. camaldulensis*, en *E. globulus* los picos E17, E18 y E19, aunque son picos minoritarios, han resultado característicos de las muestras de Huelva.

Por otra parte, se puede destacar que los picos E7, E11, E14 y E16, vuelven a ser, en la especie *E. globulus* picos mayoritarios, como ocurrió en *E. camaldulensis*; sin embargo, los elagitaninos E4 y E9 han pasado a tener una abundancia relativa pequeña en *E. globulus*.

3.2.3 *Eucalyptus rudis*.

Los perfiles cromatográficos obtenidos para los extractos acuosos de las maderas de *E. rudis*, tanto los procedentes de Huelva como los de Pontevedra, se caracterizan por

TABLA V.3-2 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de madera de *E. globulus*.

Elagitanino	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	4	1	2	1	1	1	1	1	1
5	2	2	2	4	6	0	1	1	0	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	16	22	19	20	24	8	10	16	9	15
8	7	6	10	9	10	1	3	5	3	7
9	3	5	3	5	2	5	6	7	7	7
10	6	3	3	1	1	0	2	3	2	0
11	12	11	8	13	7	28	14	16	28	21
12	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
13	5	5	6	5	5	1	2	1	3	1
14	28	18	17	28	20	36	39	39	44	44
15	1	0	1	0	1	0	0	1	0	4
16	18	15	23	12	23	20	19	9	3	0
17	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
18	0	4	3	0	0	0	2	0	0	0
19	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. EG= *E. globulus*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

su extremada pobreza en taninos, especialmente proantocianidinas. Como se puede observar en las figuras V.3-7a y V.3-8a, son escasos los picos que han presentado un espectro con máximo de absorción a 270-280 nm, a los que se ha podido asignar la estructura de proantocianidinas. Es de destacar, que la línea base en estos cromatogramas de *E. rudis*, presenta un espectro base con un máximo de absorción alrededor de 270 nm, indicativo de la presencia de proantocianidinas, posiblemente poliméricas y no resueltas en picos en el cromatograma. Como particularidad a señalar, es que la mayoría de las proantocianidinas de *E. rudis* presentan un espectro UV con el máximo de absorción a 275-280 nm (fig. V.3-9c). También, es de señalar que, en los primeros minutos del cromatograma, se han detectado además de ácido gálico otros compuestos derivados de éste, ya que presentan un espectro de absorción UV idéntico al de dicho ácido gálico.

En cuanto a la composición de los taninos hidrolizables (fig. V.3-7b y V.3-8b, y tabla V.3-3), en esta especie se vuelve a observar la misma composición cualitativa que en *E. camaldulensis* y *E. globulus*, aunque aquí se han obtenido menor variedad de formas moleculares de elagitaninos y, además se dan importantes diferencias cuantitativas, respecto de las otras dos especies. En *E. rudis*, el pico mayoritario ha resultado ser el E4, pico de pequeña abundancia relativa en *E. globulus* y de intensidad muy variable en *E. camaldulensis*. Los elagitaninos E9 y E11 también presentan una abundancia relativa equiparable a la obtenida en *E. camaldulensis* para el primero y en *E. camaldulensis* y *E. globulus* para el segundo.

3.2.4 Análisis numérico.

Análisis univariante. En la tabla V.3-4, se recoge el estudio descriptivo y el análisis de varianza realizado para cada uno de los elagitaninos, detectados en los extractos de madera de *Eucalyptus spp.* De los resultados obtenidos se puede deducir una mayor influencia del factor especie respecto del factor procedencia en la composición en

TABLA V.3-3 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de madera de *E. rudis*.

Elagitanino	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	2	1	1	1	1	0	0	0
4	37	48	48	23	28	33	33	30	12
5	2	2	3	0	3	1	1	2	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2	1	1	1	3	2	3	2	2
8	3	3	7	7	18	8	8	3	9
9	22	25	9	17	5	12	17	20	14
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	17	14	13	17	7	26	25	30	37
12	5	1	6	14	8	3	5	4	0
13	4	2	7	7	19	6	1	1	6
14	2	1	1	4	1	2	2	2	7
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	3	2	4	10	8	5	4	5	12
17	0	0	0	0	0	0	0	1	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. ER= *E. rudis*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

TABLA V.3-4 Análisis univariante de los elagitaninos de los extractos de madera de *Eucalyptus spp.*

	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie		Procedencia		Inter.
	H			P			H			P			H			P							
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	Dif.sig./Agrup.	Dif.sig./Agrup.			
E1	0	0	--	8,5	2,2	26	0	0	--	0	0	--	0	0	--	0	0	--	***	GR-C	***	H-P	***
E2	1,5	1,6	107	0,7	0,2	32	0	0	--	0	0	--	0	0	--	0	0	--	**	RG-C	NO	-HP-	NO
E3	0	0	--	0	0	--	0	0	--	0	0	--	1,4	0,7	46	0,2	0,4	200	***	CG-R	***	P-H	***
E4	7,4	3,0	41	17,5	1,3	8	1,9	1,4	73	1,0	0,3	27	36,9	11,4	31	27,0	10,0	37	***	G-C-R	NO	-PH-	**
E5	1,0	0,8	75	1,8	0,6	36	3,2	1,6	51	0,7	0,5	75	2,0	1,31	65	1,1	0,7	68	NO	-CGR-	NO	-PH-	**
E6	0,5	0,7	137	0	0	--	0	0	--	0	0	--	0	0	--	0,1	0,1	116	NO	-GRC-	NO	-PH-	NO
E7	9,3	7,0	76	9,5	3,4	36	20,1	3,1	15	11,7	3,6	31	1,5	0,9	62	2,3	0,4	18	***	R-C-G	NO	-PH-	**
E8	12,0	4,8	40	5,3	4,6	86	8,5	1,9	22	3,6	2,2	62	7,5	5,9	79	7,1	2,6	37	NO	-GRC-	**	P-H	NO
E9	17,4	12,8	74	9,7	5,7	59	3,6	1,3	36	6,2	1,1	17	15,6	8,4	54	15,7	3,5	22	NO	-GRC-	**	P-H	NO
E10	0,5	1,0	224	0	0	--	2,9	2,1	74	1,3	1,2	93	0	0	--	0	0	--	***	RC-G	NO	-PH-	NO
E11	10,3	7,9	76	24,8	6,8	28	10,0	2,7	27	21,2	6,7	32	13,4	4,1	31	29,5	5,7	19	*	G-C-R	***	H-P	NO
E12	6,0	4,1	68	2,9	0,8	26	0,8	0,4	50	0	0	--	6,8	4,8	71	2,9	2,0	70	***	G-CR	**	P-H	NO
E13	7,2	3,4	47	11,0	7,6	70	5,1	0,6	11	1,7	0,8	47	7,7	6,7	87	3,7	2,8	76	**	G-R-C	NO	-PH-	NO
E14	12,8	6,2	48	2,2	0,8	38	22,2	5,4	24	40,4	3,4	8	1,6	1,3	79	3,3	2,7	82	***	R-C-G	NO	-PH-	***
E15	0	0	--	0,5	0,7	141	0,7	0,5	69	1,0	1,6	169	0	0	--	0	0	--	*	R-C-G	NO	-PH-	NO
E16	12,2	4,7	39	5,5	1,7	31	18,2	5,0	27	10,2	8,9	87	5,4	3,1	57	6,8	3,4	50	**	R-C-G	NO	-PH-	NO
E17	0,2	0,5	224	0	0	--	0,4	0,8	144	0	0	--	0	0	--	0,2	0,3	121	NO	-CRG-	NO	-PH-	NO
E18	1,1	1,4	127	0	0	--	1,4	2,0	138	0,5	1,1	224	0	0	--	0	0	--	NO	-RCG-	NO	-PH-	NO
E19	0,7	0,8	119	0	0	--	0,8	1,1	138	0,3	0,7	224	0	0	--	0	0	--	NO	-RCG-	NO	-PH-	NO

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza. 10% \geq * \geq 5%, 5% \geq ** \geq 1%, 1% \geq ***. x= media. σ = desviación estándar. CV= coeficiente de variación. C= *E. camaldulensis*. G= *E. globulus*. R= *E. rudis*. H= Huelva. P= Pontevedra. Ei= elagitanino.

elagitaninos. Así, de los 19 elagitaninos analizados, 12 de ellos han presentado diferencias significativas entre las especies *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*, mientras que sólo 6 han sido significativamente diferentes entre las dos procedencias Huelva y Pontevedra, englobando cada una de ellas las tres especies estudiadas. Por otra parte, como era de esperar, la interacción entre especie y procedencia sólo se ha dado en el caso de 6 elagitaninos, de los 19 analizados.

Análisis multivariante. El análisis multivariante discriminante canónico se ha efectuado tomando como variables aquellos elagitaninos que han presentado diferencias significativas entre especies o entre procedencias, en los análisis univariantes previos. En la tabla V.3-5 se muestra el análisis discriminante canónico, y en la figura V.3-11 la representación canónica, según las funciones discriminantes 1 y 2, para las muestras de madera de *Eucalyptus spp.* Como puede observarse se han obtenido cinco funciones discriminantes, de las cuales las dos primeras explican el 84% de la variación total, estando la primera de las funciones relacionada principalmente con la variación del contenido de los elagitaninos E1, E4, E7, E9, E13 y E16, y la segunda con la variación de E2, E8 y E11 entre otros.

En la representación canónica (fig. V.3-11) se ha obtenido una clara diferenciación entre la especie *E. rudis* (5 y 6) y las especies *E. camaldulensis* (1 y 2) y *E. globulus* (2 y 4), mostrándose en estas últimas una apreciable proximidad entre la población 1 (*E. camaldulensis*, Huelva) y la especie *E. globulus* (3 y 4).

Por otra parte, dentro de cada especie se han obtenido grupos bien diferenciados según la procedencia, aunque se hace evidente un menor distanciamiento de los centros de gravedad de las poblaciones pertenecientes a una misma especie. Como excepción al comportamiento general tenemos las maderas de *E. camaldulensis* procedentes de Pontevedra (2) que se diferencia considerablemente, no sólo de las pertenecientes a las

TABLA V.3-5 Análisis discriminante canónico para los elagitaninos de los extractos de madera de *Eucalyptus spp.*

Análisis discriminante			
Función discriminante (FD)	Autovalor	Porcentaje relativo	Correlación canónica
1	100,57282	64,41	0,99507
2	30,09093	19,27	0,98379
3	12,74469	8,16	0,96294
4	9,24805	5,92	0,94996
5	3,49113	2,24	0,88167

Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes					
Variable	FD1	FD2	FD3	FD4	FD5
E1	1,58630	0,18035	0,00421	0,02067	0,01952
E2	0,61106	1,02971	1,60339	-0,91459	-0,25745
E3	-0,23214	-0,59659	0,41501	0,22447	0,49265
E4	2,26437	-1,20564	0,55822	-0,57316	0,59807
E7	2,00678	-0,79741	-1,10091	-1,09136	1,00064
E8	-1,39444	-1,73005	-0,98220	-1,53983	-0,50713
E9	3,00457	0,52312	0,25446	-1,79052	0,45324
E10	0,10266	-0,65903	-0,87822	-0,34593	0,47350
E11	1,07453	-1,98651	-1,12912	-0,32153	-0,08147
E12	0,72490	-0,51230	0,31816	-0,07722	0,68287
E13	4,46891	0,83052	1,19504	-0,20884	0,76333
E14	0,91433	0,76332	0,91629	0,01946	0,23000
E15	0,68500	0,08090	0,08386	0,40504	0,11820
E16	1,67058	-0,39660	0,14766	-0,68854	0,60023

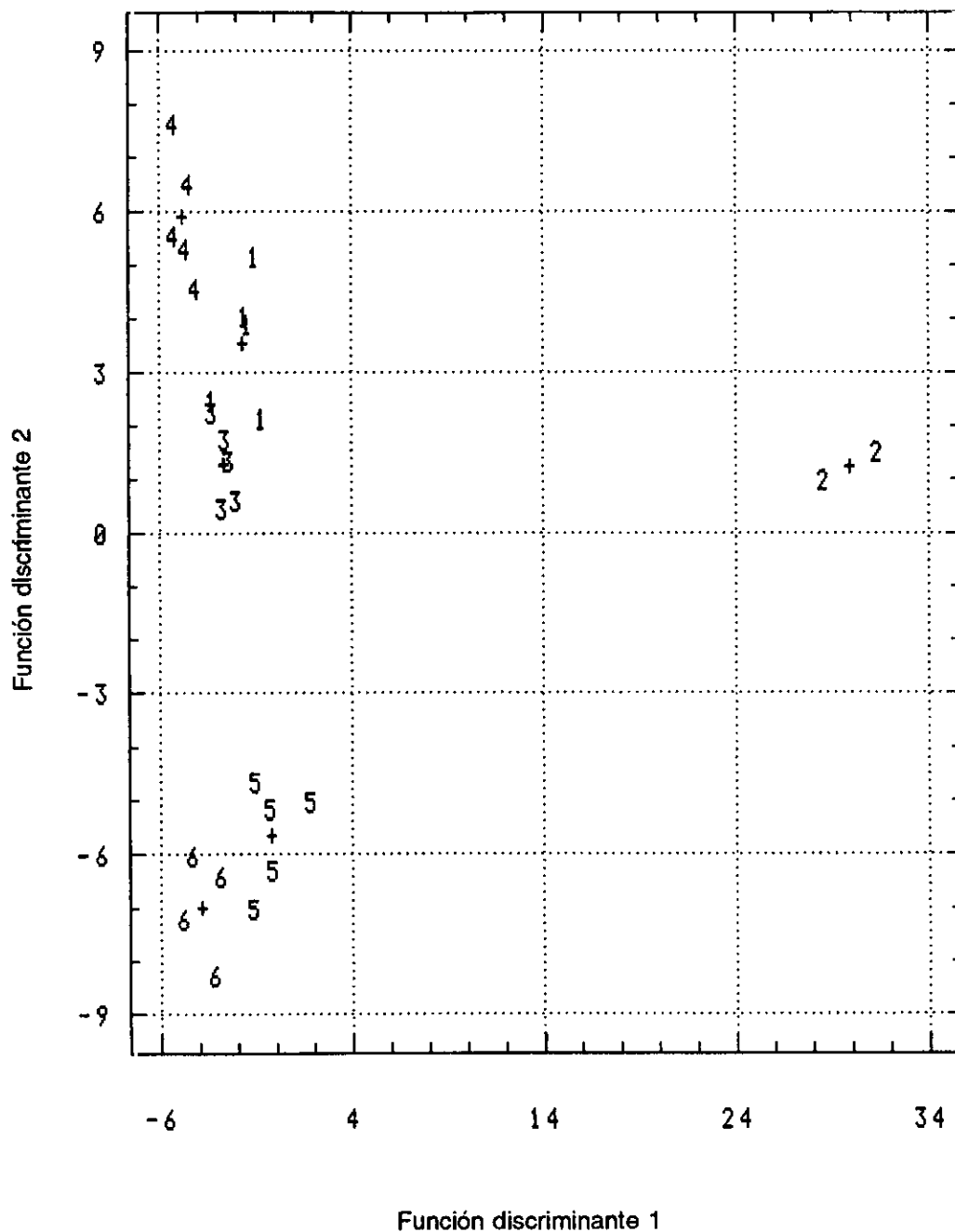


FIGURA V.3-11 Análisis discriminante canónico para los elagitánicos de los extractos de madera de *Eucalyptus* spp. 1= *E. camaldulensis*, Huelva. 2= *E. camaldulensis*, Pontevedra. 3= *E. globulus*, Huelva. 4= *E. globulus*, Pontevedra. 5= *E. rudis*, Huelva. 6= *E. rudis*, Pontevedra.

otras dos especies, sino también de las de su misma especie pero de diferente procedencia.

3.2.5 Conclusiones.

- 1- Los extractos de madera de *Eucalyptus spp.* están compuestos principalmente por proantocianidinas y elagitaninos, caracterizándose las especies *E. camaldulensis* y *E. globulus* por presentar una amplia variedad y gran riqueza de formas moleculares de proantocianidinas y elagitaninos, frente a la especie *E. rudis*, la cual se puede considerar pobre en dichos compuestos.
- 2- Considerando el grupo de los elagitaninos, las maderas de *E. globulus* han contenido una mayor concentración y variedad de dichos compuestos, seguida de las de *E. camaldulensis* y, en último lugar, de las de *E. rudis*.
- 3- La composición en elagitaninos también se ha visto influida por la procedencia de las maderas. En general, las poblaciones de Huelva han resultado ser más ricas en elagitaninos que las de Pontevedra.
- 4- El análisis multivariante desarrollado considerando los elagitaninos de madera, nos ha permitido una clara diferenciación entre las especies *E. rudis*, *E. camaldulensis* y *E. globulus*, así como el establecimiento de grupos según la procedencia. *E. rudis* ha sido la especie que se ha situado más distante respecto de las otras dos, si consideramos los centros de gravedad de cada una de las especies, y, por otra parte, *E. camaldulensis* ha sido la que ha presentado una mayor diferenciación en las poblaciones de distinta procedencia.

3.3 Corteza.

Los análisis de taninos de los extractos acuosos de las cortezas de *Eucalyptus spp.*, se realizaron, como en el caso de las maderas mediante CLAR, según la metodología que se ha descrito en el apartado IV.3.1.2, utilizándose, en particular, las condiciones de elución correspondientes al gradiente nº 1.

En las figuras de V.3-12 a V.3-17, se muestran algunos cromatogramas representativos de las muestras de corteza de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*. Los cromatogramas a han sido obtenidos a una longitud de onda de 270 ± 15 nm, general para la detección de proantocianidinas y elagitaninos, y los cromatogramas b, a la longitud de onda de 365 ± 2 nm, específica de elagitaninos (fig. V.3-18).

Al igual que en las muestras de madera, los cromatogramas obtenidos para las cortezas de *Eucalyptus spp.* han presentado una primera parte en la que eluyen las proantocianidinas, caracterizadas por sus espectros UV con máximos de absorción alrededor de 270 nm. Sin embargo, la mayoría de las proantocianidinas presentes en las cortezas han eluido produciendo picos anchos y sin que se dé una recuperación de la línea base. El resultado final, en la mayoría de las muestras, ha sido la obtención de cromatogramas con una banda ancha debido a la elución en masa de las proantocianidinas poliméricas.

Se ha observado que cuando se somete a análisis por CLAR un extracto bruto de taninos condensados, generalmente, los monómeros y los dímeros se resuelven bien, pero a partir de los compuestos trímeros el número de estructuras moleculares posibles aumenta de tal forma que en los cromatogramas no se observan más que masas de las cuales emergen los compuestos más abundantes (Mueller-Harvey *et al.*, 1987; Putman y Butler, 1989; Escribano-Bailón *et al.*, 1992).

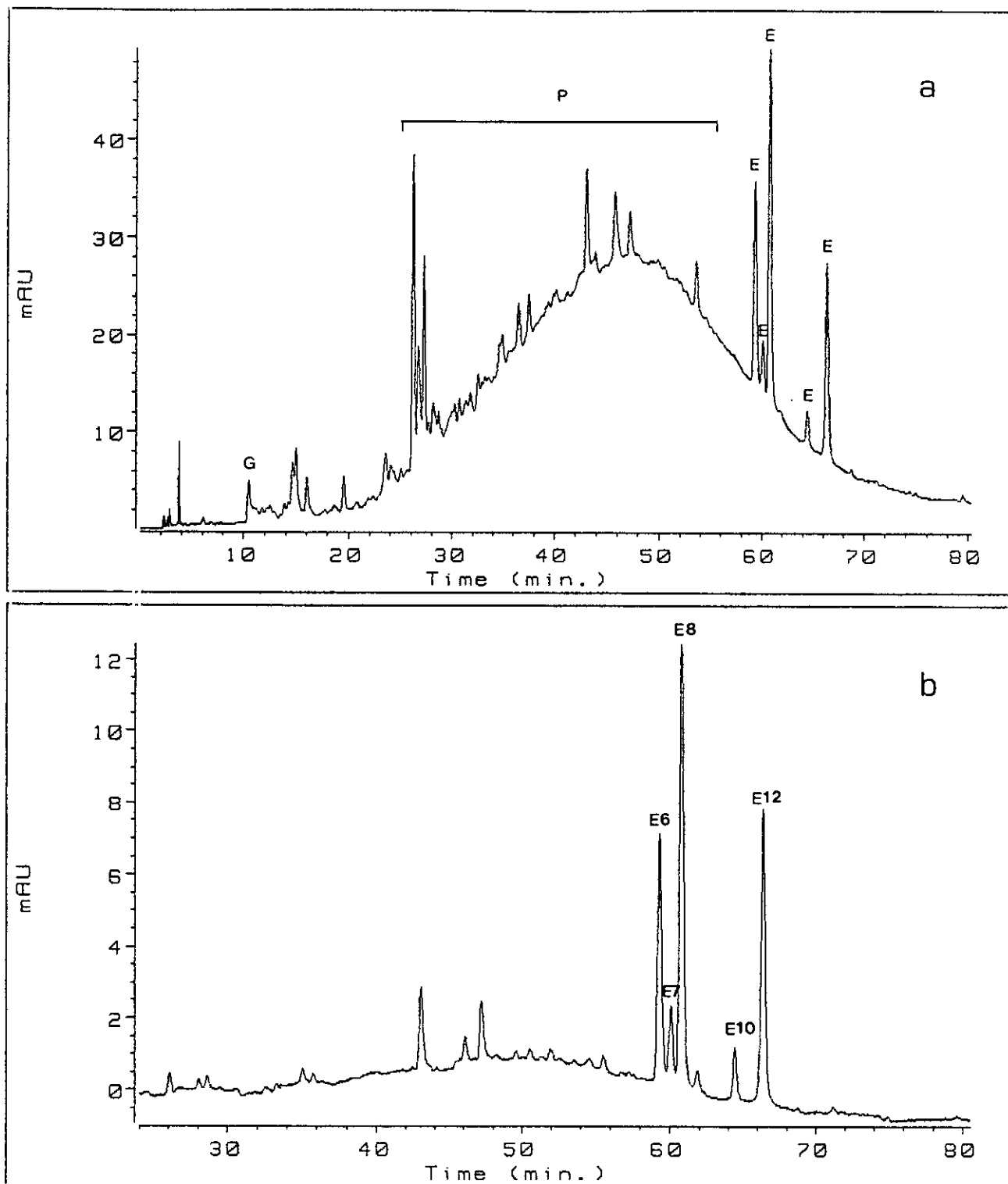


FIGURA V.3-12 Cromatogramas tipo de los extractos de corteza de *E. camaldulensis* de Huelva (HEC5). a: absorbancia 270±15 nm. b: 365±2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

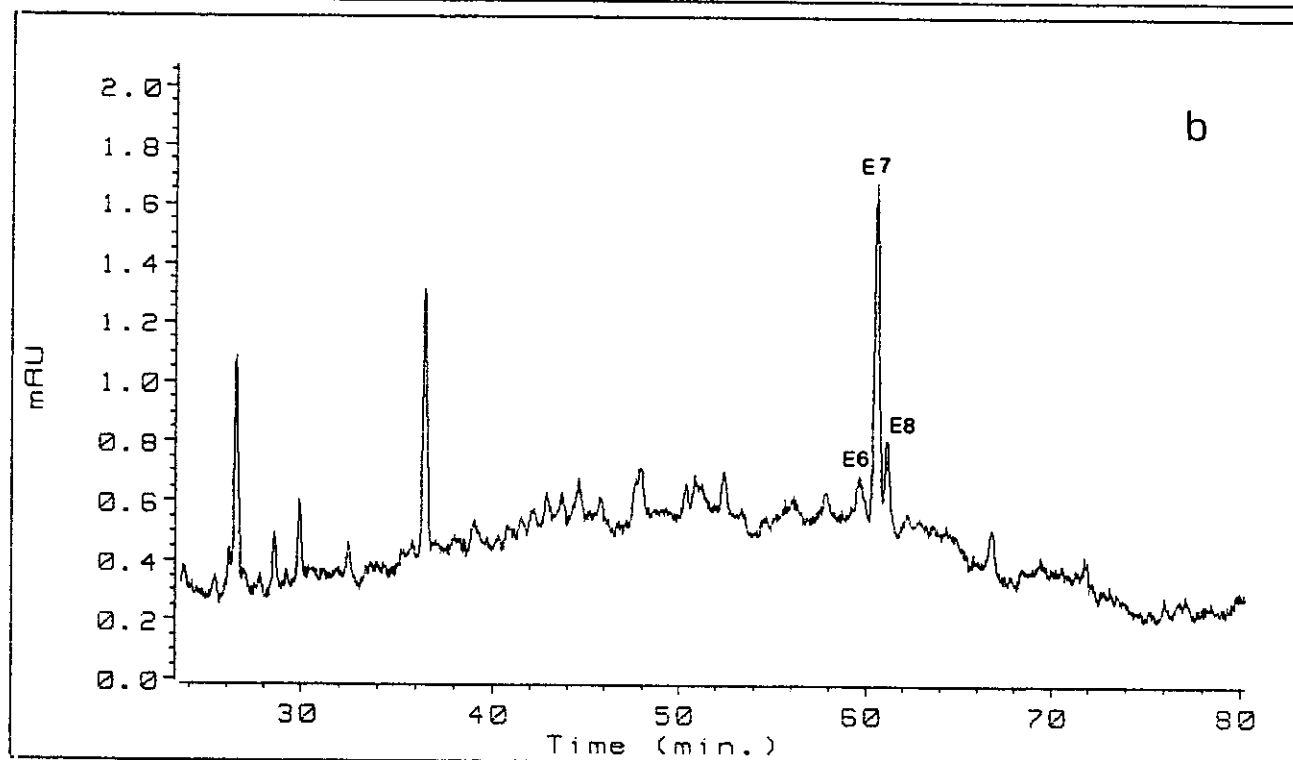
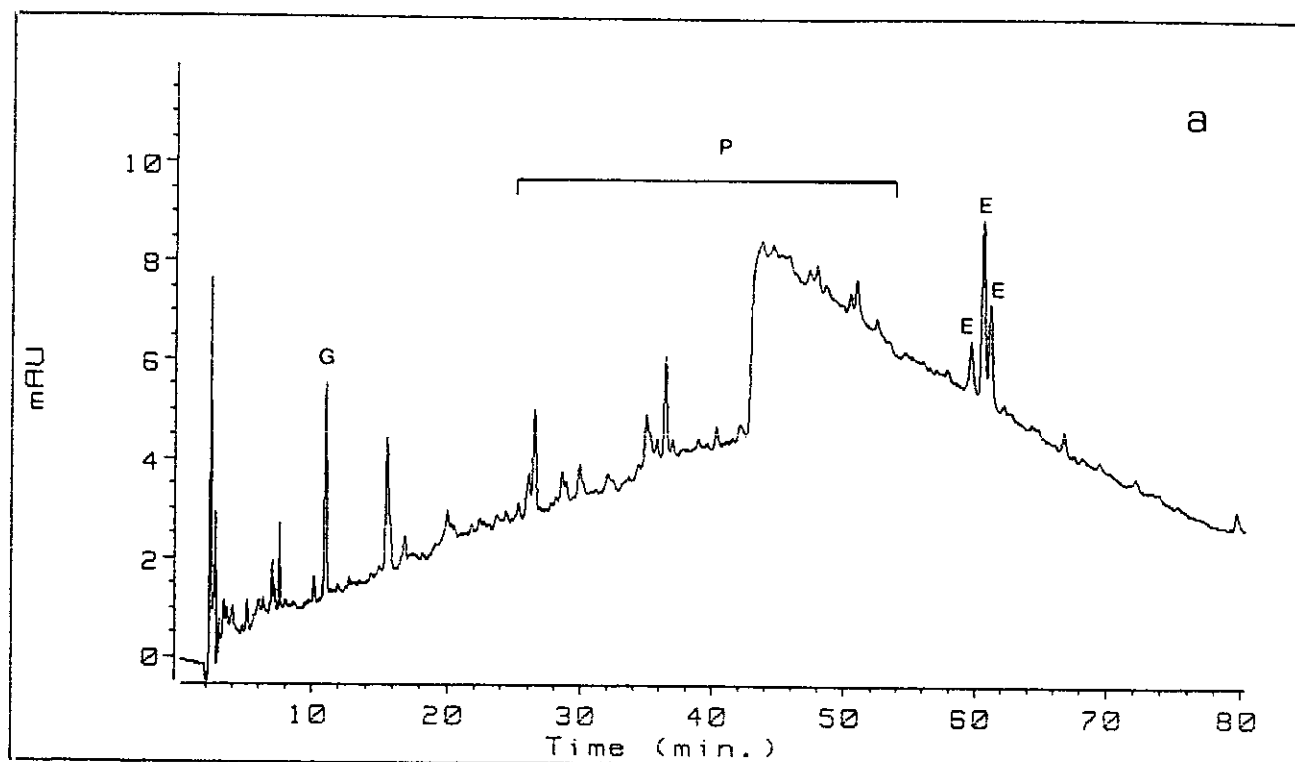


FIGURA V.3-13 Cromatogramas tipo de los extractos de corteza de *E. camaldulensis* de Pontevedra (PEC2). a: absorbancia 270±15 nm. b: 365±2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

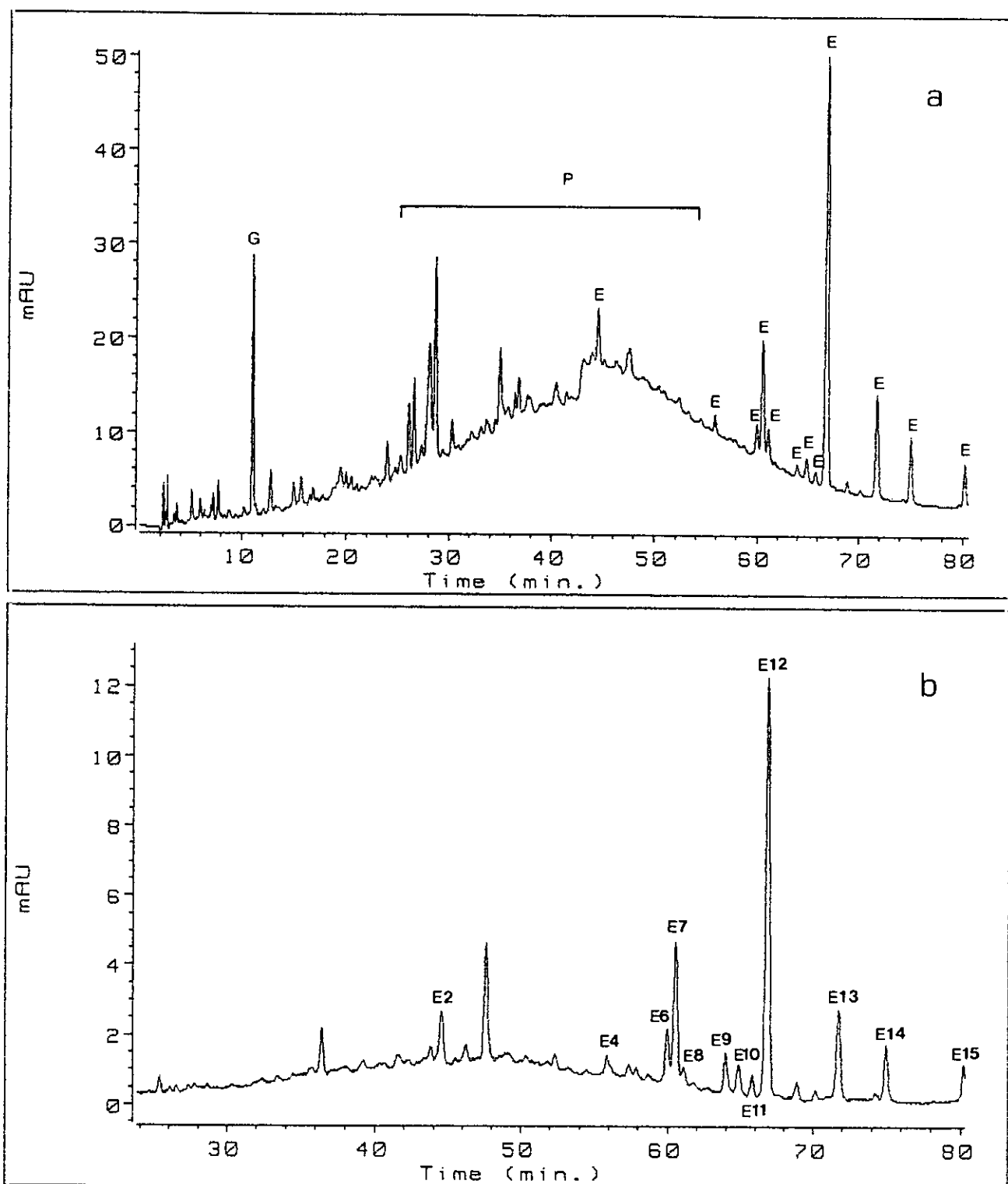


FIGURA V.3-14 Cromatogramas tipo de los extractos de corteza de *E. globulus* de Huelva (HEG2). a: absorbancia 270±15 nm. b: 365±2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

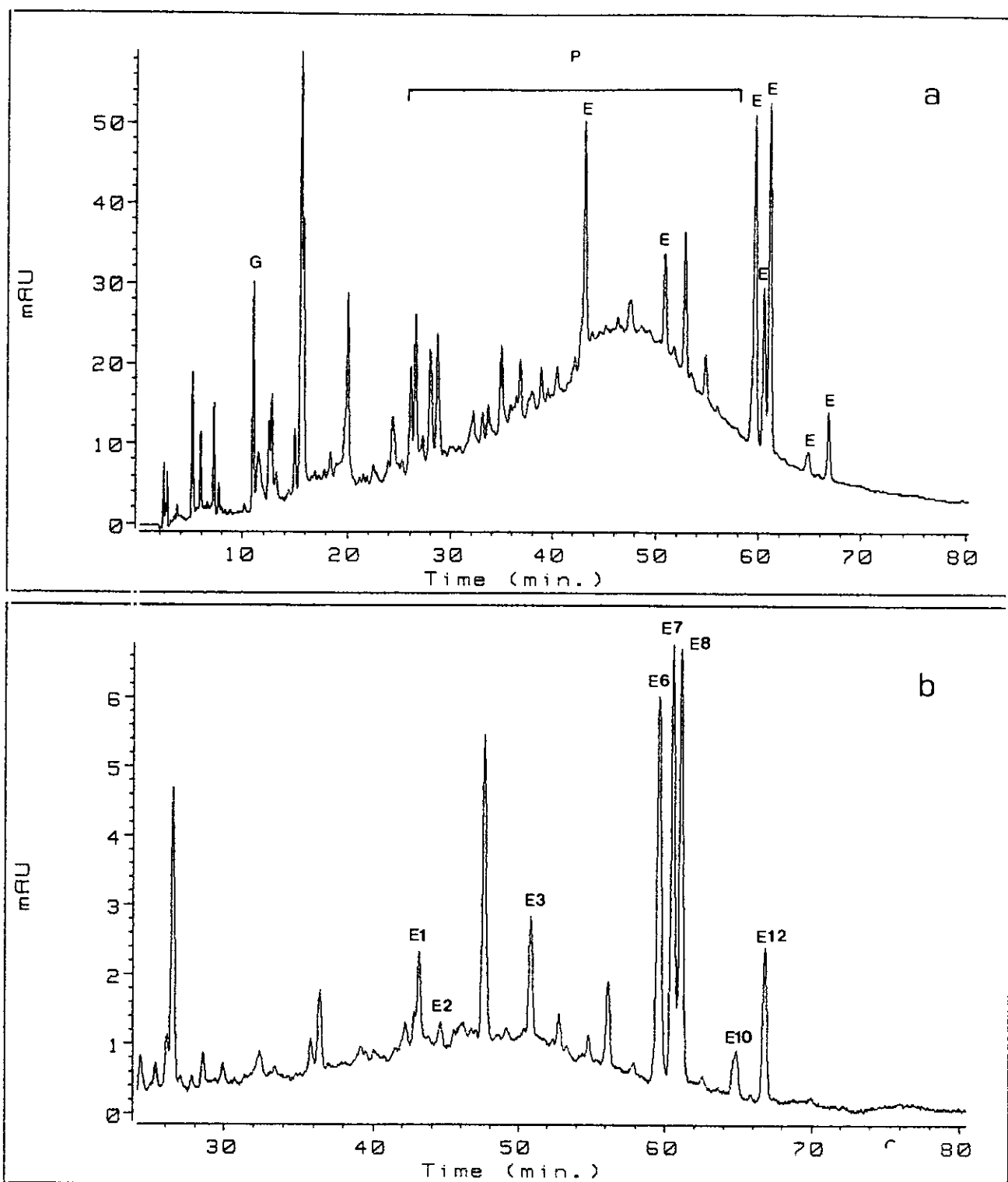


FIGURA V.3-15 Cromatogramas tipo de los extractos de corteza de *E. globulus* de Pontevedra (PEG1). a: absorbancia 270 ± 15 nm. b: 365 ± 2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

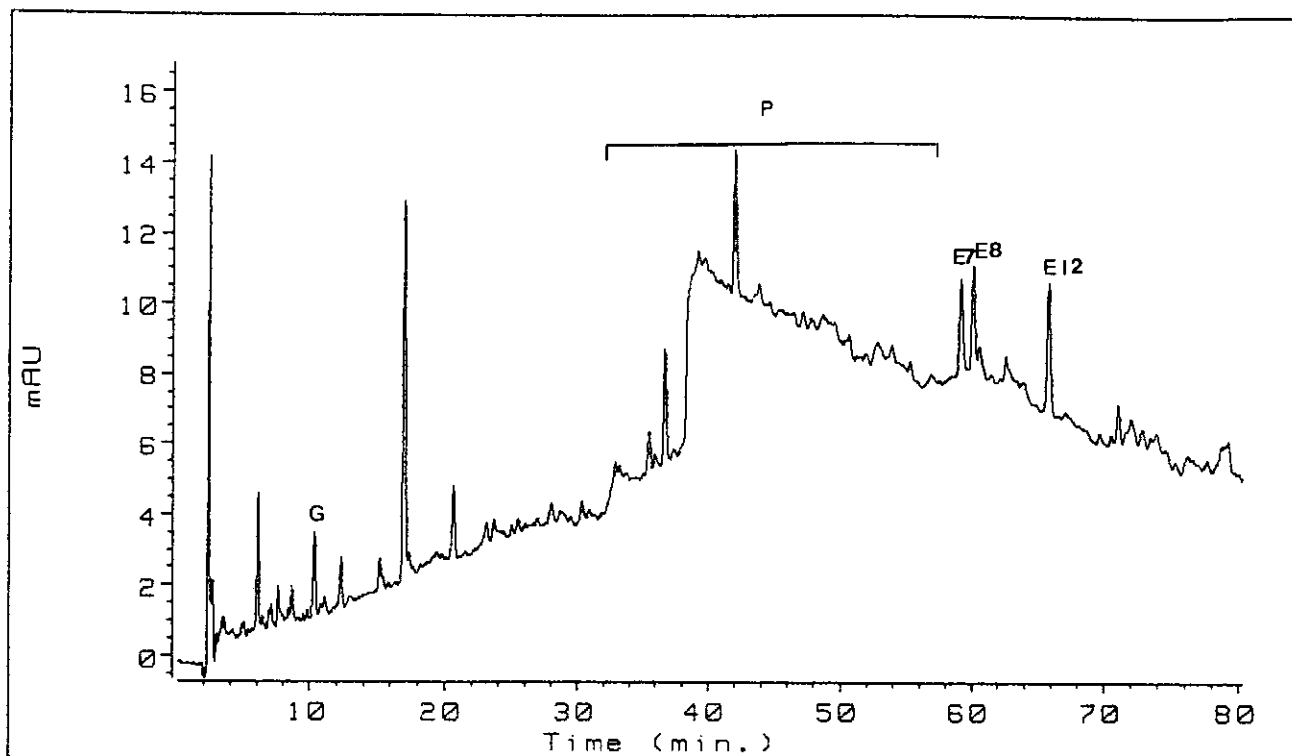


FIGURA V.3-16 Cromatograma tipo de los extractos de corteza de *E. rudis* de Huelva (HER2). Absorbancia 270±15 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

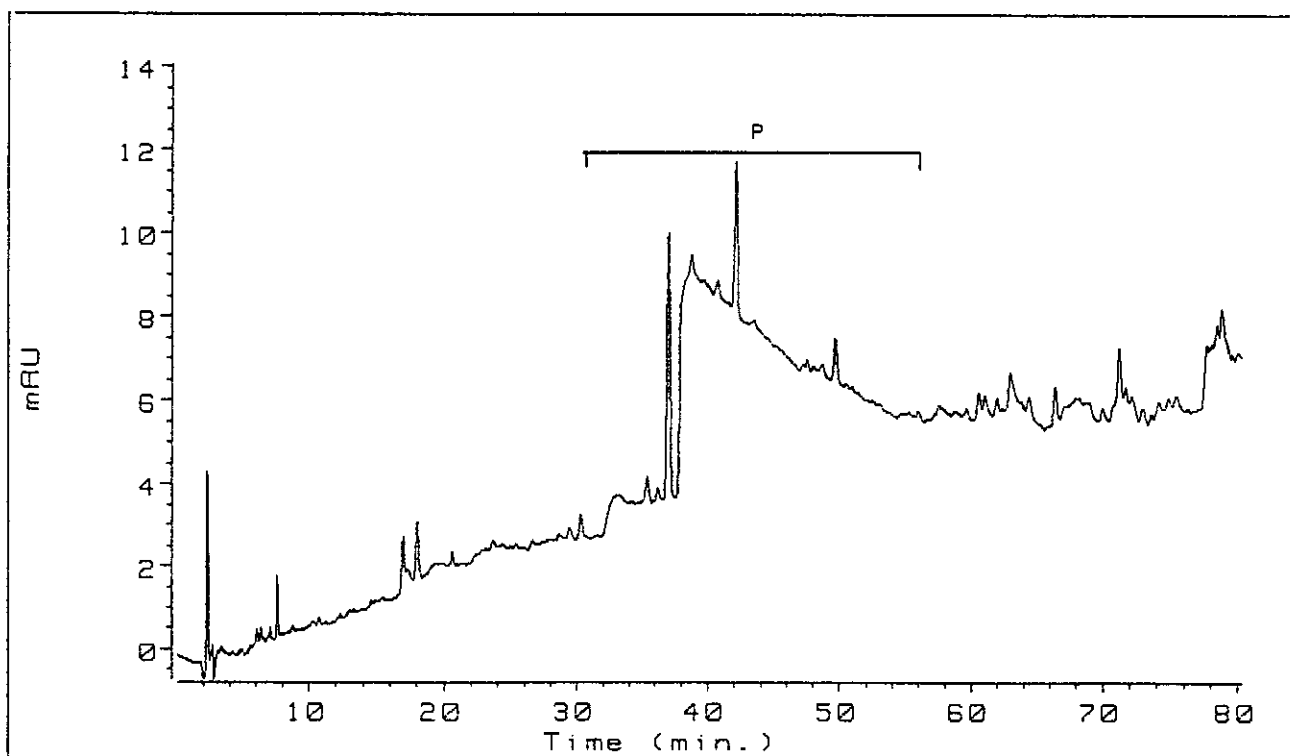


FIGURA V.3-17 Cromatograma tipo de los extractos de corteza de *E. rudis* de Pontevedra (PER1). Absorbancia 270±15 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. P: proantocianidina.

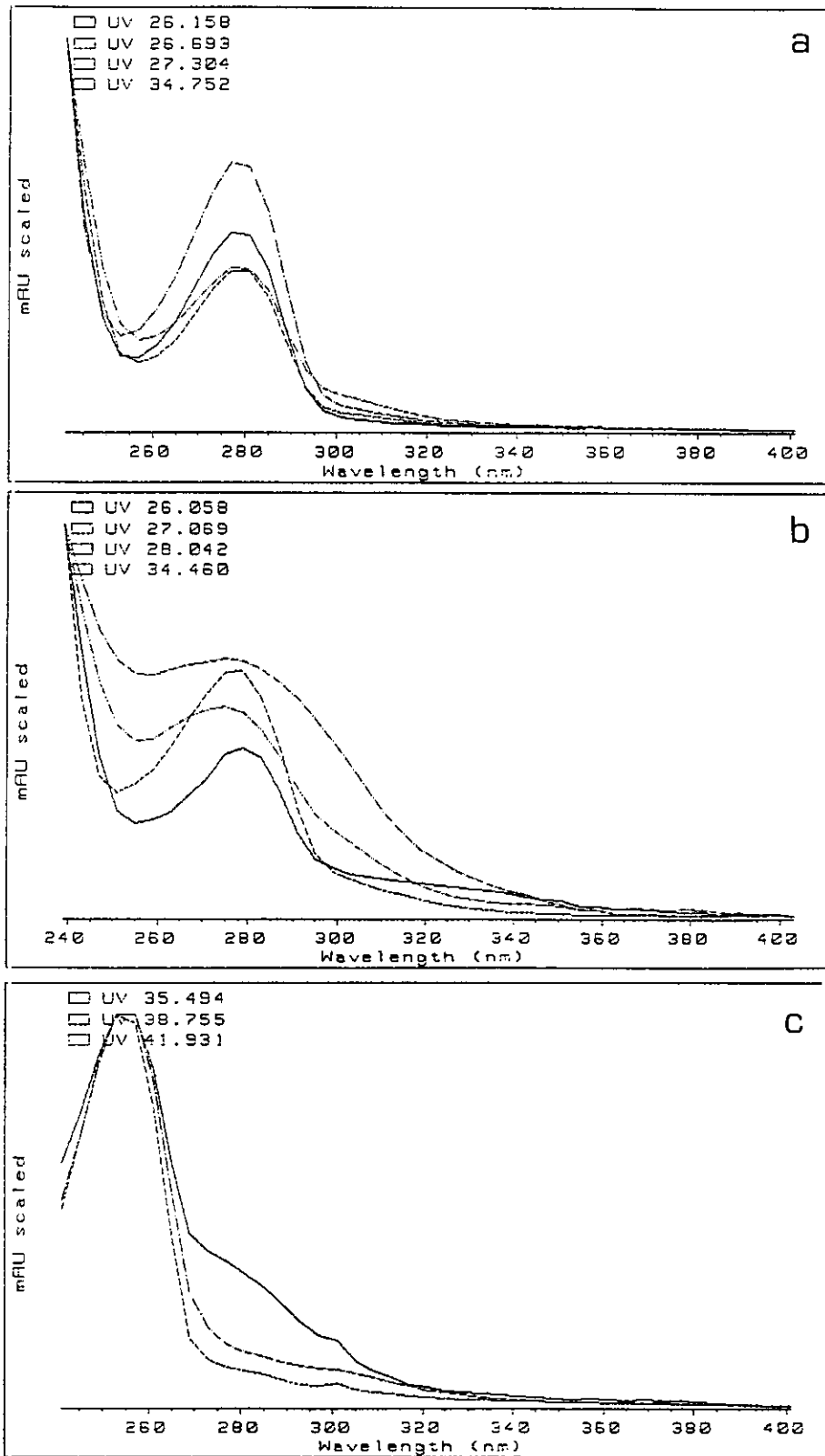


FIGURA V.3-18 Ejemplos de los espectros UV de los picos P de los cromatogramas obtenidos por CLAR (Fig. V.3-12 a V.3-17), de los extractos de corteza de (a) *E. camaldulensis*, (b) *E. globulus* y (c) *E. rudis*.

Así, teniendo en cuenta dichas consideraciones, se puede decir que los cromatogramas de las muestras de corteza de los eucaliptos objeto de este estudio, se caracterizan, en general, por la presencia de una amplia gama de proantocianidinas poliméricas.

Aunque no ha sido posible un análisis espectral detallado de los picos de las proantocianidinas, por la falta de resolución de los cromatogramas, sí se ha puesto de manifiesto una cierta homogeneidad, en cuanto a los espectros UV. Esto indica que, posiblemente, las variaciones en las moléculas de proantocianidinas sean debidas más a variaciones en la longitud de la cadena del polímero y en las estructuras moleculares, que a variaciones en los estados de oxidación o en los patrones de hidroxilación de los anillos heterocíclicos de dichas proantocianidinas. En la figura V.3-18, se presentan unos ejemplos de los espectros UV obtenidos para algunos de los picos de proantocianidinas.

En lo que concierne a los elagitaninos, estos compuestos han sido eluidos, como en el caso de las muestras de madera, a partir del minuto 40, como picos bien resueltos y que emergen en algunos casos de la banda ancha de proantocianidinas. En las figuras de V.3-12b a V.3-15b se han presentado los registros a $365 \pm 2\text{nm}$, en los que se pueden observar los elagitaninos sin la interferencia de las proantocianidinas y sobre los cuales se ha realizado la cuantificación de dichos taninos hidrolizables.

3.3.1 *Eucalyptus camaldulensis*.

En las figuras V.3-12 y V.3-13, se presentan los cromatogramas modelo de los extractos de cortezas de *E. camaldulensis* procedentes de Huelva y de Pontevedra, respectivamente. Ambos cromatogramas difieren considerablemente tanto en la composición en proantocianidinas como en elagitaninos, habiendo resultado las muestras procedentes de Huelva más ricas en los dos tipos de taninos.

Las muestras de corteza procedentes de Huelva (fig. V.3-12) han dado lugar a perfiles cromatográficos típicos de corteza, que reflejan una amplia abundancia de taninos condensados poliméricos. Las formas moleculares más abundantes han dado espectros UV muy semejantes entre sí y cuyo máximo de absorción fue de 280 nm aproximadamente (fig. V.3-18a).

En cuanto a la composición de elagitaninos, en las figuras V.3-12b y V.3-13b, se pueden observar los perfiles cromatográficos obtenidos a 365 ± 2 nm, para las cortezas de *E. camaldulensis* de ambas procedencias y en la tabla V.3-6, la valoración semicuantitativa relativa de cada uno de los elagitaninos detectados, en base al área de los picos cromatográficos y asumiendo un mismo coeficiente de extinción molar para todos ellos.

Como podemos observar, las muestras de corteza de *E. camaldulensis*, en general, presentan menor variedad de elagitaninos que las maderas de la misma especie. En las cortezas se han detectado cinco elagitaninos frente a los más de quince que habían sido puestos de manifiesto en las muestras de madera.

Por otra parte, las cortezas de *E. camaldulensis* procedentes de Huelva y Pontevedra, difieren considerablemente en cuanto a composición en elagitaninos, siendo la corteza procedente de Huelva la que ha presentado mayor variedad de estos compuestos. Así, por ejemplo, el elagitanino E8 ha resultado ser el mayoritario en las muestras procedentes de Huelva mientras que en las de Pontevedra el elagitanino principal ha sido el E7 (tabla V.3-6).

3.3.2 *Eucalyptus globulus*.

Los cromatogramas modelo obtenidos, mediante el análisis por CLAR, de las muestras de corteza de *E. globulus* de Huelva y de Pontevedra, se muestran en las figuras

TABLA V.3-6 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de corteza de *E. camaldulensis*.

Elagitanino	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	8	3	11	16	23	0	13
7	19	12	5	10	6	42	70
8	44	56	57	69	44	0	17
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	4	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	29	29	27	5	23	58	0
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. EC= *E. camaldulensis*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

V.3-14 y V.3-15. En esta especie volvemos a obtener los típicos cromatogramas de cortezas, que se caracterizan por la presencia de una amplia banda de proantocianidinas, resultante de la elución conjunta de los polímeros y emergiendo de ésta, picos de las formas moleculares de proantocianidinas más abundantes y por otra parte, también de elagitaninos, los cuales una vez más eluyen en la segunda mitad del cromatograma a partir del minuto 40.

En el análisis espectral de los picos cromatográficos, se han obtenido diferentes tipos de espectros UV siempre con un máximo de absorción alrededor de 280 nm, como ocurría en las cortezas de *E. camaldulensis*. Sin embargo, en *E. globulus* los espectros han diferido considerablemente en los intervalos de convexidad, tanto en la amplitud como en la longitud de onda a la que se alcanza el máximo de absorbancia. En la figura V.3-18b, se muestran algunos ejemplos de los diferentes espectros UV obtenidos para las proantocianidinas de las cortezas de *E. globulus*.

Considerando, por otra parte, los cromatogramas obtenidos a la longitud de onda de 365 ± 2 nm (fig. V.3-14b y V.3-15b), se puede decir que las cortezas de *E. globulus* han resultado más variadas en formas moleculares de elagitaninos que las cortezas de *E. camaldulensis* y que, por otra parte, no parecen apreciarse diferencias entre procedencias tan acusadas como las encontradas para las cortezas de *E. camaldulensis*. Es preciso señalar que, aunque los cromatogramas presentados en las figuras V.3-14b y V.3-15b difieren considerablemente en cuanto a la composición de elagitaninos, no son muy representativos de cada una de las poblaciones y existe una apreciable variabilidad de cromatogramas dentro de muestras de la misma procedencia. Así, por ejemplo, los picos 13, 14 y 15 no están presentes en los cromatogramas de todas las cortezas de Huelva, mientras que sí lo están en algunas de Pontevedra, como se puede apreciar en la tabla V.3-7.

3.3.3 *Eucalyptus rudis*.

Los cromatogramas obtenidos, del análisis por CLAR de los extractos de las cortezas de *E. rudis*, de los cuales se expone un modelo por cada procedencia en las figuras V.3-16 y V.3-17, se caracterizan por su pobreza tanto en proantocianidinas como en elagitaninos. Una vez más, las proantocianidinas poliméricas eluyen sin resolverse por CLAR, dando un pico ancho del que emerge algún que otro pico, posiblemente debidos

TABLA V.3-7 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de corteza de *E. globulus*.

Elagitanino	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
2	20	6	10	7	2	2	4	0	0	0
3	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
4	0	2	1	2	8	0	0	0	5	2
5	0	0	0	0	0	0	0	2	6	0
6	0	5	1	3	1	25	2	2	4	0
7	23	14	13	12	13	24	22	13	20	41
8	0	1	0	0	1	25	1	1	0	0
9	0	4	1	0	0	0	2	12	1	0
10	2	2	1	19	3	4	8	12	47	28
11	0	2	1	1	1	0	2	3	3	3
12	55	44	45	55	70	9	34	56	15	25
13	0	10	13	0	0	0	14	0	0	0
14	0	6	8	0	1	0	7	0	0	0
15	0	4	6	0	0	0	4	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. EG= *E. globulus*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

a las formas moleculares más abundantes.

En esta especie, las proantocianidinas han presentado espectros UV con un máximo de absorción en general alrededor de 260 nm (fig. V.3-18c), diferenciándose de los espectros UV obtenidos para las proantocianidinas de las cortezas de *E. globulus* y *E. camaldulensis*.

En cuanto a la composición en elagitaninos, como se puede deducir de las figuras V.3-16 y V.3-17 y de la tabla V.3-8, es de destacar que las muestras procedentes de Huelva se caracterizan por la escasa presencia de elagitaninos y las procedentes de Pontevedra por la práctica ausencia de dichos taninos hidrolizables.

TABLA V.3-8 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de corteza de *E. rudis*.

Elagitanino	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	43	0	4	9	8	0
7	57	30	45	31	40	0
8	0	47	3	34	24	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	23	48	26	28	100
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. ER= *E. rudis*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

3.3.4 Análisis numérico.

Análisis univariante. En la tabla V.3-9 se recoge el análisis descriptivo de las variaciones cuantitativas de los elagitaninos de los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.* y además el análisis de varianza, considerando los dos factores especie y procedencia.

Se han analizado 15 elagitaninos, de los cuales 7 aparecen en concentraciones relativas significativamente diferentes en los extractos de corteza de alguna de las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas. Sin embargo, si consideramos la procedencia de la muestra, Huelva o Pontevedra, los contenidos relativos de los elagitaninos E2 y E8 han resultado significativamente diferentes. Así al igual que ocurría en los extractos de las muestras de madera, la composición en elagitaninos de las cortezas de *Eucalyptus spp.* viene condicionada principalmente por la especie y en menor medida por el origen de las muestras.

Análisis multivariante. En el análisis discriminante canónico para los elagitaninos de los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.* se han obtenido cinco funciones discriminantes para el conjunto de los siete elagitaninos seleccionados, según los análisis univariantes previos, explicándose con las dos primeras funciones el 79% de la variación total (tabla V.3-10).

Las variables que han presentado mayores coeficientes para la función discriminante 1, han sido los elagitaninos E11 y E14 mientras que para la función discriminante 2, han sido E7 y E10, lo que significa que estas variables tienen un peso considerable en la función discriminante mencionada (tabla V.3-10).

La representación gráfica de las observaciones y centros de gravedad con respecto a los ejes 1 y 2 se muestran en la figura V.3-19. Se puede observar una tendencia a la

TABLA V.3-9 Análisis univariante de los elagitaninos de los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.*

	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie		Procedencia		Inter.
	H			P			H			P			H			P							
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	Dif.sig./Agrup	Dif.sig./Agrup			
E1	0	0	--	0	0	--	0	0	--	1,0	2,2	224	0	0	--	0	0	--	NO	-RCG-	NO	-HP-	NO
E2	0	0	--	0	0	--	9,1	6,6	72	1,1	1,7	157	0	0	--	0	0	--	***	CR-G	**	P-H	**
E3	0	0	--	0	0	--	0	0	--	1,3	2,8	224	0	0	--	0	0	--	NO	-RCG-	NO	-HP-	NO
E4	0	0	--	0	0	--	2,7	3,3	125	1,5	2,2	151	0	0	--	0	0	--	**	RC-G	NO	-PH-	NO
E5	0	0	--	0	0	--	0	0	--	1,6	2,6	168	0	0	--	0	0	--	NO	-RCG-	NO	-HP-	NO
E6	12,3	7,6	62	6,3	8,9	141	2,1	2,0	95	6,7	10,4	155	12,7	17,5	138	0	0	--	NO	-GRC-	NO	-PH-	NO
E7	10,2	5,5	54	58,0	20,0	36	14,9	4,6	31	24,0	10,5	44	40,6	10,8	27	0	0	--	**	GR-C	NO	-HP-	***
E8	54,0	10,7	20	8,6	12,1	141	0,4	0,5	144	5,5	10,8	198	21,6	20,0	92	0	0	--	***	GR-C	***	P-H	***
E9	0	0	--	0	0	--	1,2	1,8	150	2,8	5,0	178	0	0	--	0	0	--	NO	-RCG-	NO	-HP-	NO
E10	0,8	1,7	224	0	0	--	5,4	7,5	140	19,8	17,7	90	0	0	--	0	0	--	***	RC-G	NO	-HP-	NO
E11	0	0	--	0	0	--	1,0	0,8	84	2,1	1,2	58	0	0	--	0	0	--	***	CR-G	NO	-HP-	NO
E12	27,7	10,2	45	29,1	41,1	141	53,8	10,4	19	27,8	18,7	66	25,0	17,1	69	25,0	50,0	200	NO	-RCG-	NO	-PH-	NO
E13	0	0	--	0	0	--	4,6	6,3	135	2,7	6,1	224	0	0	--	0	0	--	NO	-CRG-	NO	-PH-	NO
E14	0	0	--	0	0	--	2,7	3,6	130	1,5	3,3	224	0	0	--	0	0	--	*	C-R-G	NO	-PH-	NO
E15	0	0	--	0	0	--	1,9	2,8	146	0,7	1,7	224	0	0	--	0	0	--	NO	-RCG-	NO	-PH-	NO

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza. 10%≥*≥5%, 5%≥**≥1%, 1%≥***. x= media. σ = desviación estándar. CV= coeficiente de variación. C= *E. camaldulensis*. G= *E. globulus*. R= *E. rudis*. H= Huelva. P= Pontevedra. Ei= elagitanino.

TABLA V.3-10 Análisis discriminante canónico para los elagitaninos de los extractos de corteza de *Eucalyptus spp.*

Análisis discriminante			
Función discriminante (FD)	Autovalor	Porcentaje relativo	Correlación canónica
1	13,726690	60,15	0,96545
2	4,381902	19,20	0,90233
3	3,065868	13,43	0,86836
4	1,645974	7,21	0,78871
5	0,000139	0,00	0,01178

Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes					
Variable	FD1	FD2	FD3	FD4	FD5
E2	1,42434	0,50989	0,33030	-0,32230	-0,02351
E4	1,24604	0,55132	0,20676	-0,60380	0,09952
E7	-0,56540	0,90442	-0,21786	-0,10016	-0,00712
E8	-0,28216	0,47141	0,98863	-0,03118	0,02668
E10	-0,51955	-0,09519	0,04801	0,60998	-1,33305
E11	0,59214	0,42879	0,34108	0,58773	1,07644
E14	0,10848	0,25368	0,04588	0,00999	-0,66733

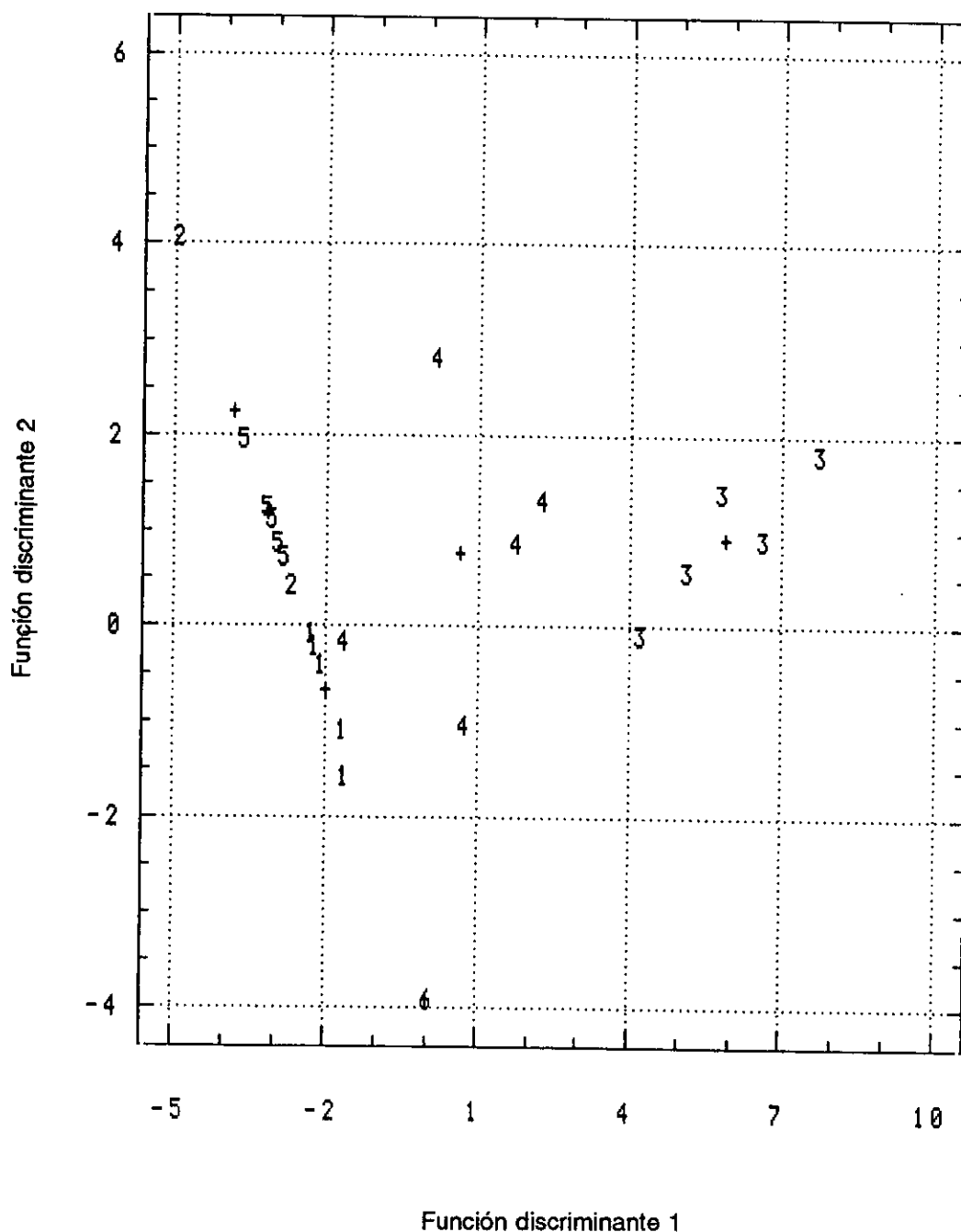


FIGURA V.3-19 Análisis discriminante canónico para los elagitaninos de los extractos de corteza de *Eucalyptus*. 1= *E. camaldulensis*, Huelva. 2= *E. camaldulensis*, Pontevedra. 3= *E. globulus*, Huelva. 4= *E. globulus*, Pontevedra. 5= *E. rudis*, Huelva. 6= *E. rudis*, Pontevedra.

agrupación de las muestras por poblaciones, considerando la especie y la procedencia, no siendo posible, sin embargo, la discriminación de las tres especies. En particular se ha obtenido un notable solapamiento entre *E. camaldulensis* (1 y 2) y *E. rudis* (5 y 6), mientras que la especie *E. globulus* (3 y 4) se encuentra bien diferenciada con respecto al eje canónico 1, el cual dependía principalmente de los elagitaninos E2 y E4.

Por otra parte, es de destacar la considerable influencia de la procedencia en la composición de elagitaninos de la corteza, que se ha observado no sólo en la especie *E. camaldulensis* como ocurría para el caso de la madera, sino también en las especies *E. globulus* y *E. rudis*.

3.3.5 Conclusiones.

- 1- Los extractos de corteza de las tres especies de eucaliptos estudiadas se han caracterizado por su contenido en proantocianidinas poliméricas, que no se resuelven por las técnicas habituales de CLAR en fase inversa.
- 2- En cuanto a la composición en elagitaninos, las cortezas han presentado en general menor cantidad y variedad de elagitaninos que las maderas, siendo, como ocurría en madera, la especie *E. globulus* con diferencia la más rica en estos compuestos.
- 3- El estudio mediante análisis multivariante de la composición en elagitaninos de corteza nos ha llevado a la discriminación de la especie *E. globulus* respecto de *E. camaldulensis* y *E. rudis*, presentando estas dos últimas un importante solapamiento de sus poblaciones y proximidad de sus centros de gravedad. Este tipo de distribución está de acuerdo con los principios de clasificación botánica de las tres especies, ya que *E. camaldulensis* y *E. rudis* pertenecen a la misma

sección, dentro del género *Eucalyptus*, sección *Macrantherae*, concretamente a la subsección *Tereticornes*, mientras que *E. globulus* se clasifica en otra sección diferente, *Macrantherae* (Normales) en la serie *Globulares*, como se había ya descrito en el apartado II.1.1.

3.4 Hojas.

Los resultados del análisis de CLAR (realizados según los métodos del apartado IV.3.1.2, gradiente nº 1), correspondientes a los extractos acuosos de las hojas de *Eucalyptus spp.*, se reflejan en los cromatogramas seleccionados como modelo para cada una de las especies y procedencias estudiadas y recogidos en las figuras V.3-20 a V.3-25.

Como se puede observar en los cromatogramas, se han diferenciado principalmente tres grupos de compuestos: proantocianidinas, elagitaninos y flavonoides, en particular flavonoles, siendo caracterizados por sus espectros UV.

En la primera parte de los cromatogramas (ver figuras a), similarmente a lo obtenido en los correspondientes de madera, han sido resueltos una serie de picos cromatográficos, que se reconocen como proantocianidinas, y que presentan un espectro UV con un máximo de absorción que oscila entre 260 y 280 nm e intervalos de convexidad, que varían también, en lo referente a su amplitud además de en la longitud de onda a la que se presenta el máximo de absorción. En la figura V.3-26a, se muestran algunos ejemplos de dichos espectros UV. Por todo ello, se puede considerar que el conjunto de picos cromatográficos que nos ocupa responde a una amplia variedad de formas moleculares de proantocianidinas, que pueden diferir en el patrón de hidroxilación de las unidades monoméricas que las constituyen y/o en su grado de polimerización.

La segunda parte de los cromatogramas se caracteriza por la abundancia de picos de elagitaninos y flavonoides, estos últimos no detectados ni en madera ni en corteza y por tanto exclusivos de las muestras de hojas. Los flavonoides han presentado espectros UV característicos de flavonoles con dos máximos de absorción a 257-261 nm y 353-357 nm, fácilmente diferenciados de los espectros UV de los elagitaninos, no sólo por las longitudes de onda características de los máximos de absorción sino también por la intensidad relativa del segundo máximo, considerablemente menos intenso en el caso de los elagitaninos (fig. V.3-26b). Por otra parte, estos presuntos flavonoles presentan tiempos de retención propios de los derivados glicosilados de flavonoles.

Los cromatogramas b de las figuras V.3-20 a V.3-25, muestran el registro obtenido a una longitud de onda de 365 ± 2 nm, específica para los elagitaninos y flavonoles, y, así, sin la interferencia de proantocianidinas. Dichos cromatogramas han sido, además, utilizados para la valoración semicuantitativa de ambos compuestos, realizada en el caso de los extractos de las hojas.

3.4.1 *Eucalyptus camaldulensis*.

Las muestras de hojas de *E. camaldulensis* se han caracterizado por presentar una amplia variedad de proantocianidinas y glicósidos de flavonoles. Los elagitaninos también se encuentran presentes, aunque en menor proporción de la encontrada en las maderas y cortezas de la misma especie (fig. V.3-20a y V.3-21a).

Por otra parte, considerando el distinto origen de los árboles muestreados, es de destacar la considerable mayor abundancia de flavonoles presentes en las muestras procedentes de Pontevedra frente a las de Huelva y, además, la diferencia entre los perfiles cromatográficos obtenidos dependiendo de la procedencia (fig. V.3-20 y V.3-21, tablas V.3-11 y V.3-12). Así, de un total de trece picos de flavonoles detectados sólo los

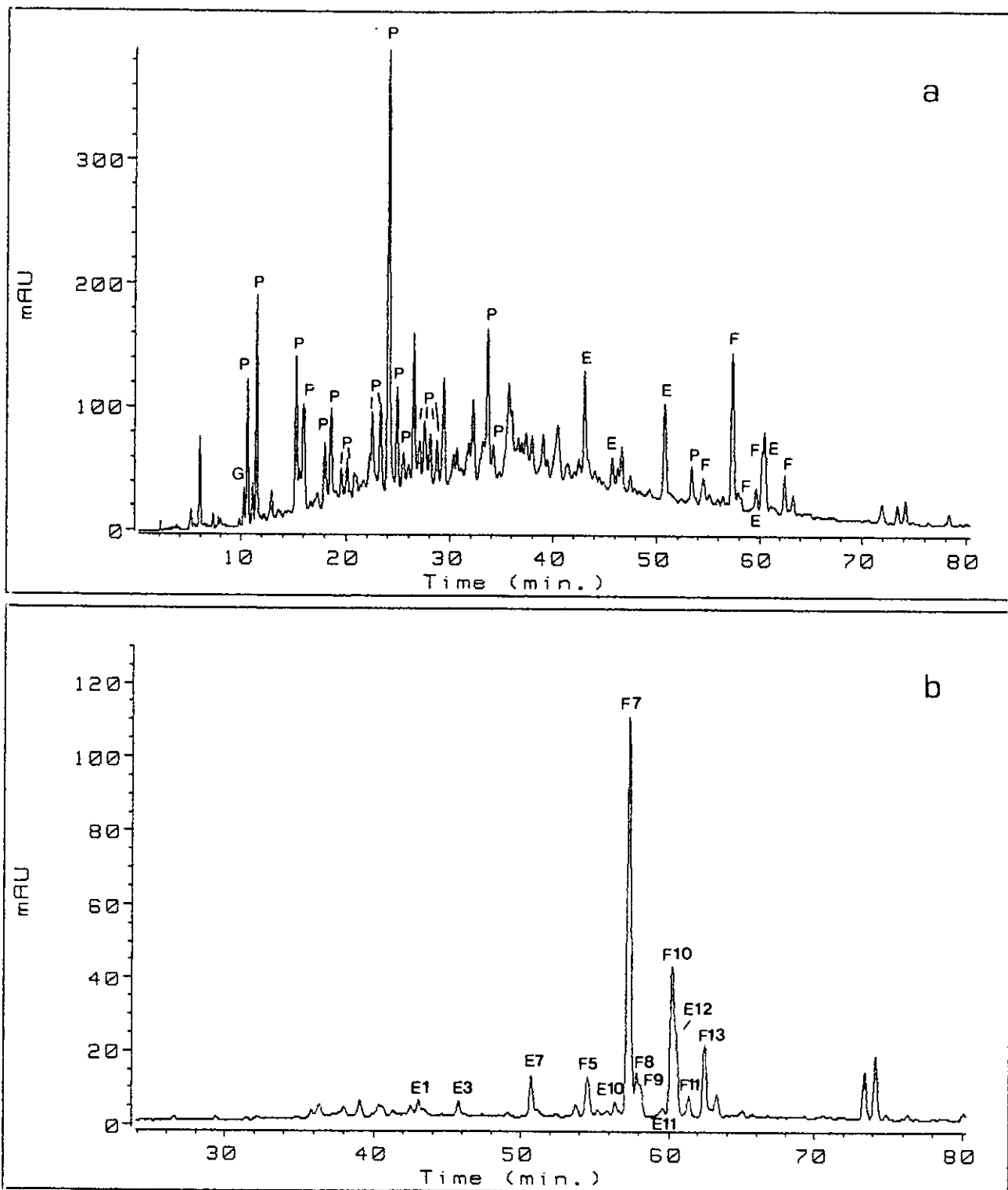


FIGURA V.3-20 Cromatogramas tipo de los extractos de hojas de *E. camaldulensis* de Huelva (HEC2). a: 270 ± 15 nm. b: 365 ± 2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. F: flavonol P: proantocianidina.

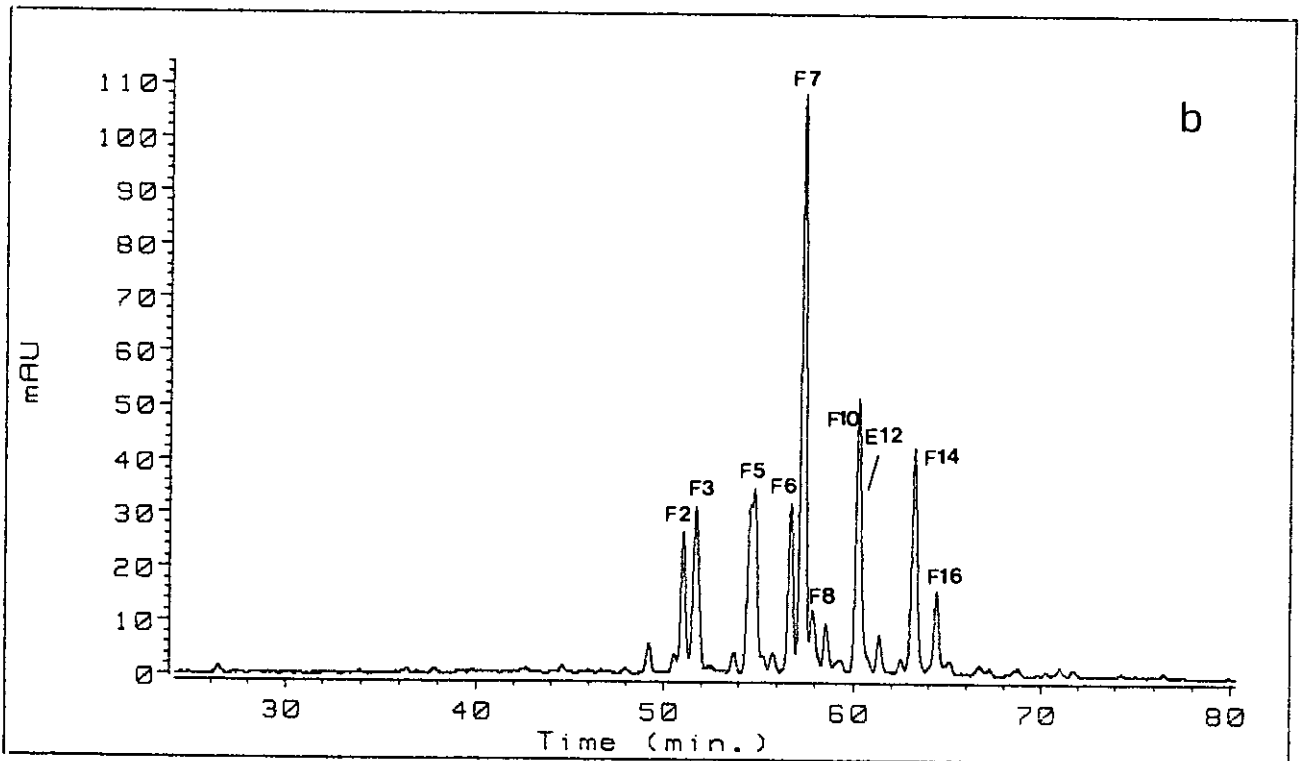
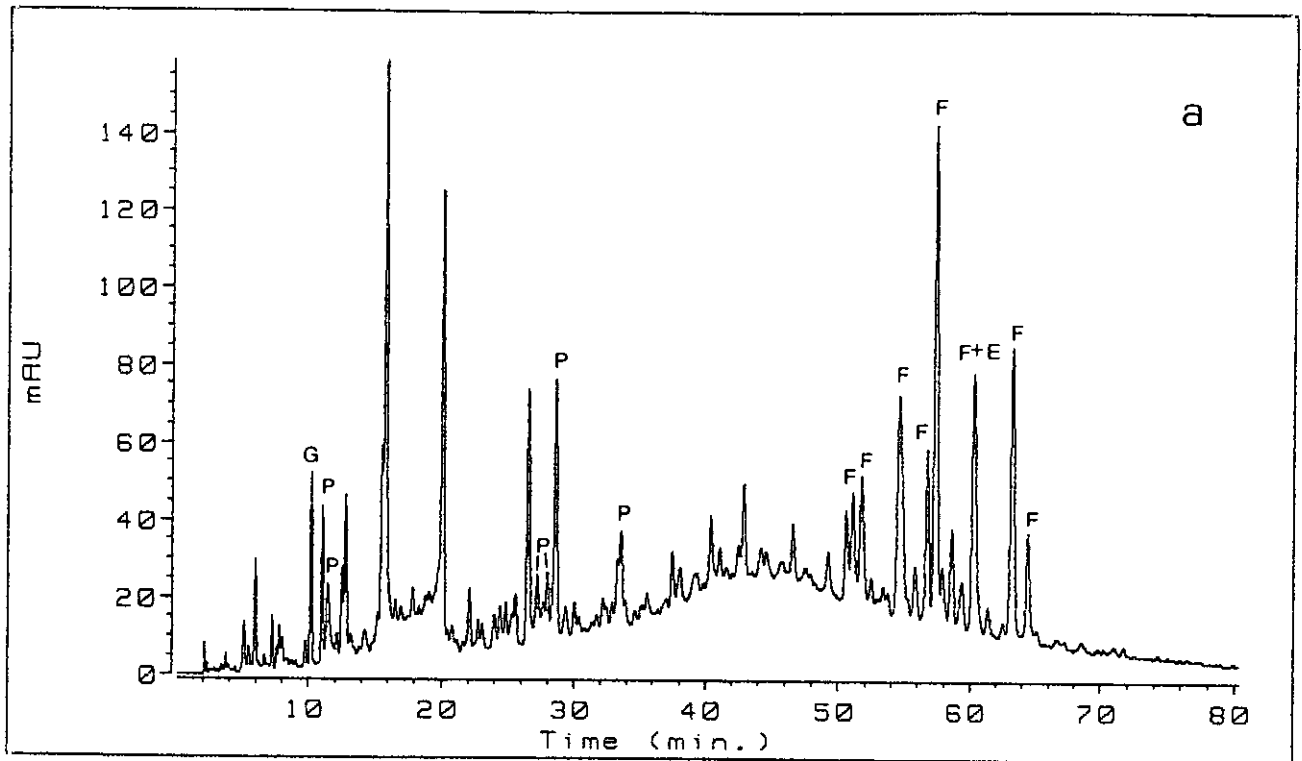


FIGURA V.3-21 Cromatogramas tipo de los extractos de hojas de *E. camaldulensis* de Pontevedra (PEC2). a: 270 ± 15 nm. b: 365 ± 2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. F: flavonol. P: proantocianidina.

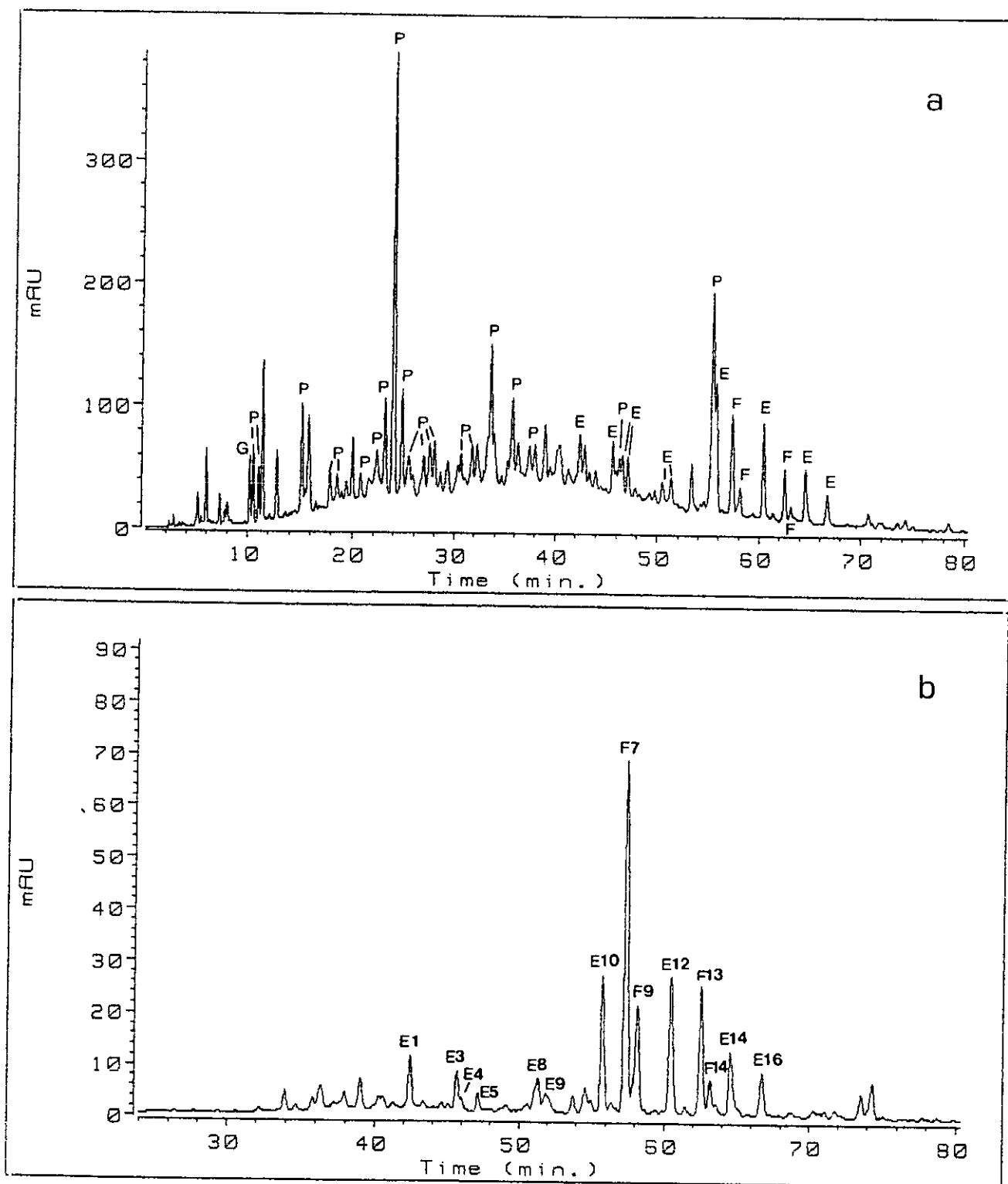


FIGURA V.3-22 Cromatogramas tipo de los extractos de hojas de *E. globulus* de Huelva (HEG2). a: 270 ± 15 nm. b: 365 ± 2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. F: flavonol. P: proantocianidina.

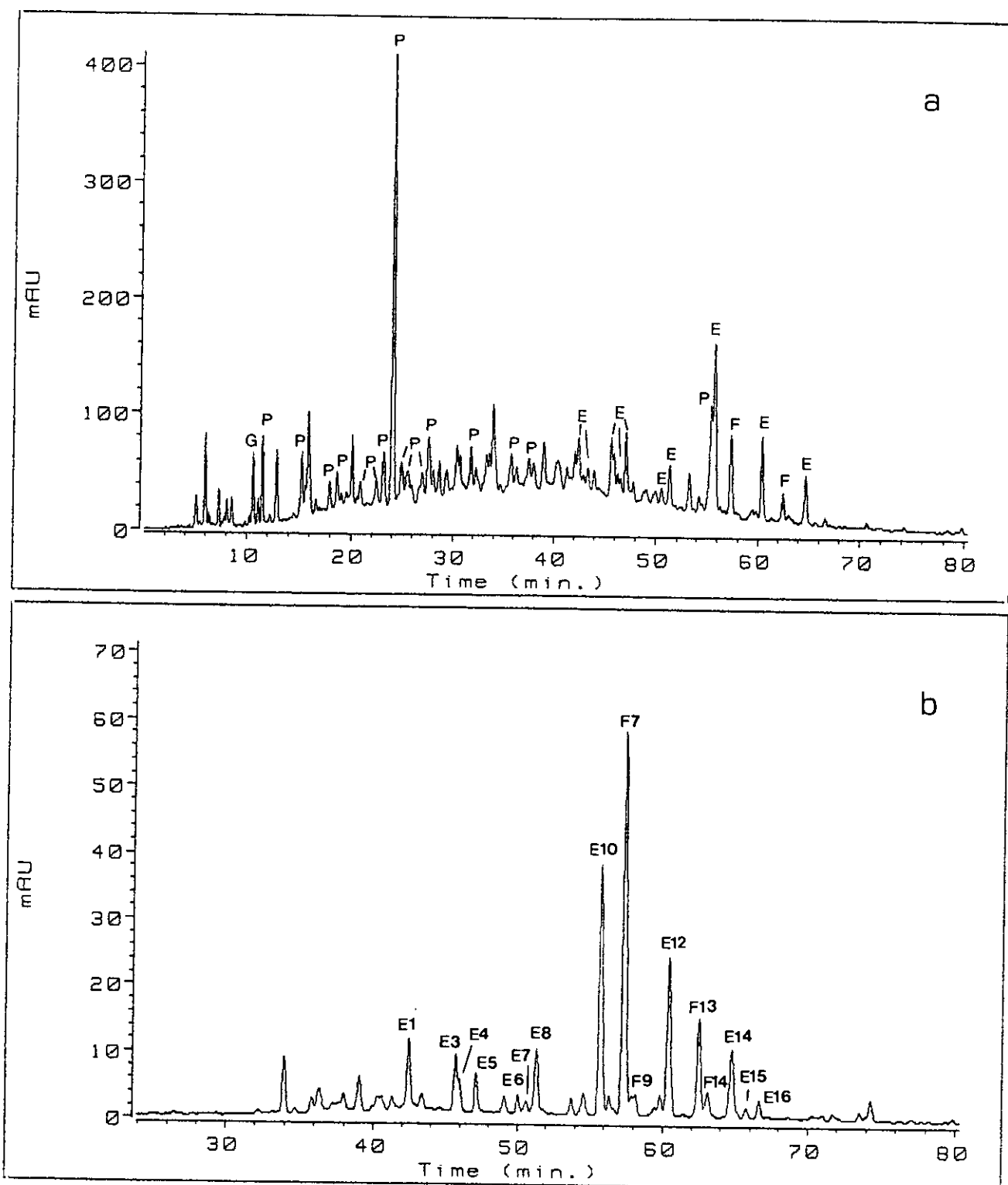


FIGURA V.3-23 Cromatogramas tipo de los extractos de hojas de *E. globulus* de Pontevedra (PEG4). a: 270 ± 15 nm. b: 365 ± 2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. F: flavonol. P: proantocianidina.

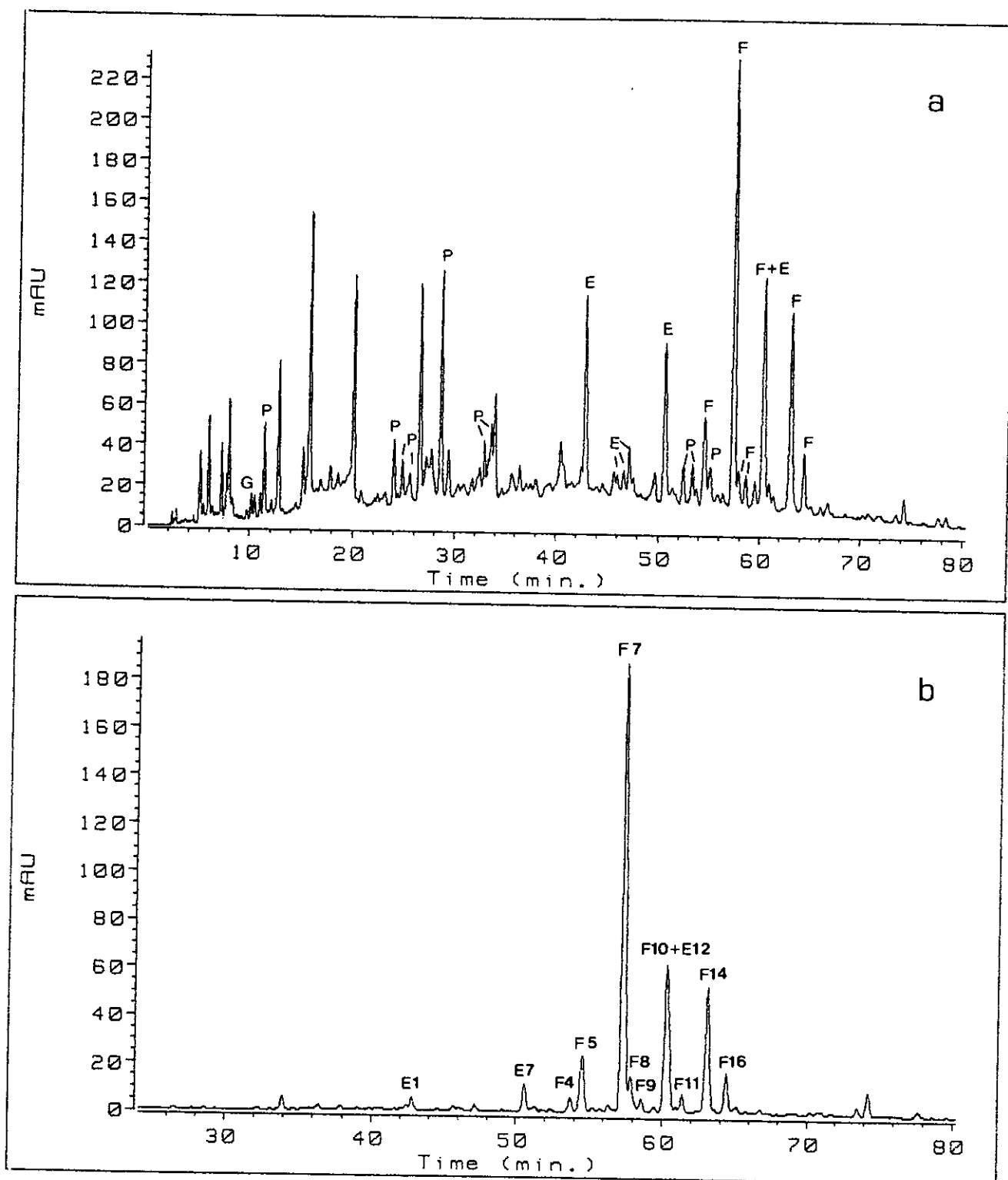


FIGURA V.3-24 Cromatogramas tipo de los extractos de hojas de *E. rudis* de Huelva (HER5). a: 270±15 nm. b: 365±2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. F: flavonol. P: proantocianidina.

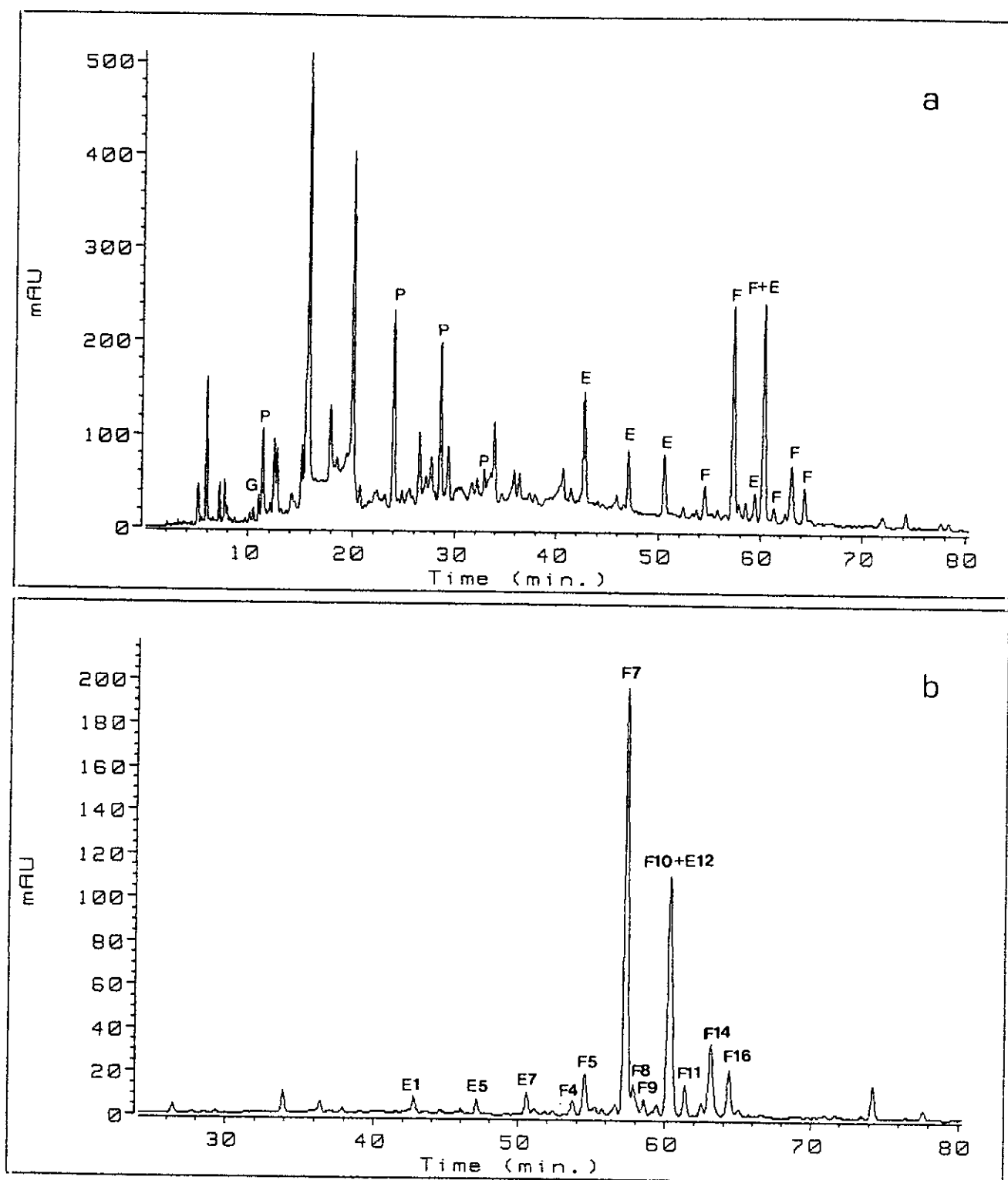


FIGURA V.3-25 Cromatogramas tipo de los extractos de hojas de *E. rudis* de Pontevedra (PER1). a: 270 ± 15 nm. b: 365 ± 2 nm. G: ácido gálico. E: elagitanino. F: flavonol. P: proantocianidina.

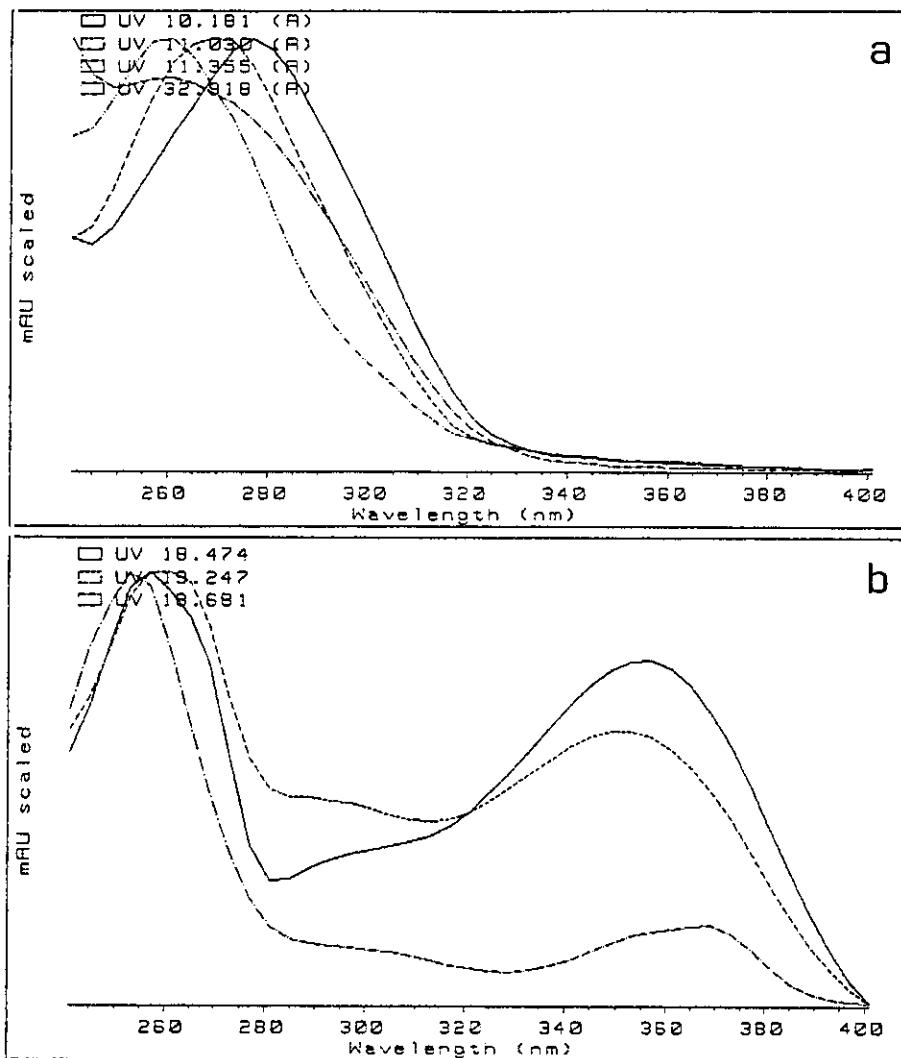


FIGURA V.3-26 Ejemplos de los espectros UV de los picos P (a), E y F (b) de los cromatogramas de CLAR (Fig. V.3-20 a V.3-25), de los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

picos F5, F7, F8, F10 y F14 han sido comunes para las muestras de ambas poblaciones.

En lo que respecta a la composición en elagitaninos, es de destacar que en las muestras de Pontevedra se ha detectado un único pico, el E12, frente a los siete obtenidos en las procedentes de Huelva. Es preciso señalar también, que aunque el

TABLA V.3-11 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de hojas de *E. camaldulensis*.

Elagitanino	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	4	0	5	0	10	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	7	5	7	6	13	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0
7	4	14	10	8	10	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
10	6	3	1	4	8	0	0
11	1	4	1	0	9	0	0
12	73	73	77	82	39	100	100
13	0	0	0	0	0	0	0
14	5	0	0	0	11	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. EC= *E. camaldulensis*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

elagitanino E12 (fig. V.3-20b y V.3-21b) no se ha podido separar cromatográficamente del flavonol F10, sí ha podido ser detectado, debido a la diferencia de sus espectros y a la posibilidad que brinda el detector de diodos utilizado de estudiar la pureza de los picos cromatográficos en base a su espectro UV. Por otra parte, en las hojas de Pontevedra no se descarta la posible existencia de otros picos minoritarios de elagitaninos, enmascarados por la abundancia de los flavonoles (fig. V.3-21b).

TABLA V.3-12 Valoración semicuantitativa por CLAR de los flavonoles de los extractos de hojas de *E. camaldulensis*.

Flavonol	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	0	0	0	0	0	4	0
2	0	0	0	0	0	6	6
3	0	0	0	0	0	7	9
4	0	0	0	0	0	0	0
5	6	6	3	4	4	11	16
6	0	0	0	0	0	7	8
7	52	49	48	64	61	32	26
8	4	5	6	4	13	3	3
9	1	4	0	0	1	0	0
10	28	27	40	20	15	15	15
11	2	0	2	2	4	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	5	9	1	2	3	0	0
14	2	0	1	5	0	11	12
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	4	4

H= Huelva. P= Pontevedra. EC= *E. camaldulensis*.

La cantidad relativa de cada flavonol es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los flavonoles.

3.4.2 *Eucalyptus globulus*.

Al igual que resultó en las muestras de madera y de corteza, las hojas de *E. globulus* se caracterizan por la abundancia y variedad de los elagitaninos presentes, según revelan los perfiles cromatográficos para las dos procedencias estudiadas (fig. V.3-22 y

V.3-23). Además, en ambas poblaciones se presentan cromatogramas muy similares en cuanto a la composición en dicho tipo de polifenoles, siendo las diferencias existentes más bien cuantitativas que cualitativas (fig. V.3-22b y V.3-23b, tablas V.3-13 y V.3-14).

TABLA V.3-13 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de hojas de *E. globulus*.

Elagitanino	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	7	8	5	7	5	4	5	6	10	6
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	4	5	3	3	5	2	2	2	6	2
4	1	1	1	1	3	2	2	2	3	2
5	1	2	1	1	5	9	2	8	4	3
6	0	0	0	0	0	2	0	1	2	1
7	3	2	3	1	2	2	1	3	2	4
8	11	8	6	7	6	4	5	5	9	6
9	0	6	1	4	1	1	1	0	0	1
10	31	22	22	17	26	22	27	22	29	26
11	2	1	3	3	1	2	2	3	3	4
12	15	22	17	27	15	23	18	24	19	20
13	2	2	9	3	3	3	1	1	1	3
14	16	12	19	21	16	11	21	16	10	20
15	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1
16	4	8	9	5	11	11	12	6	2	3

H= Huelva. P= Pontevedra. EG= *E. globulus*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

De la misma manera, la composición en flavonoles resultó ser independiente del origen, según se deduce de los perfiles cromatográficos correspondientes. De los cinco flavonoles detectados en *E. globulus* cuatro han estado presentes tanto en las muestras de Huelva como en las de Pontevedra y, en este tipo de compuestos polifenólicos, las

TABLA V.3-14 Valoración semicuantitativa por CLAR de los flavonoles de los extractos de hojas de *E. globulus*.

Favonol	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	92	54	68	68	63	74	42	43	71	73
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	5	21	17	16	24	7	33	37	4	8
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	2	19	10	12	10	5	10	12	19	12
14	1	6	5	4	3	14	8	4	6	6
15	0	0	0	0	0	0	7	4	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. EG= *E. globulus*.

La cantidad relativa de cada flavonol es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los flavonoles.

diferencias vuelven a ser exclusivamente cuantitativas (fig. V.3-22b y V.3-23b, tabla V.3-14).

3.4.3 *Eucalyptus rudis*.

Los cromatogramas obtenidos para las muestras de hojas de *E. rudis* procedentes de Huelva y de Pontevedra han sido similares, distinguiéndose de los obtenidos para *E. camaldulensis* y *E. globulus* por su bajo contenido en compuestos polifenólicos del tipo proantocianidinas (fig. V.3-24a y V.3-25a).

En lo que se refiere a la composición en elagitaninos y glicósidos de flavonoles (fig. V.3-24b y V.3-25b y tablas V.3-15 y V.3-16), es de destacar la apreciable semejanza entre los cromatogramas obtenidos para las muestras de *E. rudis*, procedentes de Huelva y de Pontevedra (fig. V.3-24b y V.3-25b).

3.4.4 Análisis numérico.

Análisis univariante. En las tablas V.3-17 y V.3-18, se presentan, respectivamente, los análisis factoriales, realizados para cada una de las variables de elagitaninos y de flavonoles de las hojas de *Eucalyptus spp.*

En lo que respecta a los elagitaninos (tabla V.3-17) se han considerado un total de 16 variables, de las cuales prácticamente todas han resultado significativamente diferentes en alguna de las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas. Sin embargo, la influencia del origen en la composición en elagitaninos ha sido considerablemente menor, como ya habíamos visto en la madera y la corteza. Así, en hojas únicamente se obtuvieron cuatro elagitaninos que presentan diferencias significativas para las dos procedencias.

TABLA V.3-15 Valoración semicuantitativa por CLAR de los elagitaninos de los extractos de hojas de *E. rudis*.

Elagitanino	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6	6	9	4	5	4	4	3	2
3	0	0	0	0	0	0	1	2	0
4	0	0	0	0	0	1	1	1	0
5	1	4	6	1	3	3	3	3	3
6	6	12	13	2	12	6	5	3	3
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	2	1	3	6
11	0	0	0	0	0	4	3	3	4
12	86	79	73	93	80	79	81	81	82
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0

H= Huelva. P= Pontevedra. ER= *E. rudis*.

La cantidad relativa de cada elagitanino es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los elagitaninos.

Los resultados de los análisis univariantes para los flavonoles (tabla V.3-18) han sido muy similares a los obtenidos para elagitaninos. De los 16 flavonoles analizados, 13 han presentado diferencias significativas según el factor especie y sólo 7 según el origen.

TABLA V.3-16 Valoración semicuantitativa por CLAR de los flavonoles de los extractos de hojas de *E. rudis*.

Flavonol	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	6	5	3	1	1	1	1	0
3	2	3	1	9	0	0	0	0	0
4	1	1	2	1	1	2	1	2	1
5	8	5	2	8	7	5	4	5	4
6	1	1	0	0	1	0	0	0	0
7	37	50	52	25	44	41	49	50	62
8	3	3	3	10	4	4	3	4	5
9	1	0	0	1	1	2	0	0	0
10	28	20	5	16	19	28	29	24	16
11	3	4	5	5	2	3	4	2	3
12	0	0	0	2	0	0	0	0	0
13	1	1	0	1	0	1	1	2	2
14	7	3	24	9	14	9	5	8	5
15	0	1	0	4	0	0	0	0	0
16	4	1	0	6	4	5	2	3	1

H= Huelva. P= Pontevedra. ER= *E. rudis*.

La cantidad relativa de cada flavonol es expresada como porcentaje del área de cada pico, respecto del total de los flavonoles.

Análisis multivariante. El análisis discriminante canónico, en el caso de las muestras de hojas, se ha aplicado por separado a dos grupos de compuestos químicos, el de los elagitaninos (tabla V.3-19 y figura V.3-27) y el de los flavonoles (tabla V.3-20 y figura V.3-28).

TABLA V.3-17 Análisis univariante de los elagitaninos de los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie	Procedencia	Inter.		
	H			P			H			P			H			P							
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV				Dif.sig./Agrup.	Dif.sig./Agrup.
E1	3,7	4,1	110	0	0	-	6,6	1,2	19	6,1	2,3	38	0	0	-	0	0	-	***	RC-G	NO	-PH-	NO
E2	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	5,9	1,8	31	3,5	1,2	34	***	GC-R	NO	-PH-	**
E3	7,8	3,1	40	0	0	-	4,1	1,2	28	3,0	1,7	58	0	0	-	0,6	0,8	120	***	R-GC	***	P-H	***
E4	0	0	-	0	0	-	1,4	0,8	56	2,3	0,4	18	0	0	-	0,9	0,6	68	***	CR-G	***	P-H	NO
E5	0	0	-	0	0	-	1,8	1,7	94	5,2	3,2	61	8,9	2,0	68	2,9	0,3	11	***	C-RG	NO	-HP-	NO
E6	0	0	-	0	0	-	0	0	-	1,2	0,5	41	9,0	4,6	52	4,2	1,4	34	***	CG-R	NO	-PH-	**
E7	8,2	3,5	38	0	0	-	1,9	0,9	46	2,3	1,0	44	0	0	-	0	0	-	***	R-G-C	***	P-H	***
E8	0	0	-	0	0	-	7,6	1,9	28	5,8	1,8	30	0	0	-	0	0	-	***	RC-G	NO	-PH-	NO
E9	0	0	-	0	0	-	2,2	2,4	108	0,5	0,5	96	0	0	-	0	0	-	**	CR-G	NO	-PH-	NO
E10	4,3	2,8	165	0	0	-	23,5	5,4	23	25,1	3,1	12	0	0	-	3,2	2,1	68	***	RC-G	NO	-HP-	*
E11	2,9	3,6	127	0	0	-	2,0	0,8	39	2,5	0,9	36	0	0	-	3,7	0,4	12	NO	-CRG-	NO	-HP-	***
E12	68,9	17,0	25	100	0	-	19,3	5,3	28	20,7	2,7	13	82,2	7,7	9	80,9	1,3	2	***	G-RC	***	H-P	***
E13	0	0	-	0	0	-	3,7	2,8	75	1,6	1,0	60	0	0	-	0	0	-	***	CR-G	NO	-PH-	NO
E14	3,2	4,9	154	0	0	-	16,8	3,2	19	15,5	4,9	32	0	0	-	0	0	-	***	RC-G	NO	-PH-	NO
E15	0	0	-	0	0	-	1,6	1,1	70	1,2	0,2	21	0	0	-	0	0	-	***	RC-G	NO	-PH-	NO
E16	0	0	-	0	0	-	7,4	3,0	40	6,8	4,5	67	0	0	-	0	0	-	***	CR-G	NO	-PH-	NO

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza. 10% ≥ * ≥ 5%, 5% ≥ ** ≥ 1%, 1% ≥ ***. x= media. σ = desviación estándar. CV= coeficiente de variación. C= *E. camaldulensis*. G= *E. globulus*. R= *E. rudis*. H= Huelva. P= Pontevedra. Ei= elagitanino.

TABLA V.3-18 Análisis univariante de los flavonoles de los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie		Procedencia	Inter.	
	H			P			H			P			H			P			Dif.sig./Agrup.	Dif.sig./Agrup.			
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV					
F1	0	0	-	1,9	2,7	141	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	**	GR-C	**	H-P	**
F2	0	0	-	6,1	0,4	6	0	0	-	0	0	-	3,7	2,1	58	0,6	0,1	18	***	G-RC	**	H-P	***
F3	0	0	-	8,1	1,8	16	0	0	-	0	0	-	3,0	3,4	113	0	0	-	***	G-R-C	**	H-P	***
F4	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	1,3	0,2	16	1,5	0,1	5	***	GC-R	NO	-HP-	NO
F5	4,8	1,3	29	13,5	3,6	26	0	0	-	0	0	-	5,7	2,6	45	4,4	0,4	10	***	G-R-C	***	H-P	***
F6	0	0	-	7,4	0,4	5	0	0	-	0	0	-	0,7	0,5	70	0	0	-	***	G-R-C	***	H-P	***
F7	54,6	7,1	13	29,0	3,6	13	68,9	14,0	20	60,9	16,2	27	41,7	11,1	27	50,5	8,5	17	***	CR-G	NO	-PH-	**
F8	6,3	3,6	58	3,2	0,1	4	0	0	-	0	0	-	4,5	3,1	68	4,1	0,8	21	***	G-CR	NO	-PH-	NO
F9	1,0	1,4	141	0	0	-	16,6	7,3	44	17,6	15,8	90	0,9	0,6	73	0,6	0,7	117	***	CR-G	NO	-PH-	NO
F10	25,9	9,5	37	14,8	0,4	2	0	0	-	0	0	-	17,7	8,1	46	24,5	5,8	24	***	G-CR	NO	-PH-	**
F11	2,1	1,5	74	0	0	-	0	0	-	0	0	-	3,8	1,1	29	3,1	1,0	33	***	G-C-R	**	P-H	NO
F12	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0,4	0,9	224	0	0	-	NO	-GCR-	NO	-PH-	NO
F13	3,9	3,2	82	0	0	-	10,7	6,1	57	11,6	5,1	44	0,8	0,5	64	1,5	0,3	22	***	RC-G	NO	-PH-	NO
F14	1,6	2,0	124	11,7	0,6	5	3,8	2,0	54	7,7	4,0	52	11,7	8,1	70	6,8	1,8	27	NO	-GCR-	NO	-HP-	**
F15	0	0	-	0	0	-	0	0	-	2,2	3,1	146	1,0	1,7	168	0	0	-	NO	-CRG-	NO	-HP-	NO
F16	0	0	-	4,2	0,4	9	0	0	-	0	0	-	3,1	2,6	84	2,6	1,7	67	***	G-CR	**	H-P	***

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza. 10% ≥ * ≥ 5%, 5% ≥ ** ≥ 1%, 1% ≥ ***. x= media. σ = desviación estándar. CV= coeficiente de variación. C= *E. camaldulensis*. G= *E. globulus*. R= *E. rudis*. H= Huelva. P= Pontevedra. Ei= elagitanino

TABLA V.3-19 Análisis discriminante canónico para los elagitaninos de los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

Análisis discriminante			
Función discriminante (FD)	Autovalor	Porcentaje relativo	Correlación canónica
1	866,70055	94,38	0,99942
2	38,79647	4,22	0,98736
3	8,76722	0,95	0,94743
4	2,51254	0,27	0,84576
5	1,51505	0,16	0,77614

Coefficientes estandarizados de las funciones discriminantes					
Variable	FD1	FD2	FD3	FD4	FD5
E1	1,68202	-0,29277	-0,28477	-1,90577	2,18347
E2	-0,61107	-0,14762	0,62455	-0,90737	-0,27508
E3	-2,99654	3,69106	0,45083	0,01299	-0,45676
E4	1,56180	-0,35844	-1,21706	0,07317	-0,14809
E5	2,10776	1,62613	-0,27338	-0,67902	0,67405
E6	-0,56141	1,46646	-0,07707	-1,06897	1,08276
E7	0,44367	1,72276	-0,23469	-1,34023	0,73488
E8	3,64987	2,06896	2,40149	0,11919	0,64118
E9	1,81572	0,21746	-1,14574	0,13942	-0,47742
E10	0,18536	0,56200	-1,31122	-2,25390	0,68592
E12	0,06241	5,42776	-0,15666	-3,31360	3,16431
E13	1,58560	1,06571	1,03807	-1,06764	0,36452
E14	1,99466	3,26805	0,03729	-1,36319	1,41398
E15	0,44850	0,37121	-1,49989	1,03239	-0,30140
E16	1,08611	1,71448	1,34760	-0,82056	1,24481

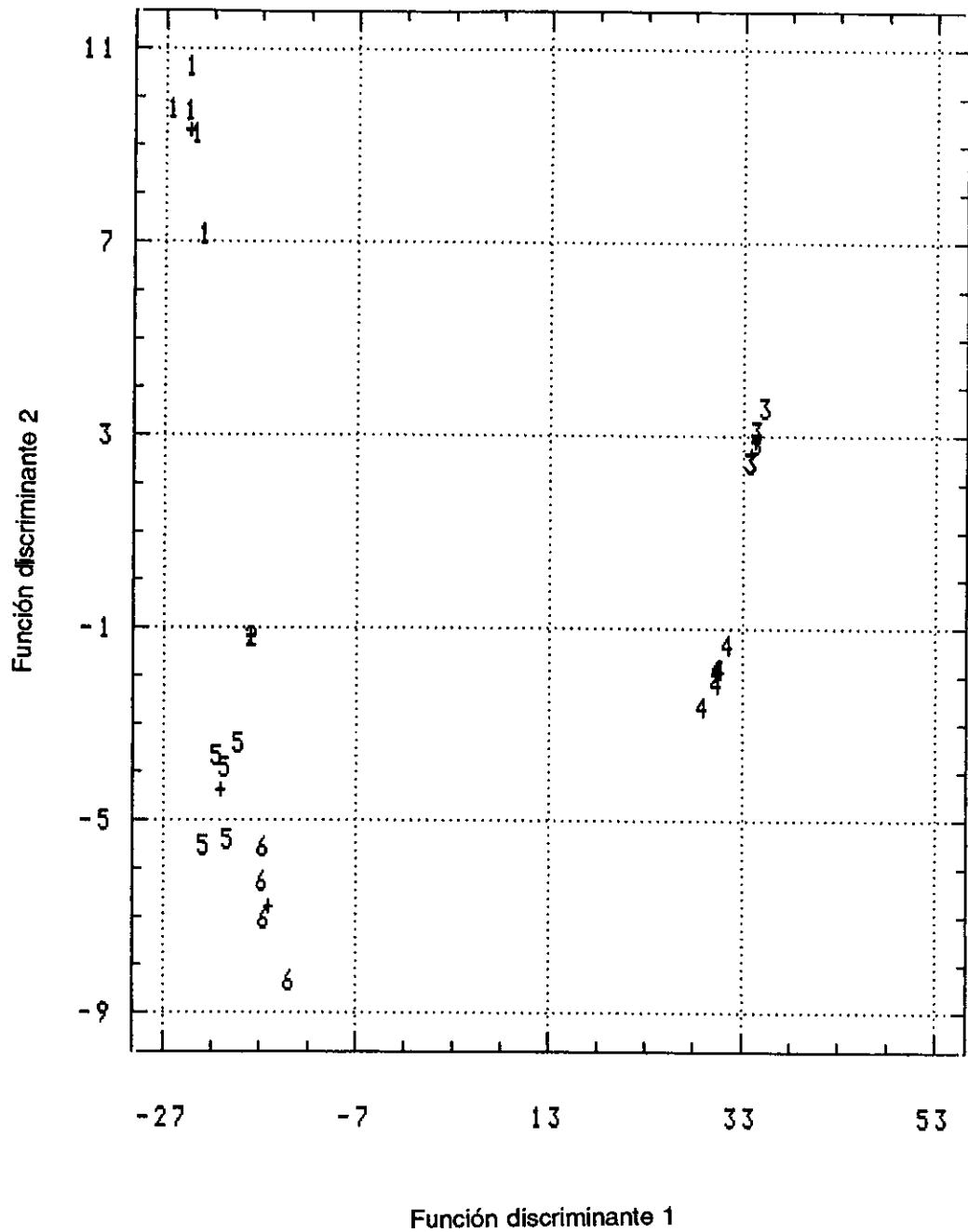


FIGURA V.3-27 Análisis discriminante canónico para los elagitaninos de los extractos de hojas de *Eucalyptus* spp. 1= *E. camaldulensis*, Huelva. 2= *E. camaldulensis*, Pontevedra. 3= *E. globulus*, Huelva. 4= *E. globulus*, Pontevedra. 5= *E. rudis*, Huelva. 6= *E. rudis*, Pontevedra.

TABLA V.3-20 Análisis discriminante canónico para los flavonoles de los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

Análisis discriminante			
Función discriminante (FD)	Autovalor	Porcentaje relativo	Correlación canónica
1	2053,5011	88,86	0,99976
2	219,5921	9,50	0,99773
3	35,2434	1,53	0,98611
4	2,1847	0,09	0,82825
5	0,3428	0,01	0,50529

Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes					
Variable	FD1	FD2	FD3	FD4	FD5
F1	1,58184	-0,12435	0,48434	0,08036	0,23741
F2	0,09511	-0,23265	0,34871	1,33144	0,81349
F3	3,86533	-1,07555	-1,72522	-1,11273	0,14983
F4	2,37701	-1,72037	-0,60051	-0,38134	0,01496
F5	-1,30590	-0,66166	1,54493	0,55357	0,58790
F6	3,96099	0,45997	-0,47263	-0,48803	-0,08029
F7	-1,77044	-3,35922	-3,00319	-1,21490	3,03560
F8	-0,56927	-0,29356	0,80086	-0,27837	0,60930
F9	-1,27478	-2,39125	-2,29890	-0,82492	2,09744
F10	-1,31851	-1,93906	-0,40990	-1,01442	1,03756
F11	-0,07324	-0,76295	-0,05055	-0,12199	0,01208
F13	-0,37039	-0,90883	-1,04473	-0,42116	0,50433
F16	-0,60917	-0,40594	-1,47530	0,89239	0,73854

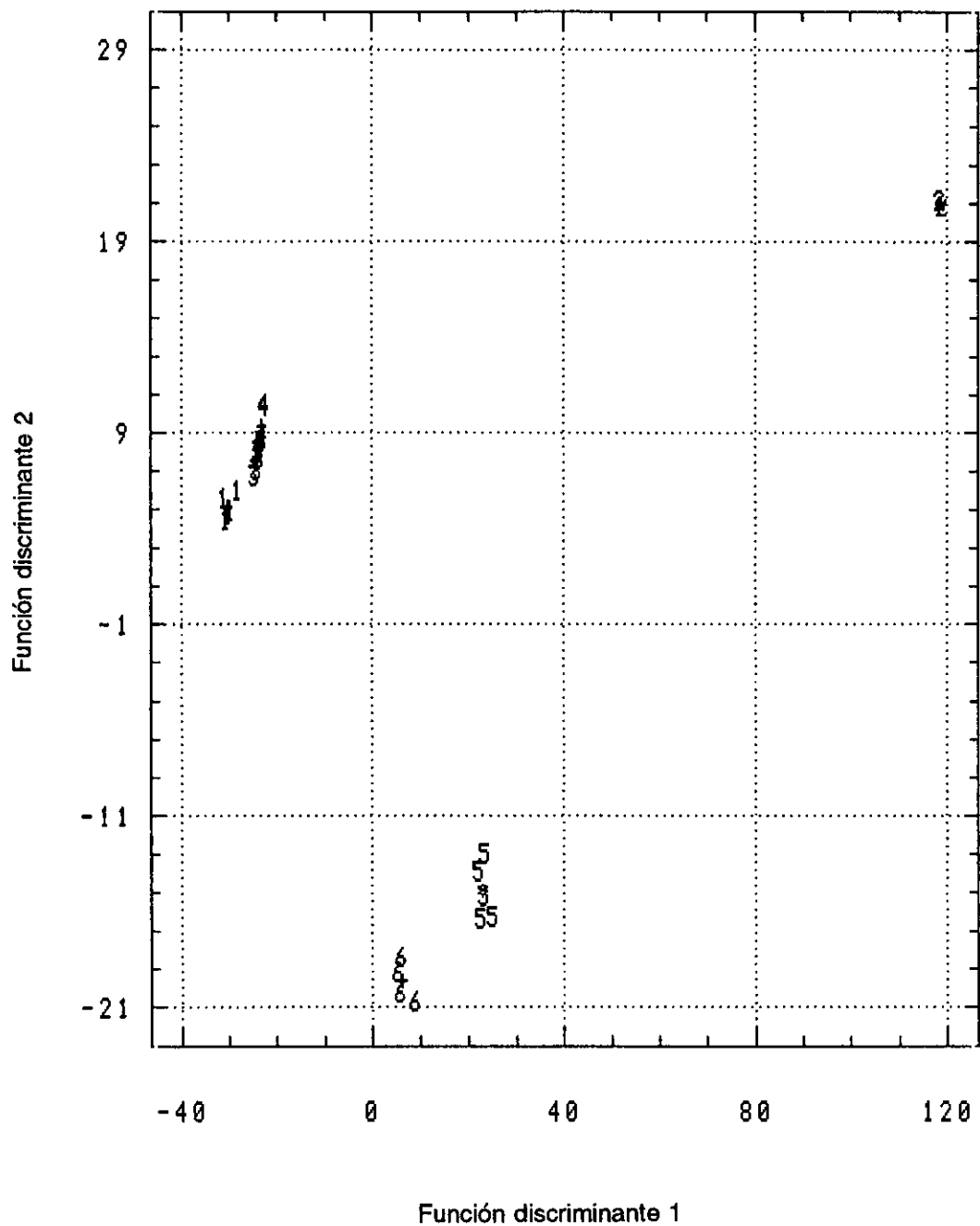


FIGURA V.3-28 Análisis discriminante canónico para los flavonoles de los extractos de hojas de *Eucalyptus* spp. 1= *E. camaldulensis*, Huelva. 2= *E. camaldulensis*, Pontevedra. 3= *E. globulus*, Huelva. 4= *E. globulus*, Pontevedra. 5= *E. rudis*, Huelva. 6= *E. rudis*, Pontevedra.

Elagitaninos. El análisis discriminante canónico de los elagitaninos ha establecido cinco funciones, de las cuales las dos primeras explican el 98% de la variación total y además presentan coeficientes de correlación canónica de 0,999 y 0,987, respectivamente.

Por otra parte, la función discriminante 1 se encuentra relacionada con los contenidos relativos de los elagitaninos E1, E3, E4, E5, E8, E9, E13 y E14 principalmente, mientras que los elagitaninos E3, E5, E7, E8, E12, E14 y E16 son los que tienen los pesos más elevados en la función discriminante 2 (tabla V.3-19).

En la representación gráfica respecto de los ejes canónicos 1 y 2 (fig. V.3-27), se pueden distinguir 6 grupos bien definidos, dependiendo de la especie y dentro de cada especie del origen. En la especie *E. camaldulensis* (1 y 2) es en la que se ha obtenido una mayor diferenciación, en cuanto a la composición de elagitaninos, según la procedencia de las muestras.

Por otra parte, la distribución gráfica de las poblaciones, obtenida en el caso de las muestras de hojas, presenta un mayor distanciamiento de los centroides correspondientes a las tres especies, si la comparamos con las distribuciones obtenidas para las muestras de madera y corteza.

Flavonoles. Del análisis discriminante canónico, para los glicósidos de flavonoles, han resultado así mismo cinco funciones. Las dos primeras con un porcentaje relativo del 98% y coeficientes de correlación canónica muy parecidos a los obtenidos para el caso del análisis de elagitaninos. Los flavonoles más representados en la función discriminante 1 han sido F1, F3, F4, F6 y F7, y los más influyentes en la función discriminante 2, F4, F7, F9 y F10.

En la figura V.3-28, se puede observar la representación gráfica de las

observaciones y centros de gravedad respecto de los ejes 1 y 2, en la que se han diferenciado 5 grupos, conforme a las diferentes especies y orígenes. En este gráfico no se han diferenciado las poblaciones de las dos procedencias de *E. globulus* (3 y 4), en las cuales se ha obtenido una composición en flavonoles muy semejante. Sin embargo, al igual que se obtuvo en el análisis de elagitaninos en la especie *E. camaldulensis*, las muestras procedentes de Pontevedra (2) han resultado diferir considerablemente de las procedentes de Huelva (1), estando estas últimas muy cercanas a las pertenecientes a *E. globulus*, en cuanto a la composición en flavonoles.

Si consideramos, finalmente, los grupos establecidos según las especies, se da un solapamiento entre la especie *E. globulus* y *E. camaldulensis*, las cuales se encuentran claramente diferenciadas de la especie *E. rudis*.

3.4.5 Conclusiones.

- 1- Los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*, se han mostrado constituidos principalmente por tres grupos de compuestos fenólicos, proantocianidinas, elagitaninos y glicósidos de flavonoles, siendo estos últimos exclusivos de las hojas.
- 2- Las hojas de *E. globulus* han resultado ser, entre las tres especies estudiadas, las más ricas en elagitaninos, mientras que en *E. camaldulensis* los compuestos más abundantes y variados han sido los glicósidos de flavonoles. La especie *E. rudis* ha resultado la más pobre en cualquiera de los tres grupos de polifenoles mencionados, como se puso de manifiesto también para la madera y la corteza.
- 3- Tanto la composición en elagitaninos como en flavonoles de las hojas, ha venido condicionada en mayor medida por la especie que por la procedencia. Sí se ha

observado, sin embargo, una tendencia de las hojas procedentes de Pontevedra a presentar mayor abundancia y variedad de flavonoles, con respecto a las de Huelva, estas últimas algo más ricas en elagitaninos.

- 4- Los análisis multivariantes han hecho posible la discriminación de las tres especies en función de la composición de elagitaninos de los extractos de hojas, resultando la especie *E. globulus* la más diferenciada respecto de las otras dos. En función de la composición de flavonoles ha sido posible la discriminación de *E. rudis*, de *E. camaldulensis* y *E. globulus*, aunque no de estas últimas entre sí. La distribución de poblaciones, obtenida en función de la composición en elagitaninos, estaría así más de acuerdo con la clasificación botánica de las tres especies. *E. camaldulensis* y *E. rudis* están incluidas en una misma sección del género *Eucalyptus*, la sección *Macrantherae* y concretamente en la serie *Exsertae*, mientras que *E. globulus* se clasifica en la serie *Globulares* de la sección *Macrantherae* (Normales).

4. Estudio de la distribución de pesos moleculares de los taninos de *Eucalyptus spp.*, mediante CPG.

El estudio de la distribución de los pesos moleculares de los taninos de madera, corteza y hojas de las diferentes especies de *Eucalyptus* consideradas en este trabajo se ha llevado a cabo por CPG, utilizando sus derivados acetilados, los cuales se obtuvieron tal como se especifica en el apartado 3.2.2.1 de metodología, ya que tanto las proantocianidinas como los elagitaninos, por su carácter de polifenoles, son demasiado polares para ser analizados en las columnas habitualmente disponibles para CPG.

Las condiciones utilizadas en los análisis por cromatografía de permeabilidad por geles han sido las descritas en el apartado IV.3.2.2.2. La calibración de las columnas se realizó usando patrones comerciales de poliestireno, al no disponer de otros de estructura química semejante a los taninos objeto de estudio. En la figura V.4-1, se presenta la curva de calibrado para el caso en que la columna usada fue una HP-PL gel Mixed-D y el eluyente THF (tetrahidrofurano), ajustándose dicha curva a una ecuación de tercer orden. Como puede observarse, esta columna nos ha permitido resolver compuestos con pesos moleculares dentro de un amplio intervalo (161-21821), en el que se ha obtenido una buena linealidad y se hizo posible una permeación selectiva.

En el análisis de la distribución de los pesos moleculares de los polímeros se han considerado los siguientes parámetros: M_n , peso molecular número-medio; M_w , peso molecular peso-medio; y D_p , dispersividad, definidos según las siguientes fórmulas matemáticas:

$$M_n = \frac{\sum Area_i}{\sum (Area_i/M_i)} \quad M_w = \frac{\sum (Area_i \cdot M_i)}{\sum Area_i} \quad D = \frac{M_w}{M_n}$$

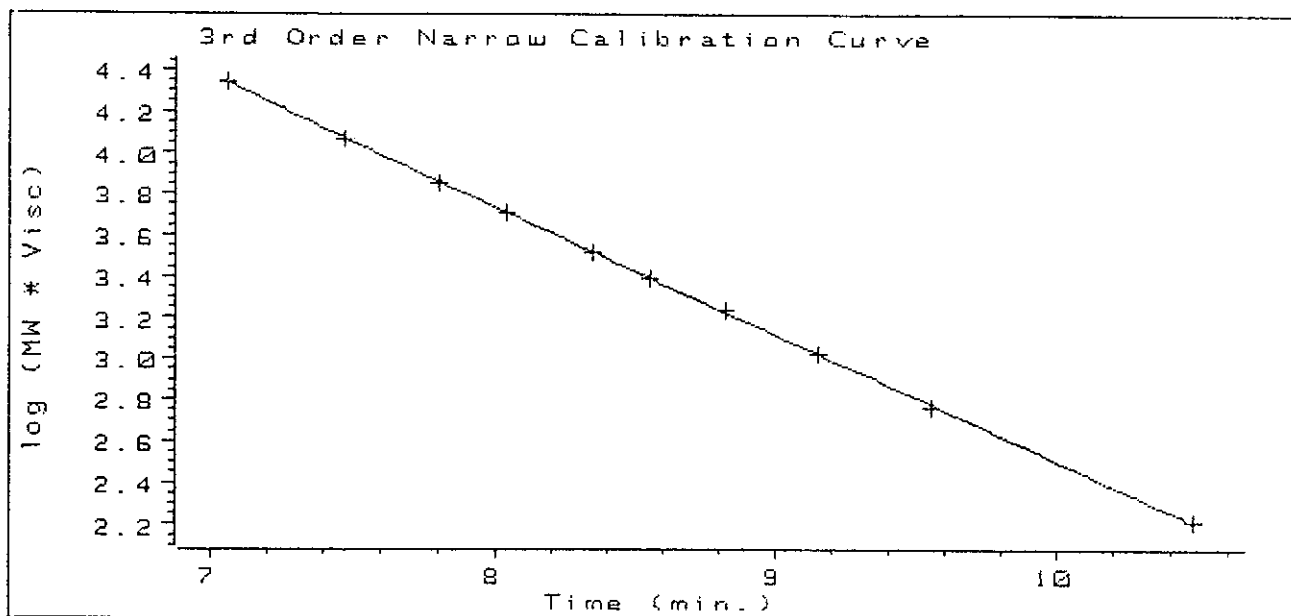
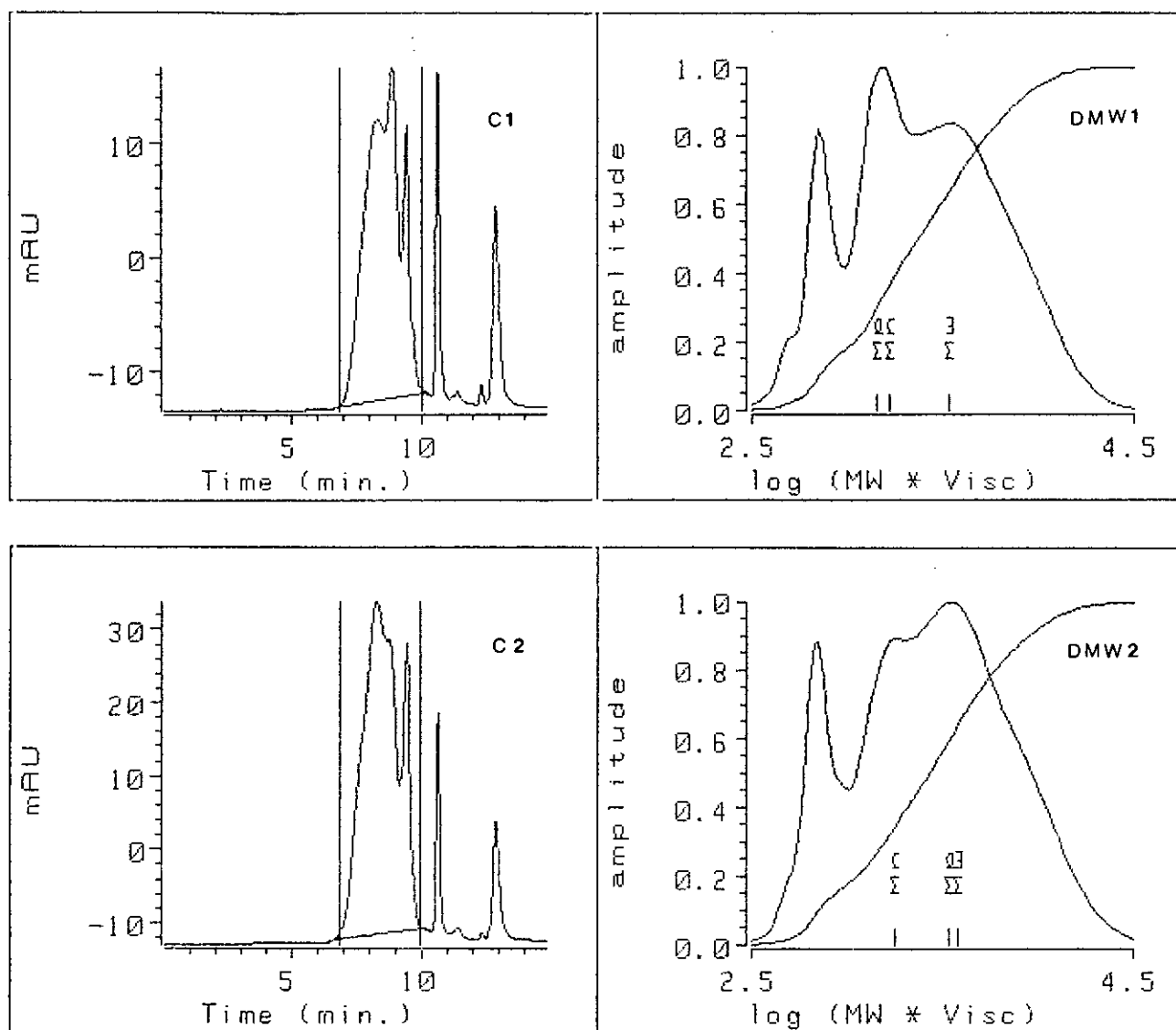


FIGURA V.4-1 Curva de calibrado de pesos moleculares para la columna HP-PL gel Mixed-D y THF como fase móvil, utilizando como patrones, moléculas de poliestireno en el intervalo entre 161 y 21821.

4.1 Madera.

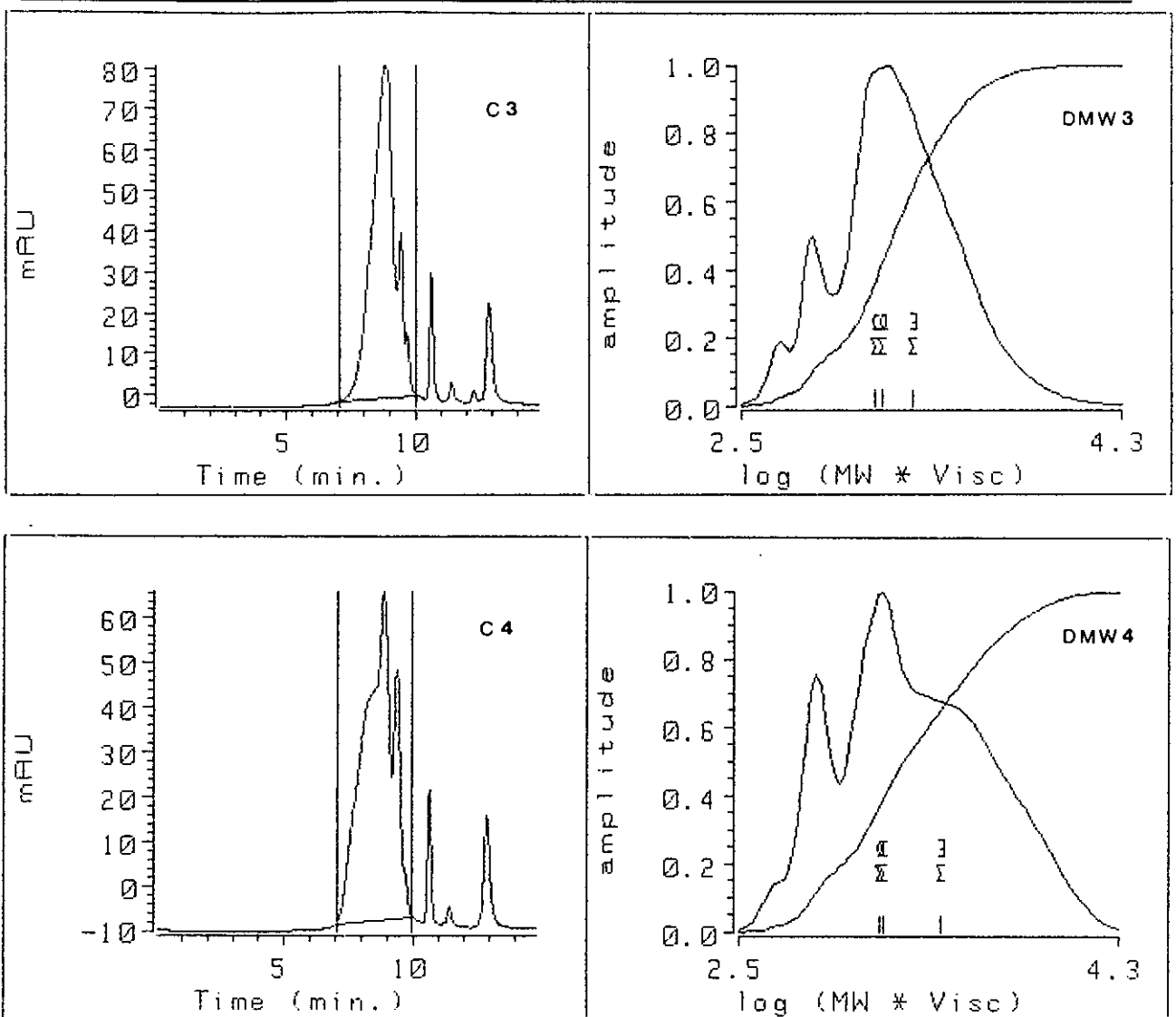
Los cromatogramas, obtenidos por CPG, correspondientes a los derivados acetilados de los taninos extraídos de madera de las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas se muestran en las figuras V.4-2 y V.4-3. En general, los perfiles cromatográficos han podido agruparse en cuatro tipos diferentes, que son representativos y/o exclusivos de cada una de las especies (tabla V.4-1).

Como se observa en la serie de figuras citadas, los perfiles cromatográficos varían en cuanto a su forma. Así, si se consideran los taninos mayoritarios, en general presentan una distribución de pesos moleculares simétrica, aunque a la vez es frecuente la resolución de diferentes picos o clases de taninos de peso molecular medio distinto, cuya abundancia determina el tipo de cromatograma.



t_R (min)	Cromatograma tipo 1		Cromatograma tipo 2	
	Mw	Area (%)	Mw	Area (%)
8,3	3516	51	3526	61
8,8	1538	31	1800	21
9,4	733	18	711	18
Rango MW= 335 - 28452				

FIGURA V.4-2. Cromatogramas de CPG (C1 y C2) y curvas de distribución de pesos moleculares (DMW1 y DMW2) de los derivados acetilados de los taninos, obtenidos de maderas de *E. camaldulensis*. Cromatogramas tipo 1 (HEC3) y tipo 2 (HEC5).



t_r (min)	Cromatograma tipo 3		Cromatograma tipo 4	
	Mw	Area (%)	Mw	Area (%)
8,3			--	--
8,8	1614	84	1571	80
9,4	706	12	772	20
9,7	500	4		
Rango MW= 335 - 20136				

FIGURA V.4-3 Cromatogramas de CPG (C3 y C4) y curvas de distribución de pesos moleculares (DMW3 y DMW4) de los derivados acetilados de los taninos, obtenidos de maderas de *E. globulus* (3) y *E. rudis* (4). Cromatogramas tipo 3 (PEG4) y tipo 4 (HER4).

TABLA V.4-1 Distribución de pesos moleculares de los derivados acetilados de los taninos de extractos de madera de *Eucalyptus spp.*

Muestra	Tipo cromatograma CPG	Mn	Mw	Dp
HEC1	2	1907	4014	2,10
HEC2	1	1623	2968	1,83
HEC3	1	1707	3566	2,09
HEC4	2	2068	4704	2,27
HEC5	2	1827	4023	2,20
PEC1	1	1603	3140	1,86
PEC2	1	1558	2964	1,90
HEG1	3	1412	2189	1,55
HEG2	3	1512	2741	1,81
HEG3	3	1484	2595	1,75
HEG4	3	1597	2927	1,83
HEG5	3	1504	2571	1,71
PEG1	3	1510	2339	1,55
PEG2	3	1472	2893	1,97
PEG3	3	1282	2200	1,72
PEG4	3	1448	2342	1,62
PEG5	3	1282	2066	1,61
HER1	4	1403	2758	1,97
HER2	4	1809	3953	2,18
HER3	4	1477	2746	1,86
HER4	4	1622	3202	1,97
HER5	4	1387	2554	1,84
PER1	4	1375	2594	1,88
PER2	4	1433	2865	2,00
PER3	4	1490	2672	1,79
PER4	4	1535	2712	1,77

Mn= peso molecular número-medio. Mw= peso molecular peso-medio. Dp= dispersividad; Dp=Mw/Mn. H= Huelva. P= Pontevedra. EC= *E. camaldulensis*. EG= *E. globulus*. ER= *E. rudis*.

En el caso de la especie *E. camaldulensis* (fig. V.4-2), se han obtenido cromatogramas de CPG en los que se resuelven tres picos P1, P2 y P3, respectivamente, con tiempos de retención de 8,3, 8,9 y 9,4 min y Mw correspondientes de alrededor de 3500, 1600 y 725. En esta especie se pueden diferenciar los tipos 1 y 2, en base a la abundancia relativa de los picos P1 y P2.

El tercer tipo de cromatograma (tipo 3), incluido en la figura V.4-3, resultó característico de la especie *E. globulus* y se distingue por la presencia casi exclusiva del pico P2, ($t_R=8,8$ min; Mw= 1600). Es de destacar además, que a pesar de la presencia de algunos taninos de bajo peso molecular, se puede decir que el cromatograma presenta una simetría en la distribución de los pesos moleculares.

En cuanto a los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras de madera de *E. rudis* (tipo 4), es de destacar que constituyen un nuevo grupo, si bien con gran similitud con algunos de los obtenidos en las muestras de *E. camaldulensis*, concretamente con los del tipo 1. Así, en *E. rudis* volvemos a obtener tres grupos de taninos que corresponden a los picos P1, P2 y P3. En el caso del P1 no ha sido posible el cálculo de su Mw y el porcentaje de área respecto de los otros dos, debido a que se resuelve en forma de hombro (fig. V.4-3).

En lo que respecta a las curvas de distribución de pesos moleculares correspondientes a los anteriores cromatogramas (fig. V.4-2 y V.4-3), y a los valores Mn, Mw y Dp (tabla V.4-1) es importante señalar que los citados valores han sido calculados considerando los pesos moleculares superiores a 335, valor aproximado al peso molecular mínimo correspondiente a las unidades constituyentes de las proantocianidinas y elagitaninos, concretamente en ambos casos, en forma de derivados acetilados. Sin embargo, no ha sido fijado un límite superior de peso molecular, ya que en cada caso este valor viene dado por la curva de distribución, habiendo sido de esta forma

estimados, en las muestras de madera, pesos moleculares de hasta, aproximadamente, 28.000.

Como se acaba de adelantar, en la tabla V.4-1 se presentan los valores de **Mn**, **Mw** y **Dp** obtenidos para cada una de las muestras de madera analizadas, y de los que se puede concluir que los valores de **Mn** oscilan entre 1200 y 2100 y que las curvas de distribución de pesos moleculares, en general presentan una distribución normal con valores de **Mw** próximos al doble de **Mn** y así, por tanto, valores de la polidispersividad próximos a 2.

Por otra parte, los análisis numéricos univariantes realizados para cada una de las variables **Mn**, **Mw** y **Dp**, cuyos resultados son expuestos en la tabla V.4-2, muestran que los extractos de madera de *E. camaldulensis* contienen taninos de peso molecular medio (**Mn**, 1826 y 1580; **Mw**, 3855 y 3052), significativamente superiores a los de los extractos de madera de *E. globulus* (**Mn**, 1501 y 1399; **Mw**, 2604 y 2368) y *E. rudis* (**Mn**, 1539 y 1458; **Mw**, 3043 y 2711). La polidispersividad, sin embargo, resultó ser significativamente superior en *E. rudis* (**Dp**, 1,96 y 1,86) y *E. camaldulensis* (**Dp**, 2,10 y 1,88), frente a *E. globulus* (**Dp**, 1,73 y 1,69).

Se han puesto de manifiesto, además, diferencias significativas en los valores de **Mn**, **Mw** y **Dp** entre las muestras de las dos zonas geográficas estudiadas, Huelva y Pontevedra, resultando en las de Huelva superiores en el caso de las tres especies de *Eucalyptus* (tabla V.4-2).

4.2 Corteza.

Al igual que en el caso de las muestras de madera, las muestras de corteza de las tres especies de eucaliptos bajo estudio han dado lugar a un total de cuatro tipos

TABLA V.4-2 Análisis univariante de los valores de los pesos moleculares de los derivados acetilados de los taninos de extractos de madera de *Eucalyptus spp.*

	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie	Procedencia	Int.		
	H			P			H			P			H			P						Dif.sig/Agrup.	Dif.sig/Agrup.
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV					
Mn	1826	173	10	1580	31	2	1501	66	4	1399	109	8	1539	180	11	1458	69	5	***	GR-C	**	P-H	NO
Mw	3855	641	17	3052	124	4	2604	272	10	2368	315	13	3043	562	18	2711	114	4	***	GR-C	**	P-H	NO
Dp	2,10	0,17	8	1,88	0,03	2	1,73	0,11	6	1,69	0,52	10	1,96	0,14	7	1,86	0,10	6	***	G-RC	**	P-H	NO

Dif.sig./Agrup.=diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencias por semejanza. 10% \geq * \geq 5%, 5% \geq ** \geq 1%, 1% \geq ***.

Int.=interacción.

Mn= peso molecular número-medio.

Mw= peso molecular peso-medio.

Dp= dispersividad; Dp=Mw/Mn.

H= Huelva.

P= Pontevedra.

x= media.

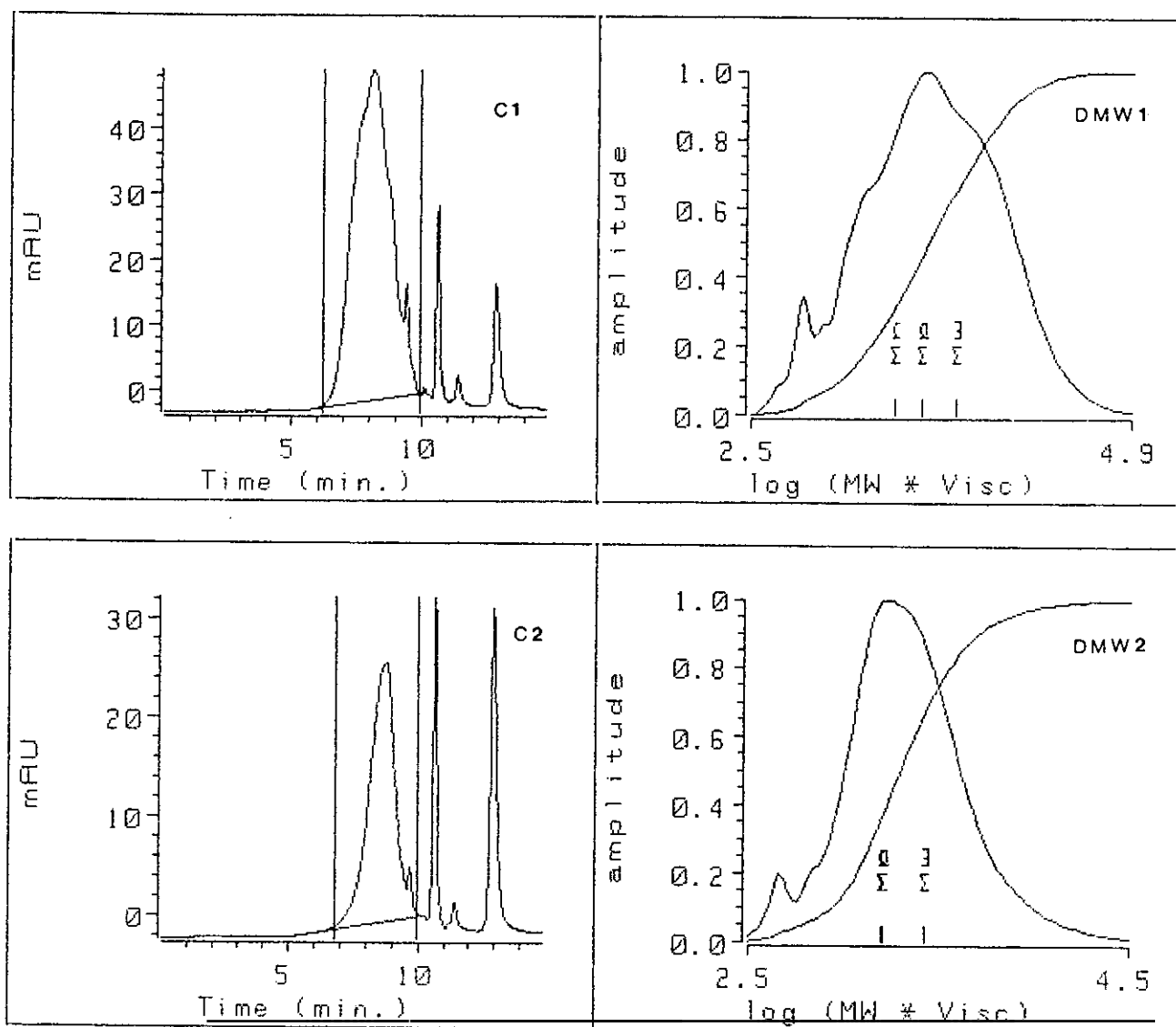
σ = desviación estándar.

CV= coeficiente de variación.

diferentes de cromatogramas de CPG, correspondientes a la resolución de los derivados acetilados de los taninos, como se puede observar en las figuras V.4-4 y V.4-5, y que, en general, resultaron característicos de la especie (tabla V.4-3). Sin embargo, es de señalar que en el caso concreto de la especie *E. camaldulensis* los cromatogramas resultaron ser diferentes según el origen de las muestras; así, el tipo 1 es característico de las cortezas procedentes de Huelva y el tipo 2 de las procedentes de Pontevedra. Por otra parte, las muestras, HEG1 y HEG3, aunque pertenecientes ambas a la especie *E. globulus*, presentan un cromatograma más acorde con el tipo 1, característico de las muestras de *E. camaldulensis* procedentes de Huelva.

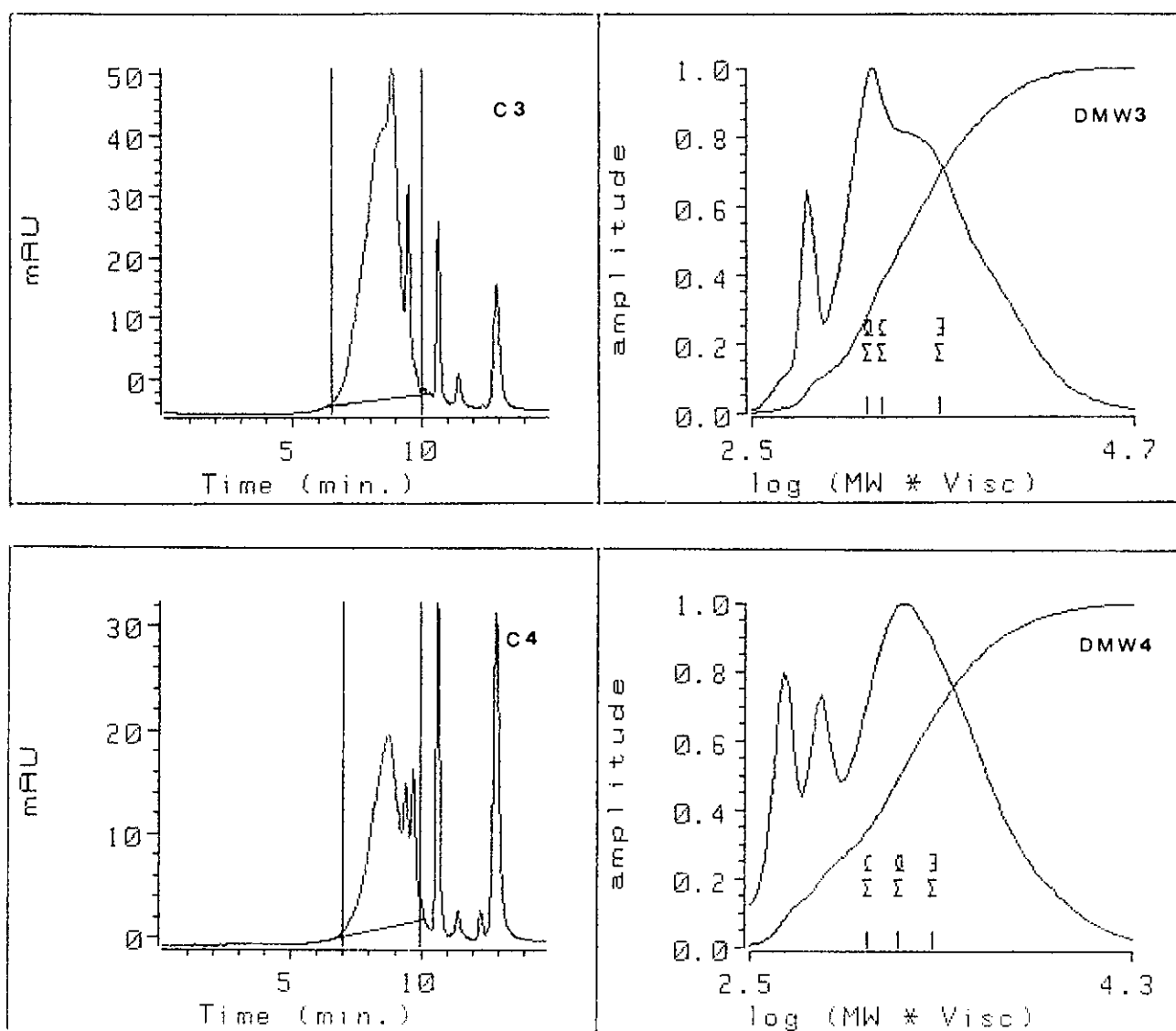
Por lo general, la distribución de pesos moleculares de los taninos extraídos de las cortezas, ha dado lugar a curvas de distribución normales, de forma semejante a lo ocurrido en las muestras de madera de las mismas especies. Los taninos se resolvieron en un único pico cromatográfico más o menos deformado por la presencia de hombros, y en el cual estaban incluidos prácticamente la totalidad de los diferentes tipos de polímeros tánicos ($t_R=8,5$ min; area= 90%), aunque a veces también fue obtenido algún otro pico de bajo peso molecular. Sin embargo, en cuanto a las diferencias de composición entre los taninos de la corteza y de la madera es de resaltar que el límite superior de pesos moleculares resultó considerablemente superior en las cortezas, ya que se han encontrado, en este caso, taninos con pesos moleculares dentro del intervalo de 335 a 79.950 (fig. V.4-4 y V.4-5).

Por otra parte, como era de esperar, el peso molecular medio, expresado como número molecular medio y peso molecular medio, resultó ser también superior en el caso de los taninos extraídos de cortezas; habiéndose alcanzado valores de hasta 2966 y 7714 respectivamente para M_n y M_w (tabla V.4-3), mientras que los máximos encontrados para los taninos de madera se cifraron en 2000 y 4700 (tabla V.4-1). También, la polidispersividad resultó mucho mayor para los taninos de corteza, al ser, por lo general



t_R (min)	Cromatograma tipo 1		t_R (min)	Cromatograma tipo 2	
	Mw	Area (%)		Mw	Area (%)
8,1	4322	94	8,7	1793	96
9,4	716	6	9,6	488	4
Rango MW= 335 - 79950			Rango MW= 335 - 33914		

FIGURA V.4-4. Cromatogramas de CPG (C1 y C2) y curvas de distribución de pesos moleculares (DMW1 y DMW2) de los derivados acetilados de los taninos, obtenidos de corteza de *E. camaldulensis*. Cromatogramas tipo 1 (HEC5) y tipo 2 (PEC2).



t_r (min)	Cromatograma tipo 3		t_r (min)	Cromatograma tipo 4	
	Mw	Area (%)		Mw	Area (%)
8,8	1632	89	8,7	1839	73
9,4	701	11	9,4	736	13
			9,6	494	14
Rango MW= 335 - 50887			Rango MW= 335 - 26554		

FIGURA V.4-5 Cromatogramas de CPG (C3 y C4) y curvas de distribución de pesos moleculares (DMW3 y DMW4) de los derivados acetilados de los taninos, obtenidos de corteza de *E. globulus* (3) y *E. rudis* (4). Cromatogramas tipo 3 (PEG4) y tipo 4 (HER4).

TABLA V.4-3 Distribución de pesos moleculares de los derivados acetilados de los taninos de extractos de corteza de *Eucalyptus spp.*

Muestra	Tipo cromatograma GPC	Mn	Mw	Dp
HEC1	1	2478	6844	2,76
HEC2	1	2957	7134	2,41
HEC3	1	2966	7714	2,60
HEC4	1	2136	5454	2,55
HEC5	1	2730	7064	2,59
PEC1	2	1750	2649	1,51
PEC2	2	1675	3390	2,02
HEG1	1	2400	5936	2,47
HEG2	3	2043	4975	2,44
HEG3	1	2261	4708	2,08
HEG4	3	1867	4555	2,44
HEG5	3	1675	4223	2,62
PEG1	3	1833	4806	2,62
PEG2	3	1613	3180	1,97
PEG3	3	1558	3490	2,24
PEG4	3	1693	3945	2,33
PEG5	3	1665	3289	1,97
HER1	4	1455	3123	2,15
HER2	4	1478	2795	1,89
HER3	4	1197	2457	2,05
HER4	4	1236	2564	2,07
HER5	4	1330	2783	2,09
PER1	4	1228	2803	2,28
PER2	4	1294	2991	2,31
PER3	4	1474	3084	2,09
PER4	4	1357	3125	2,30

Mn= peso molecular número-medio. Mw= peso molecular peso-medio. Dp= dispersividad; Dp=Mw/Mn. H= Huelva. P= Pontevedra. EC= *E. camaldulensis*. EG= *E. globulus*. ER= *E. rudis*.

TABLA V.4-4 Análisis univariante de los valores de los pesos moleculares de los derivados acetilados de los taninos de extractos de corteza de *Eucalyptus spp.*

	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie	Procedencia	Int.		
	H			P			H			P			H			P						Difsig/Agrup.	Difsig/Agrup.
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV					
Mn	2653	351	13	1712	53	3	2049	292	14	1672	104	6	1339	126	9	1338	105	8	***	R-G-C	***	P-H	***
Mw	6842	840	12	3019	524	17	4879	650	13	3742	663	18	2744	256	9	3001	143	5	***	R-GC	***	P-H	***
Dp	2,58	0,13	5	1,77	0,36	20	2,41	0,20	8	2,23	0,27	12	2,05	0,10	5	2,25	0,10	5	NO	-RCG-	***	P-H	***

Dif.sig./Agrup.=diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencias por semejanza. *=10%.**=5%.***=1%.

Int.=interacción.

Mn= peso molecular número-medio.

Mw= peso molecular peso-medio.

Dp= dispersividad; Dp=Mw/Mn.

H= Huelva.

P= Pontevedra.

x= media.

σ = desviación estándar.

CV= coeficiente de variación.

superior a 2 (tabla V.4-2), valor por encima del que se cifró la polidispersividad de los taninos de madera.

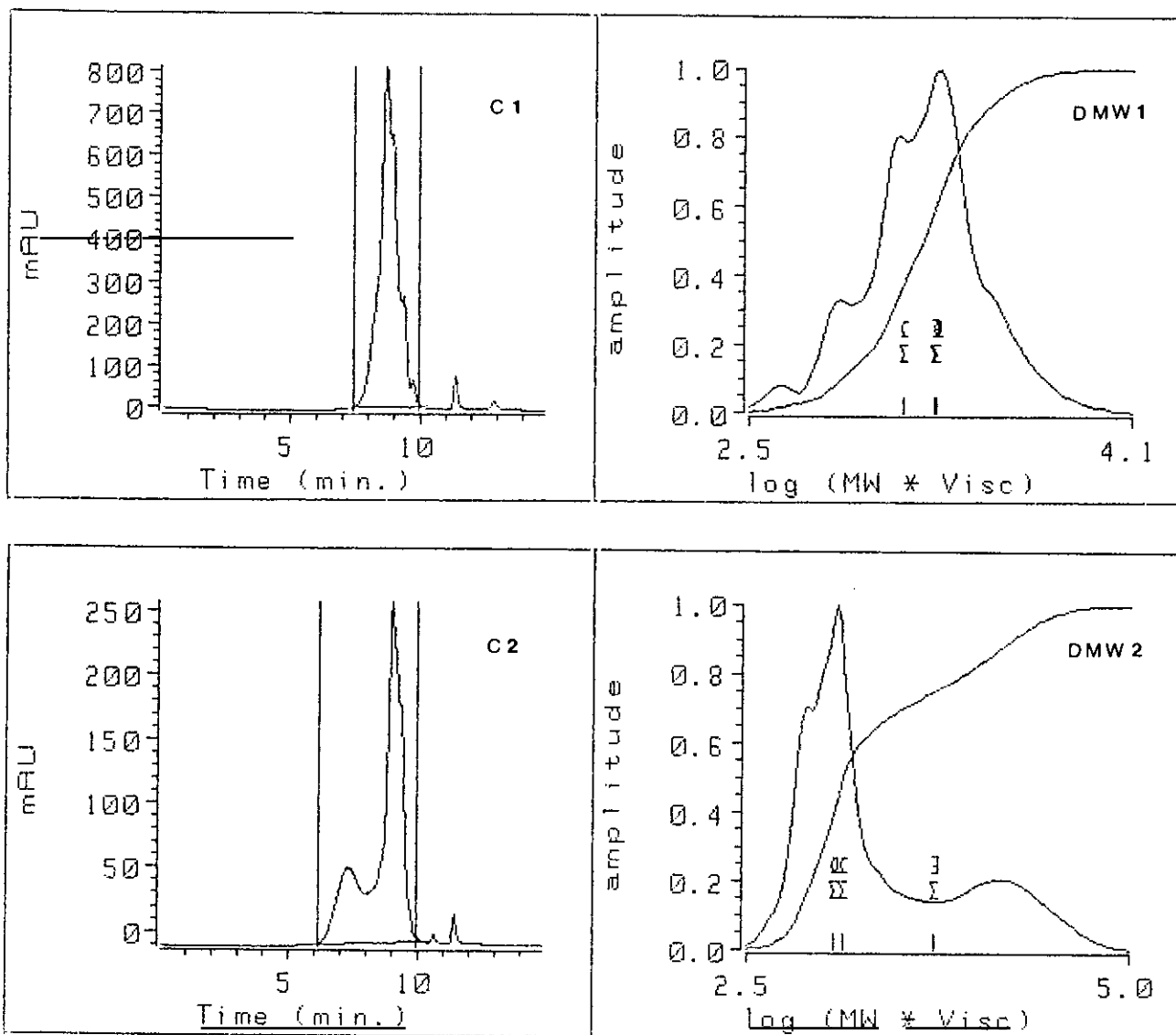
En lo que concierne al análisis univariante realizado para las tres variables Mn, Mw y Dp, (tabla V.4-4), pone de manifiesto que los extractos de corteza en las especies *E. camaldulensis* (Mn, 2653 y 1712; Mw, 6842 y 3019) y *E. globulus* (Mn, 2049 y 1672; Mw, 4879 y 3742) contienen taninos con pesos moleculares medios significativamente superiores a los de *E. rudis* (Mn, 1339 y 1338; Mw, 2744 y 3000) en ambas procedencias y que, por otra parte, dentro de cada una de las dos primeras especies citadas, se dan también diferencias significativas según el origen de las muestras. La polidispersividad, sin embargo, resulta ser muy semejante en las tres especies en estudio.

4.3 Hojas.

Los extractos de taninos de hojas de las tres especies de eucaliptos han dado perfiles cromatográficos de CPG bastante uniformes, pudiendo agruparse en tres tipos (fig.V.4-6 y V.4-7), los cuales no parecen estar en relación ni con la especie ni con la procedencia de la muestra, tal y como se pone de manifiesto en la tabla V.4-5.

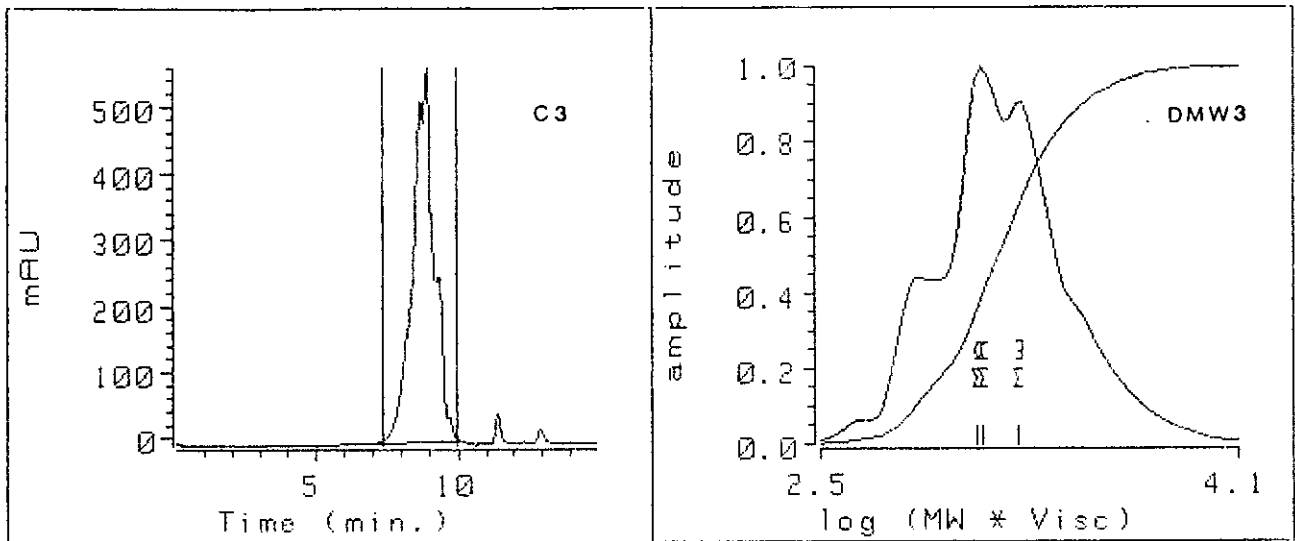
Considerando los cromatogramas y las curvas de distribución de pesos moleculares, cabe destacar que, en las muestras correspondientes al tipo 2, se detecta a un tiempo de retención de 7,3 minutos, la presencia de un grupo de compuestos de peso molecular medio $M_w=14474$, taninos que parecen ser exclusivos de las muestras de *E. camaldulensis*, procedentes de Pontevedra y, por tanto, considerados no sólo atípicos de hojas sino, en general, poco abundantes en otros tejidos en *Eucalyptus spp.*

A excepción de esta particularidad, los taninos extraídos de las hojas se caracterizan por su bajo peso molecular y su baja dispersividad en relación tanto a los extraídos de



t_R (min)	Cromatograma tipo 1		t_R (min)	Cromatograma tipo 2	
	Mw	Area (%)		Mw	Area (%)
8,7	2001	88	7,3	14474	25
9,3	790	10	9,0	1264	75
9,7	461	2			
Rango MW= 335 - 10748			Rango MW= 335 - 69014		

FIGURA V.4-6. Cromatogramas de CPG (C1 y C2) y curvas de distribución de pesos moleculares (DMW1 y DMW2) de los derivados acetilados de los taninos, obtenidos de hojas de *Eucalyptus spp.* Cromatogramas tipo 1 (HEG3) y tipo 2 (PEC2).



t_r (min)	Cromatograma tipo 3	
	Mw	Area (%)
8,7	1956	47
8,9	1391	38
9,3	796	15
Rango MW= 335 - 12428		

FIGURA V.4-7 Cromatograma de CPG (C3) y curva de distribución de pesos moleculares (DMW3) de los derivados acetilados de los taninos, obtenidos de hojas de *Eucalyptus spp.* Cromatograma tipo 3 (PEG5).

las maderas como a los de las cortezas, siendo los valores máximos de Mn y Mw de 1648 y 3200 respectivamente. La dispersividad fue siempre menor que 2, si excluimos por su comportamiento particular las citadas muestras de *E. camaldulensis* procedentes de Pontevedra (tabla V.4-5).

Por otra parte, teniendo en cuenta los análisis numéricos univariantes realizados para las variables Mn, Mw y Dp, presentados en la tabla V.4-6, y considerando los

TABLA V.4-5 Distribución de pesos moleculares de los derivados acetilados de los taninos de extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

Muestra	Tipo cromatograma CPG	Mn	Mw	Dp
HEC1	1	1421	1990	1,40
HEC2	1	1492	2045	1,37
HEC3	1	1611	2233	1,39
HEC4	1	1487	2057	1,38
HEC5	1	1497	2097	1,40
PEC1	2	1421	3862	2,72
PEC2	2	1454	5664	3,89
HEG1	3	1497	2601	1,74
HEG2	1	1534	2626	1,71
HEG3	1	1481	2057	1,39
HEG4	1	1526	2409	1,58
HEG5	1	1611	2641	1,64
PEG1	1	1579	2197	1,39
PEG2	1	1393	2041	1,47
PEG3	1	1648	3244	1,97
PEG4	1	1505	2384	1,58
PEG5	3	1442	2085	1,45
HER1	3	1320	1901	1,44
HER2	3	1171	1705	1,46
HER3	3	1330	2059	1,55
HER4	1	1386	1985	1,43
HER5	1	1243	1808	1,45
PER1	3	1279	1745	1,36
PER2	3	1364	1918	1,41
PER3	1	1447	2065	1,43
PER4	1	1420	2017	1,42

Mn= peso molecular número-medio. Mw= peso molecular peso-medio. Dp= dispersividad; Dp=Mw/Mn. H= Huelva. P= Pontevedra. EC= *E. camaldulensis*. EG= *E. globulus*. ER= *E. rudis*.

TABLA V.4-6 Análisis univariante de los valores de los pesos moleculares de los derivados acetilados de los taninos de extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie	Procedencia	Int.		
	H			P			H			P			H			P							
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV				Difsig/Agrup.	Difsig/Agrup.
Mn	1502	68	5	1437	23	2	1530	50	3	1513	103	7	1290	84	6	1377	74	5	***	R-CG	NO	-HP-	NO
Mw	2048	91	4	4763	1274	27	2467	247	10	2390	495	21	1892	140	7	1936	141	7	***	R-G-C	***	H-P	***
Dp	1,39	0,01	1	3,31	0,83	25	1,61	0,13	8	1,57	8,23	15	1,47	0,05	3	1,41	0,03	2	***	RG-C	***	H-P	***

Dif.sig./Agrup.=diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencias por semejanza. *=10%.**=5%.***=1%.

Int.=interacción.

Mn= peso molecular número-medio.

Mw= peso molecular peso-medio.

Dp= dispersividad; Dp=Mw/Mn.

H= Huelva.

P= Pontevedra.

x= media.

σ = desviación estándar.

CV= coeficiente de variación.

factores especie y procedencia de las muestras de hojas, merece destacarse que, una vez más, fue la especie *E. rudis* en ambas procedencias, la que presentó los valores significativamente inferiores de Mn (1290 y 1377) y Mw (1892 y 1936), frente a *E. camaldulensis* (Mn, 1502 y 1437; Mw, 2048 y 4763) y *E. globulus* (Mn, 1530 y 1513; Mw, 2467 y 2390). Debe señalarse también la elevada dispersividad, Dp, obtenida en el caso de las hojas de *E. camaldulensis* de Pontevedra (Dp 3,31), que es responsable de las diferencias significativas observadas para la especie *E. camaldulensis* respecto de *E. rudis* y *E. globulus* y, también, de las observadas entre las muestras de Huelva y de Pontevedra.

4.4 Conclusiones.

- 1- Los perfiles de distribución de pesos moleculares de los derivados acetilados de los taninos extraídos de madera, corteza y hojas de las especies de *Eucalyptus*, *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* han revelado la riqueza y considerable variación de estos compuestos poliméricos en los eucaliptos en relación con el tejido vegetal, la especie y, en algunos casos, con la procedencia geográfica de las muestras.
- 2- En el conjunto de las especies y tejidos estudiados se ha puesto de manifiesto la diversidad de los taninos presentes en los eucaliptos con la resolución dentro de un amplísimo intervalo de pesos moleculares, que va desde los valores correspondientes a los de las unidades monoméricas ($M_w \approx 300$) hasta los correspondientes a polímeros de más de doscientas unidades ($M_w \approx 79000$). Sin embargo, es necesario puntualizar que los taninos con tan elevados pesos moleculares son poco abundantes, estando la mayoría incluidos dentro del intervalo de 1000 a 8000.
- 3- La corteza ha sido el tejido entre los estudiados que ha presentado taninos con

valores de Mn, Mw y Dp mayores (Mn, 1200-3000; Mw, 2500-8000 y Dp>2), seguida de la madera (Mn, 1200-2100; Mw, 2000-4700; Dp, 1,5-2) y de las hojas en último lugar (Mn, 1100-1700; Mw, 1700-2700; Dp≈ 1,5).

- 4- Es en la especie *E. camaldulensis* en la que se han presentado taninos de mayores pesos moleculares, en concreto, en los extractos de madera y corteza, así como también, en los extractos de hojas, junto con los de la especie *E. globulus*.
- 5- Tanto en madera como en corteza la procedencia de los árboles determinó también el perfil de pesos moleculares de los taninos, resultando en general los valores de Mn y Mw superiores en las muestras procedentes de Huelva que en las de Pontevedra. La correlación no resultó ser tan clara en el caso de las muestras de hojas.
- 6- Se ha puesto de manifiesto que los eucaliptos, como otras especies vegetales, contienen una gran variedad de polifenoles poliméricos de pesos moleculares dentro de un amplísimo intervalo, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales. Sin embargo, en esta variabilidad también pueden ser decisivos otros factores, como estados fisiológicos estacionales o estado de madurez de los tejidos, entre otros, y así, sería el conjunto de todos lo que podría explicar las variaciones significativas observadas en la distribución de pesos moleculares de las muestras de madera, corteza y hojas en las especies de *Eucalyptus* bajo estudio.

5. Caracterización de los elagitaninos.

Ya que los elagitaninos son ésteres de glúcidos y ácidos fenólicos, y son susceptibles de hidrólisis, tanto en soluciones ácidas como básicas, la caracterización de estos compuestos en madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.* se ha realizado, después de someter a las muestras, concretamente la fase acuosa liofilizada del correspondiente extracto, a una hidrólisis ácida, según el método descrito en el apartado IV.4.1, para acometer posteriormente la identificación de los productos de la hidrólisis, es decir, los azúcares y compuestos polifenólicos constituyentes de los elagitaninos.

5.1 Análisis de los compuestos polifenólicos por CLAR.

Los hidrolizados obtenidos fueron analizados por CLAR bajo las condiciones que se especificaron en el apartado IV.3.1.2, y utilizando el gradiente de elución nº 2 (apartado IV.4.2).

En las figuras V.5.1 y V.5.2 se muestran algunos cromatogramas elegidos como modelo entre los obtenidos para las distintas muestras hidrolizadas de madera, corteza y hojas de las tres especies de *Eucalyptus* consideradas. En estos cromatogramas se presentan variaciones de cuatro picos cromatográficos mayoritarios (G, E, E₁ y E₂), que corresponden a distintos compuestos polifenólicos generados en la hidrólisis de los elagitaninos.

Los picos G y E han sido asignados, respectivamente, a los ácidos gálico y elágico, ácidos que fueron identificados directamente por CLAR, mediante la comparación de los correspondientes tiempos de retención y espectros UV con los de los respectivos patrones y por el método del enriquecimiento del pico. Los compuestos E₁ (t_R=11,6; fig. V.5-2) y E₂ (t_R=21,01; fig. V.5-1b), han sido considerados como derivados del ácido elágico ya que presentan espectros UV, semejantes al de dicho ácido (fig. V.5-3) pero tienen

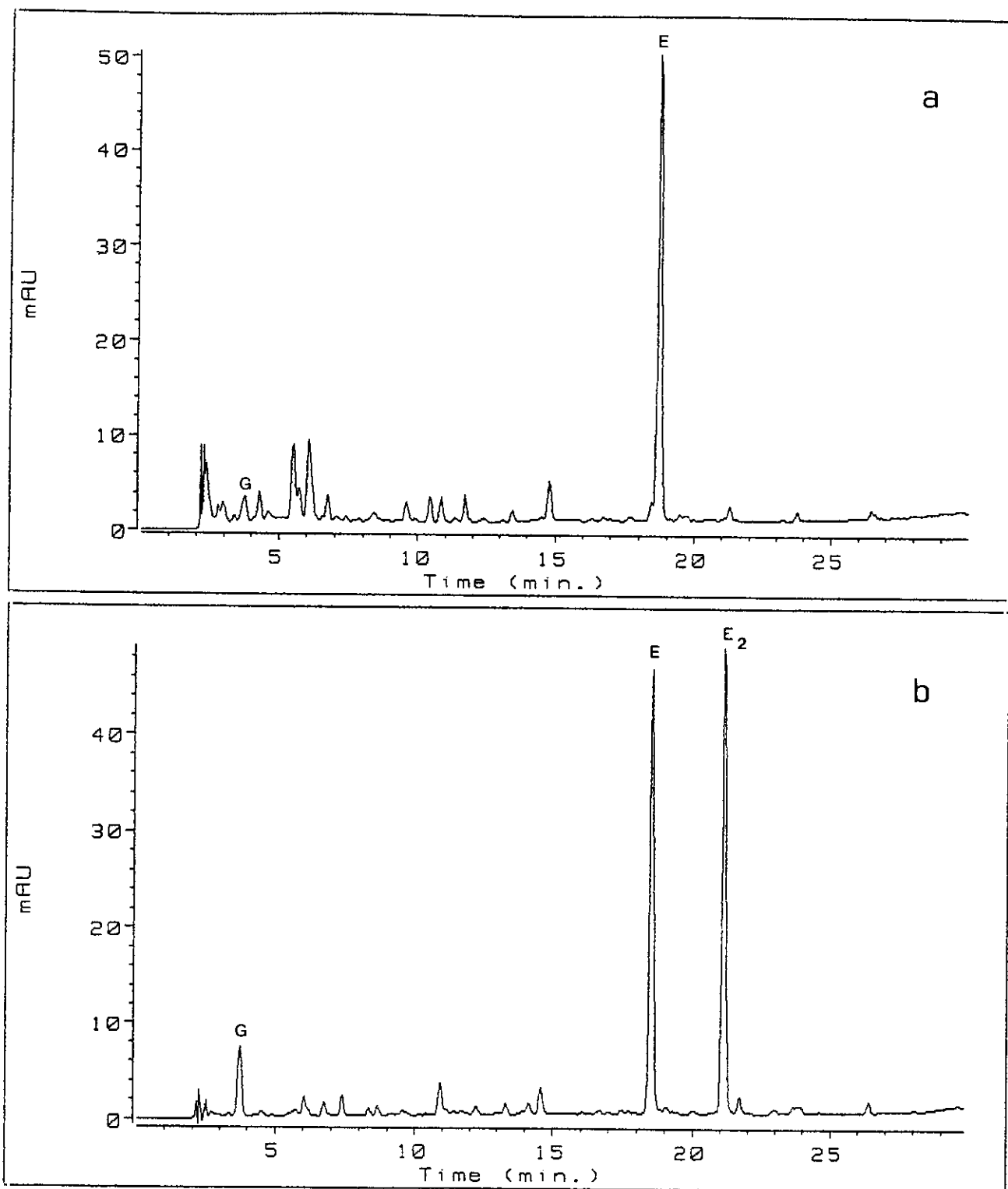


FIGURA V.5-1 Cromatogramas modelo de extractos hidrolizados de elagitaninos de madera (a) y corteza (b) de *Eucalyptus spp.* a: HER4, b: PEG4. G= ácido gálico, E= ácido elágico. E₂= derivado del ácido elágico.

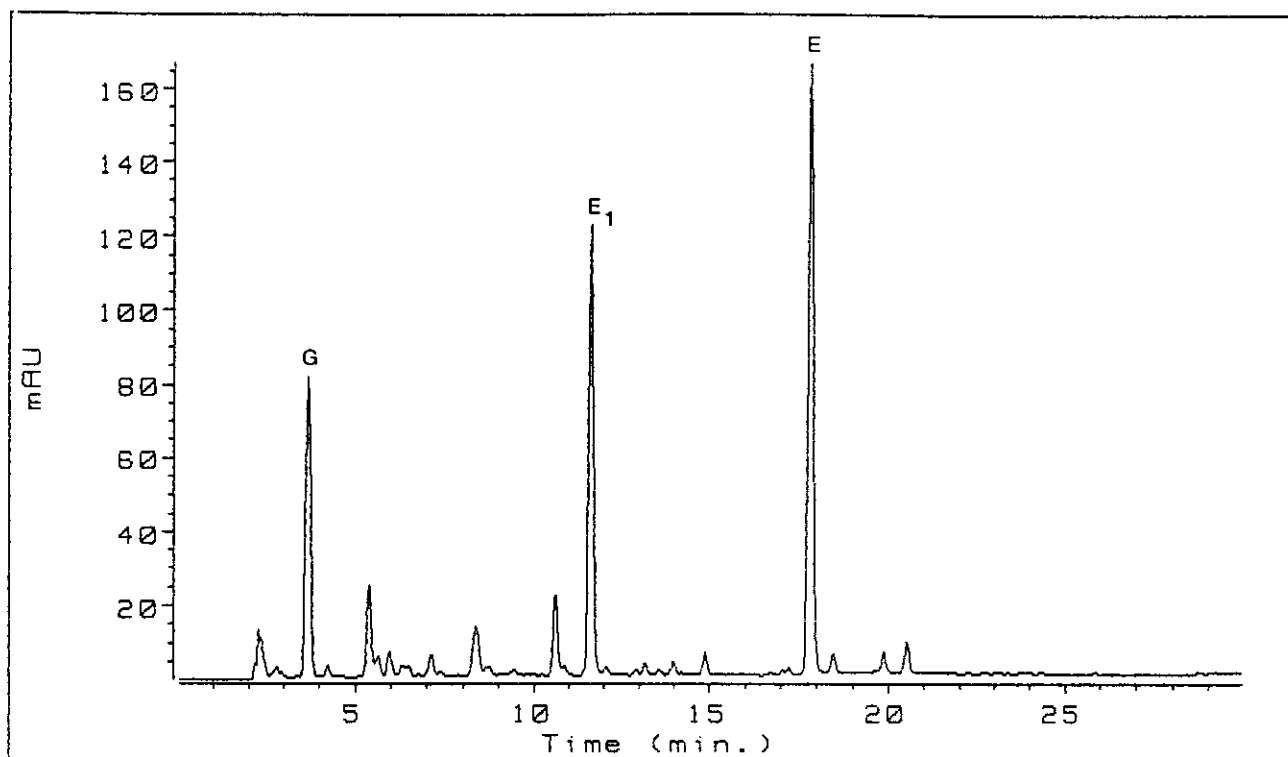


FIGURA V.5-2 Cromatograma modelo de extractos hidrolizados de elagitaninos de hojas de *Eucalyptus spp.* (HEC1). G= ácido gálico, E= ácido elágico. E₁=derivado del ácido elágico.

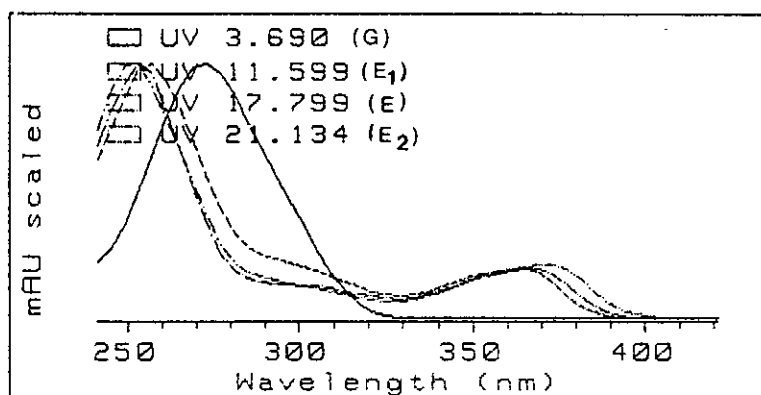


FIGURA V.5-3 Espectros UV de los productos de la hidrólisis de los elagitaninos extraídos de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.* G= ácido gálico, E= ácido elágico. E₁ y E₂= derivados del ácido elágico.

diferente tiempo de retención. El compuesto E_1 ha presentado un espectro UV igual en forma al del ácido elágico, pero con un ligero desplazamiento del primer máximo de absorción hacia longitudes de onda superiores (E , 255 nm; E_1 , 257 nm; Fig. V.5-3). Además, dicho compuesto E_1 ha eluido a un tiempo de retención de 11,6 min, considerablemente inferior al del ácido elágico ($t_R=17,8$ min), lo que nos hace pensar que se puede tratar de un compuesto cuya estructura básica está formada por ácido elágico al que se une un radical de una estructura molecular que le confiere mayor polaridad, probablemente un grupo galoilo. Suponemos que la unión entre ambas estructuras es una unión éter (C-O-C) y no un enlace C-C, ya que de tratarse de este último caso aparecería alterada la resonancia de los dobles enlaces del grupo hexahidroxidifenoilo y, así, su espectro UV se vería afectado considerablemente respecto del correspondiente al ácido elágico.

Por otra parte, como ya hemos expuesto extensamente en el apartado 2.9 de la Introducción, en los frutos de varias especies de *Eucalyptus* han sido identificadas eucalbaninas A, B y C (Yoshida *et al.*, 1992b), cornusiina B (Hatano *et al.*, 1989) y oenoteína B (Hatano *et al.*, 1990), elagitaninos que, además de presentar estructura molecular polifenólica con grupos tan comunes como el galoilo y el hexahidroxidifenoilo, contienen otros como valoneoilo (eucalbanina B, cornusiina B y oenoteína B), tergaloilo (eucalbanina C) y grupos dilactona de tergaloilo (eucalbanina A); todos estos elagitaninos, mediante hidrólisis ácida, producirían los correspondientes ácidos libres en su forma dilactona, pudiendo cualquiera de las estructuras moleculares citadas responder a las características cromatográficas y espectrales del compuesto E_1 . Por ello suponemos que E_1 podría ser el ácido valoneico o el ácido tergálico (fig. II.3 y II.4).

En lo que respecta a E_2 , este compuesto ha mostrado un espectro UV idéntico al del ácido elágico (fig. V.5-3) y en los análisis por CLAR eluyó a un tiempo de retención mayor ($t_R=21,01$ min), por lo que pensamos que se trata de un derivado del ácido elágico, de carácter menos polar. Por otra parte, el compuesto E_2 fue obtenido

principalmente en los hidrolizados de elagitaninos de las muestras de corteza de *E. globulus*, como muestran los análisis cuantitativos que se describen a continuación y dado, además, que el estudio de Yazaki y Hillis (1976) ha puesto de manifiesto la presencia de derivados metilados y glicosilados del ácido elágico (3-Me-AE ramnósido y 3-Me-AE glucósido) en corteza de la misma especie de *Eucalyptus*, se puede contemplar la hipótesis de que este compuesto E_2 puede corresponder a un derivado metilado del ácido elágico. Así, para comprobar esta suposición, se realizó la metilación de ácido elágico patrón, por tratamiento con trimetilsilildiazometano, y se comprobó, mediante análisis por CLAR, que el compuesto E_2 era un derivado monometilado del ácido elágico, pudiendo tratarse del 3-Me- o del 4-Me- derivado.

Abundando en el estudio de la composición de los elagitaninos presentes en *Eucalyptus spp.*, es preciso señalar que la presencia o ausencia de los picos E_1 y E_2 , así como la proporción relativa de los cuatro mayoritarios: G, E, E_1 y E_2 , dependió tanto del tejido bajo ensayo, madera, corteza u hojas, como de la especie entre las tres ensayadas. Se procedió, pues, a realizar la valoración cuantitativa de los anteriores compuestos, utilizando para ello las rectas de calibrado de los ácidos gálico y elágico que se especifican en el apartado IV.4.2 y asumiendo, por otra parte, que los coeficientes de absorción molar para los compuestos E_1 y E_2 eran iguales al correspondiente del ácido elágico.

En las tablas V.5-1, V.5-2 y V.5-3, se recoge la valoración cuantitativa de los compuestos G, E, E_1 y E_2 , en los tres tipos de muestra, los hidrolizados de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.*, respectivamente, y en la tabla V.5-4 los análisis numéricos univariantes para cada una de estas variables.

Del análisis de estos datos se puede resumir que los elagitaninos procedentes de las muestras de madera en las tres especies estudiadas se han caracterizado por presentar como productos de la hidrólisis, casi exclusivamente ácido gálico, E_2 y ácido elágico,

TABLA V.5-1 Cuantificación relativa de los compuestos polifenólicos procedentes de la hidrólisis de los elagitaninos extraídos de madera de *Eucalyptus spp.*

	G	E ₁	E	E ₂
<i>E. camaldulensis</i>				
HEC1	16	0	69	14
HEC2	28	0	61	11
HEC3	11	0	85	4
HEC4	6	0	90	3
HEC5	23	0	53	24
PEC1	15	0	82	3
PEC2	13	0	83	4
<i>E. globulus</i>				
HEG1	1	0	89	10
HEG2	20	0	69	11
HEG3	25	0	61	13
HEG4	39	0	50	10
HEG5	24	0	64	11
PEG1	17	0	75	9
PEG2	11	0	62	27
PEG3	20	0	64	16
PEG4	20	0	67	13
PEG5	3	0	80	17
<i>E. rudis</i>				
HER1	16	0	80	4
HER2	5	0	92	3
HER3	6	0	89	6
HER4	6	0	91	3
HER5	10	0	86	4
PER1	4	0	92	4
PER2	2	0	94	4
PER3	3	0	91	5
PER4	4	0	92	4

G= ácido gálico, E= ácido elágico. E₁ y E₂= derivados del ácido elágico. Las cantidades relativas de cada uno de los compuestos están expresadas en porcentaje del total de los cuatro picos.

TABLA V.5-2 Cuantificación relativa de los compuestos polifenólicos procedentes de la hidrólisis de los elagitaninos extraídos de corteza de *Eucalyptus spp.*

	G	E ₁	E	E ₂
<i>E. camaldulensis</i>				
HEC1	25	0	69	6
HEC2	28	0	72	0
HEC3	23	0	77	0
HEC4	0	0	100	0
HEC5	15	0	77	8
PEC1	0	0	84	15
PEC2	0	0	100	0
<i>E. globulus</i>				
HEG1	19	0	52	29
HEG2	23	0	50	27
HEG3	17	0	44	39
HEG4	12	0	44	44
HEG5	11	0	46	43
PEG1	22	0	77	1
PEG2	12	0	57	31
PEG3	10	0	42	48
PEG4	8	0	45	47
PEG5	14	0	53	34
<i>E. rudis</i>				
HER1	0	0	100	0
HER2	31	0	69	0
HER3	0	0	100	0
HER4	12	0	88	0
HER5	0	0	100	0
PER1	0	0	100	0
PER2	0	0	100	0
PER3	0	0	100	0
PER4	0	0	100	0

G= ácido gálico, E= ácido elágico. E₁ y E₂= derivados del ácido elágico. Las cantidades relativas de cada uno de los compuestos están expresados en porcentaje del total de los cuatro picos.

TABLA V.5-3 Cuantificación relativa de los compuestos polifenólicos procedentes de la hidrólisis de los elagitaninos extraídos de hojas de *Eucalyptus spp.*

	G	E ₁	E	E ₂
<i>E. camaldulensis</i>				
HEC1	23	31	44	2
HEC2	11	32	57	0
HEC3	28	25	46	0
HEC4	16	29	55	1
HEC5	21	33	44	1
PEC1	17	2	81	0
PEC2	21	3	75	1
<i>E. globulus</i>				
HEG1	14	27	54	5
HEG2	19	28	48	5
HEG3	22	29	44	4
HEG4	23	30	42	5
HEG5	21	21	49	9
PEG1	9	4	81	7
PEG2	15	0	50	34
PEG3	18	27	49	5
PEG4	18	27	49	6
PEG5	14	22	60	4
<i>E. rudis</i>				
HER1	20	12	67	1
HER2	17	12	68	3
HER3	14	22	63	2
HER4	15	32	52	1
HER5	12	2	59	27
PER1	20	9	66	5
PER2	15	18	65	1
PER3	31	12	53	4
PER4	17	28	54	1

G= ácido gálico, E= ácido elágico. E₁ y E₂= derivados del ácido elágico. Las cantidades relativas de cada uno de los compuestos están expresadas en porcentaje del total de los cuatro picos.

TABLA V.5-4 Análisis univariantes de la cuantificación de los compuestos polifenólicos, productos de la hidrólisis de elagitaninos de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.*

PROCEDENCIA	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						ESPECIE	Procedencia	Inter.					
	H			P			H			P			H			P						Difsig/Agrup.	Difsig/Agrup.			
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV								
MADERA																										
G	25,7	11,9	46	22,8	1,3	6	31,3	19,5	62	22,1	10,3	47	14,4	6,7	47	6,6	1,5	23	**	R-CG	NO	-PH-	NO			
E ₁	0,5	0,1	25	0,7	0,2	27	0,1	0,0	18	0,2	0,1	41	0,4	0,1	32	0,4	0,1	38	***	G-R-C	**	H-P	NO			
E	63,6	17,1	27	72,9	0,1	1	58,8	18,8	32	62,8	8,9	14	81,2	6,4	8	88,5	2,0	2	***	GC-R	NO	-HP-	NO			
E ₂	10,2	6,7	68	3,8	1,0	27	9,8	1,5	15	14,9	6,4	93	4,0	1,1	27	4,5	0,7	16	***	RC-G	NO	-HP-	*			
CORTEZA																										
G	28,7	12,8	45	11,9	13,2	110	25,5	6,9	27	20,9	7,9	38	16,3	16,7	103	12,3	3,5	29	NO	-RCG-	NO	-PH-	NO			
E ₁	1,6	1,9	114	6,8	7,3	10	0,3	0,1	47	0,2	1,0	43	2,8	1,7	59	6,8	2,0	29	***	G-CR	***	H-P	*			
E	65,5	10,2	16	67,4	17,4	26	41,8	2,4	6	49,2	10,2	21	78,0	17,1	22	74,0	7,5	10	***	G-CR	NO	-HP-	NO			
E ₂	4,1	2,9	72	14,0	3,1	22	32,4	7,9	24	29,7	17,9	66	2,8	1,7	59	6,8	2,0	29	***	RC-G	NO	-HP-	NO			
HOJAS																										
G	31,5	10,53	33	29,3	4,1	14	29,5	4,9	17	23,2	5,9	26	23,3	5,2	22	28,8	10,7	37	NO	-RCG-	NO	-PH-	NO			
E ₁	25,8	3,75	15	2,4	0,1	2	23,7	2,7	11	14,7	11,2	76	14,8	11,0	75	15,4	0,5	55	NO	-CRG-	***	P-H	**			
E	42,0	8,11	19	67,4	4,7	7	41,8	5,2	13	51,9	14,1	27	55,6	3,9	7	52,8	8,4	16	NO	-GRC-	***	H-P	**			
E ₂	0,8	0,73	97	0,9	0,6	71	5,0	1,7	33	10,2	11,2	110	6,3	10,5	66	2,9	2,1	71	NO	-CRG-	NO	-HP-	NO			

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza. 10% \geq * \geq 5%, 5% \geq ** \geq 1%, 1% \geq ***. x= media. σ = desviación estándar. CV= coeficiente de variación. H= Huelva. P= Pontevedra. G= ácido gálico. E= ácido elágico. E₁ y E₂= derivados de ácido elágico.

siendo este último el componente principal (tablas V.5-1 y V.5-4). Estos resultados están de acuerdo con los datos disponibles en la bibliografía sobre la composición polifenólica de la madera de *Eucalyptus spp.* Así, han sido identificados los elagitaninos, pedunculagina, 2,3-HHDP-glucosa, 4,6-HHDP-glucosa, 3,6-HHDP-glucosa y corilagina (Seikel y Hillis, 1970; Yazaki y Hillis, 1976; Yazaki et al., 1993), en la madera de diferentes especies entre las que se ha considerado *E. globulus*, donde particularmente han sido detectados los dos primeros elagitaninos mencionados. Todos estos compuestos se caracterizan por presentar en su estructura polifenólica, exclusivamente, grupos galoilo y hexahidroxidifenoilo y por tanto los productos de la hidrólisis serían los ácidos gálico y elágico, respectivamente.

En el caso de las cortezas, los productos de la hidrólisis de los elagitaninos resultaron ser algo más variables. Así, mientras que en *E. camaldulensis* y *E. rudis*, al igual que ocurrió en las maderas, los elagitaninos producen mediante hidrólisis los ácidos gálico y elágico, este último incluso en exclusividad (100%) en muchas de las muestras analizadas, en la especie *E. globulus* se ha detectado, además, el compuesto E2, derivado monometilado del ácido elágico, presentándose en proporciones semejantes a las del propio ácido elágico y superiores, por otra parte, a las del ácido gálico. Este tipo de cromatograma resultó ser característico de los hidrolizados de elagitaninos de corteza de *E. globulus* (fig.V.5-1b, tablas V.5-2 y V.5-4). Precisamente también en corteza de *E. globulus*, Yazaki y Hillis (1976) han puesto de manifiesto la presencia de derivados metilados y glicosilados del ácido elágico, además de los elagitaninos pedunculagina y 2,3-HHDP-glucosa, presentes también en madera de *Eucalyptus spp.* y cuya composición polifenólica es exclusivamente ácido elágico.

En cuanto a los hidrolizados de elagitaninos procedentes de las hojas de *Eucalyptus spp.*, se caracterizan por la presencia de ácido gálico, ácido elágico, y el derivado del ácido elágico E1. Este último compuesto se considera característico de las muestras de hojas de *Eucalyptus* (fig.V.5-3, tablas V.5-3 y V.5-4), ya que se obtuvo en este órgano en

las tres especies estudiadas y, por otra parte, no fue detectado en los hidrolizados de las muestras de madera y corteza.

En lo que a los datos de la bibliografía se refiere, como ya se ha comentado en el apartado 2.9 de la Introducción, en hojas de *E. rostrata* fueron identificados sólo los elagitaninos 1,2,6-tri-D-galoil- β -D-glucosa (Nonaka *et al.*, 1982; Wilkins, 1988) y tellimagrandina (Wilkins y Bohn, 1976; Hatano *et al.*, 1988b), los cuales contienen exclusivamente ácido gálico y ácido elágico. Sin embargo, los elagitaninos identificados en frutos de *E. alba* responden a una amplia variedad de estructuras moleculares y, así, en su composición polifenólica intervienen, además de dichos ácidos, los grupos valoneoilo y tergaloilo, como es el caso de las eucalbaninas A, B y C (Yoshida *et al.*, 1992b), la oenoteína B (Hatano *et al.*, 1990) y la cornusiina B (Hatano *et al.*, 1989).

5.2 Análisis de azúcares por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Los azúcares originados en la hidrólisis de los elagitaninos extraídos de madera, corteza y hojas se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para lo cual dichos azúcares tuvieron que ser transformados en los trimetilsilil-derivados, según los métodos especificados en el apartado IV.4.3.2.2 y IV.4.3.2.3.

Previamente se abordó el análisis de los azúcares presentes en algunos de los extractos acuosos liofilizados, antes de que fueran sometidos a hidrólisis ácida, comprobándose la presencia de glucosa en los mismos. Ante estos resultados se hizo necesario un pretratamiento de la muestra a analizar, con el objeto de obtener extractos libres de azúcares y poder así asegurar que los detectados después de la hidrólisis ácida, procedían efectivamente de los elagitaninos.

Los análisis de identificación de los azúcares hubieron de realizarse, pues, en el extracto obtenido con acetato de etilo a partir de la fase acuosa liofilizada (apartado

IV.4.3.2.1). Según se comprobó mediante análisis por cromatografía líquida (CLAR), con acetato de etilo, se extraían de forma selectiva los elagitaninos y también algunas proantocianidinas de bajo peso molecular, en el caso de las muestras de madera y corteza; y en el caso de las hojas, junto con los elagitaninos se extrajeron los flavonoles, presentes específicamente en dicho extracto acuoso. En las figuras V.5-4 y V.5-5, se muestran algunos ejemplos de los cromatogramas de CLAR, obtenidos de los extractos en acetato de etilo procedentes de madera, corteza y hojas, y que han sido resueltos utilizando las condiciones de análisis descritas en el apartado IV.3.1 (gradiente nº 1).

En concreto, el estudio sobre la caracterización de los glúcidos de los elagitaninos de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.* se llevó a cabo, para cada una de las especies y procedencias estudiadas, a partir de dos muestras, siguiendo el procedimiento de trabajo esquematizado en el apartado IV.4.3.2.1 y llevándose a cabo análisis en paralelo tanto de las muestras sometidas a hidrólisis ácida, como de las muestras sin hidrolizar; en este último caso, con objeto de comprobar la ausencia de azúcares libres en los extractos en acetato de etilo.

La separación de los azúcares se realizó por cromatografía de gases y la identificación por espectrometría de masas acoplada. En las figuras V.5-6 y V.5-7 se muestran los cromatogramas de m/z 204 obtenidos para la madera, corteza y hojas de las diferentes especies de *Eucalyptus*, ya que los azúcares, bajo las condiciones de análisis utilizadas, se presentaron en su mayoría bajo la forma piranosa.

Los cromatogramas de gases obtenidos a partir de los hidrolizados de elagitaninos de todas las muestras de madera y de corteza han resultado muy similares, obteniéndose cuatro picos principales. Los dos picos mayoritarios, con t_R de 10,16 y 14,08 min, han correspondido a la glucosa y los menos abundantes de t_R 10,24 y 11,04 min, a la ramnosa, tratándose en los dos casos de la forma de ciclación piranosa, como se pudo deducir de los correspondientes espectros de masas y en base a la abundancia relativa de los picos

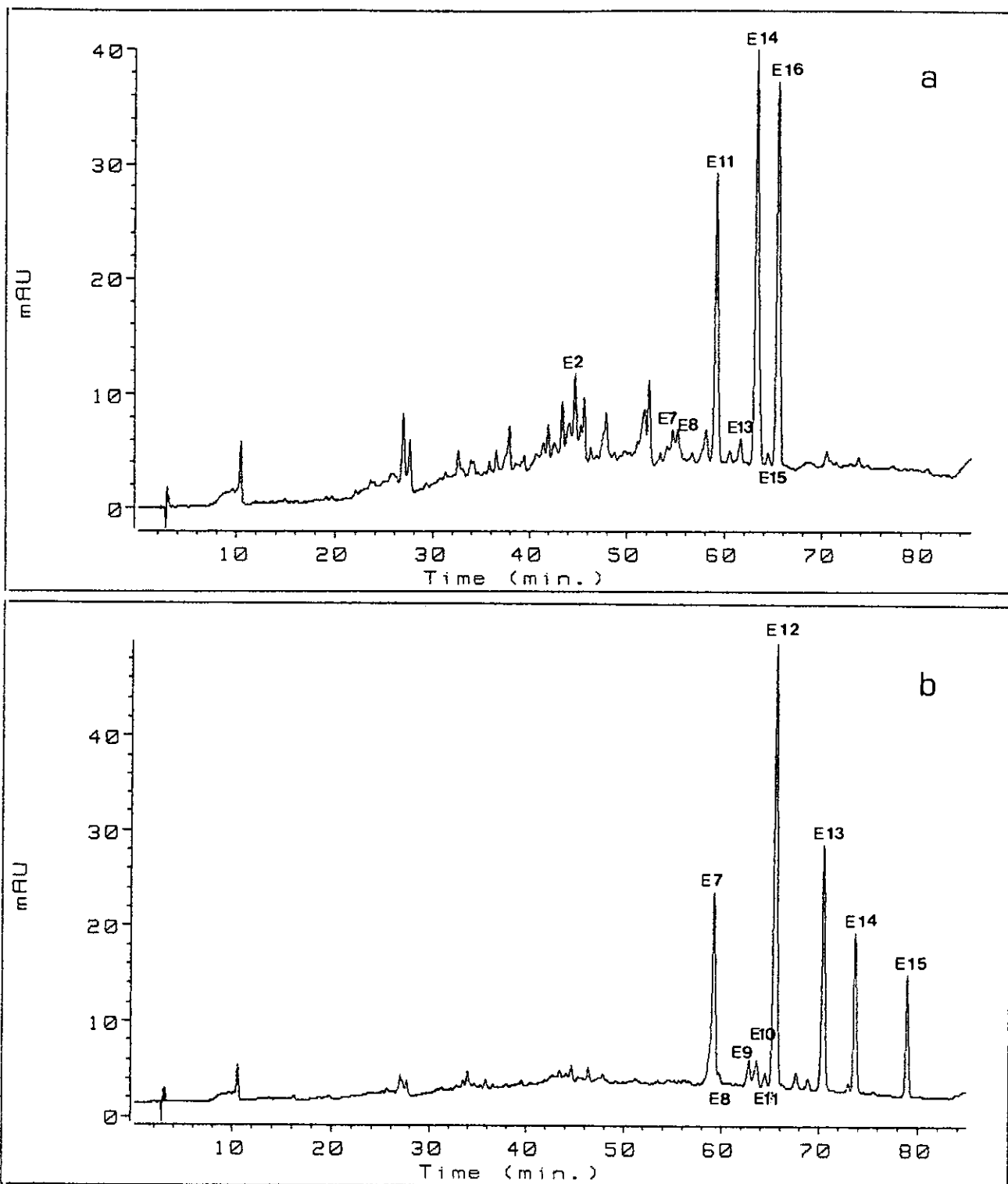


FIGURA V.5-4 Ejemplos de cromatogramas de los extractos en acetato de etilo procedentes de madera (a) y corteza (b) de *Eucalyptus spp.* a= HEG5, b= HEG2. E= elagitanino. P= proantocianidina. Absorbancia 325 ± 75 nm.

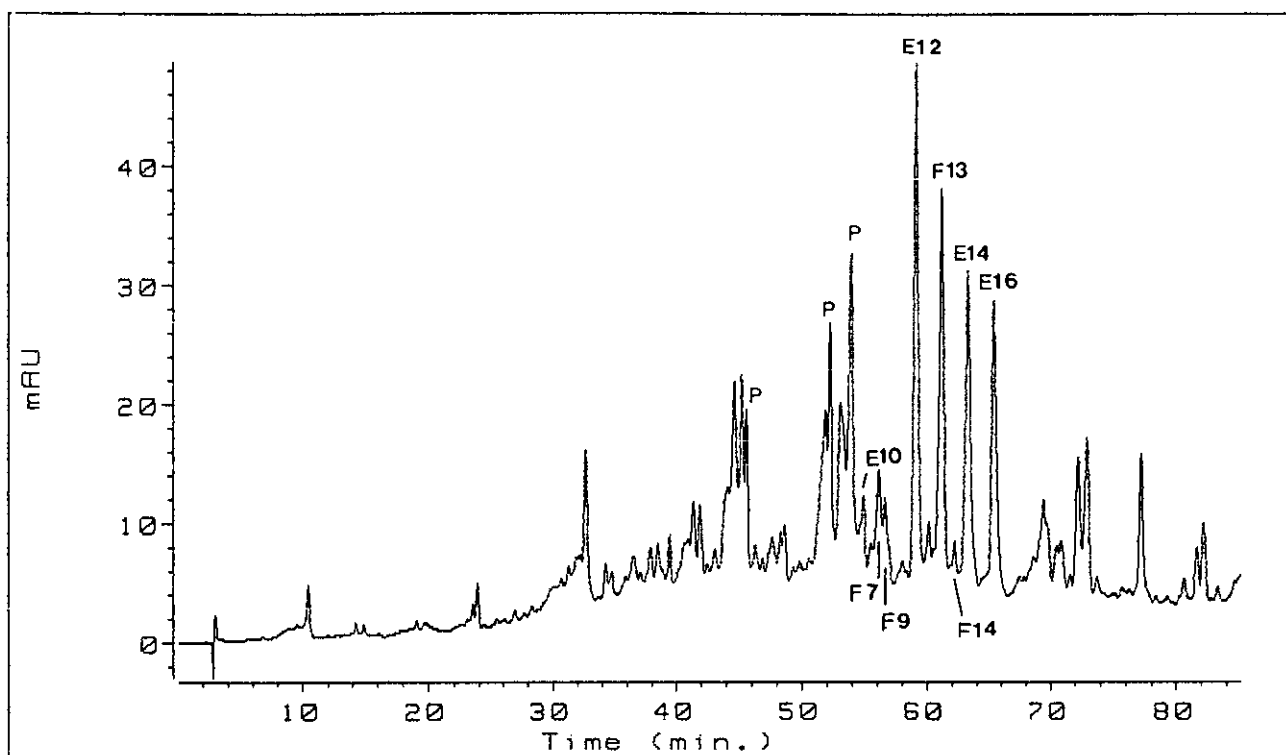


FIGURA V.5-5 Ejemplo de cromatograma de los extractos en acetato de etilo procedentes de hojas de *Eucalyptus spp.* (HEG5). E= elagitanino. F= flavonol. P= proantocianidina. Absorbancia 325±75 nm.

de m/z de 204 y 217 (fig. V.5-8). Es de destacar, por otra parte, que en las muestras de corteza se ha obtenido, en general, una mayor proporción de ramnosa que en las de madera.

Los elagitaninos predominantes en las maderas y cortezas estudiadas son pues derivados glucosilados, presentándose también ramnosidos, aunque en mucha menor proporción. Estos resultados están de acuerdo con los datos disponibles en la literatura sobre la composición de elagitaninos del género *Eucalyptus*, por otra parte muy escasos. Como se ha descrito en el capítulo 2.9 de la Introducción, todos los elagitaninos de estructura conocida hasta el momento, detectados en madera y corteza de eucaliptos, contienen glucosa exceptuando el elagitanino 3-Me-AE-ramnósido, obtenido de corteza

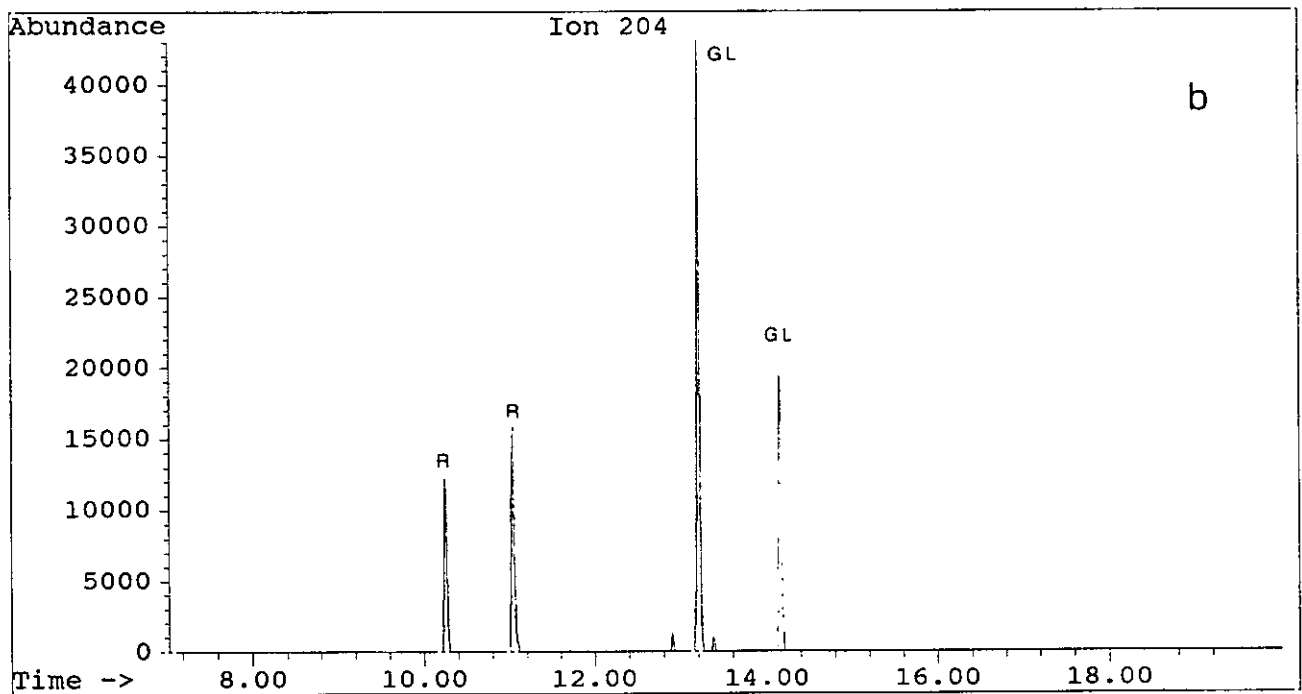
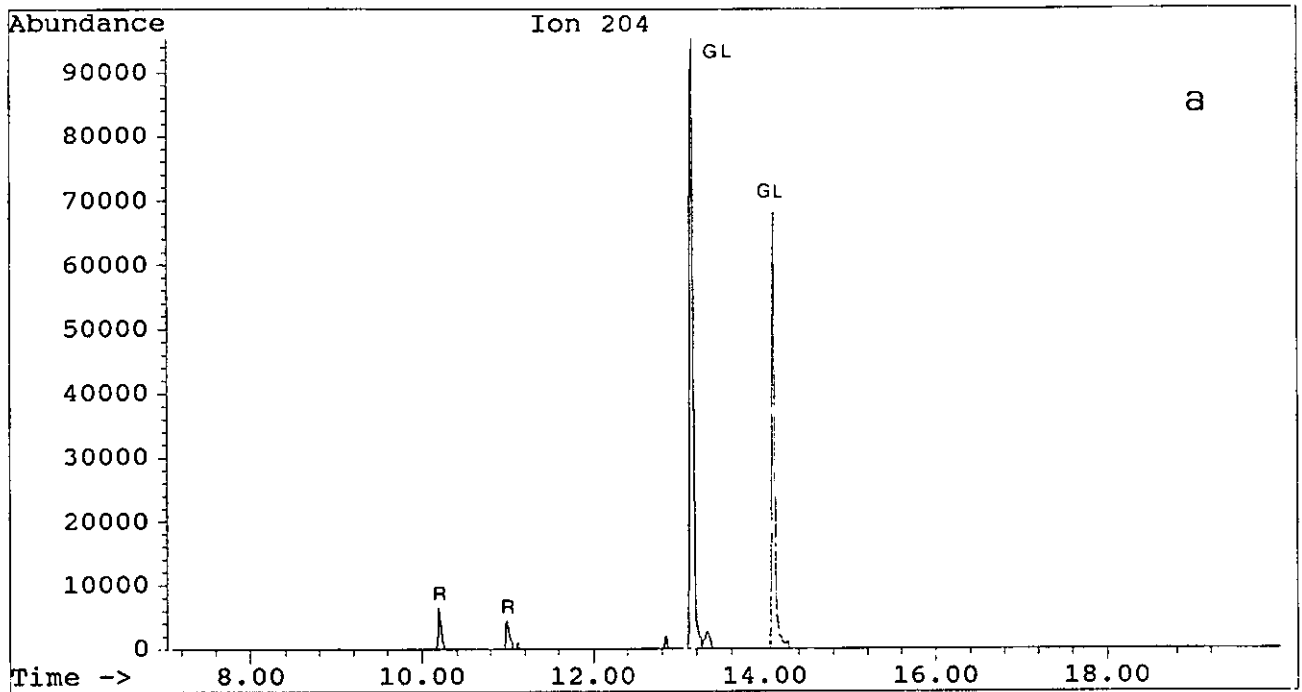


FIGURA V.5-6 Cromatograma CG-EM de los TMS-azúcares de madera (a) y de corteza (b), obtenidos mediante el ión de m/z 204. GL= glucosa. R= ramnosa. a=HER1. b= HEG2.

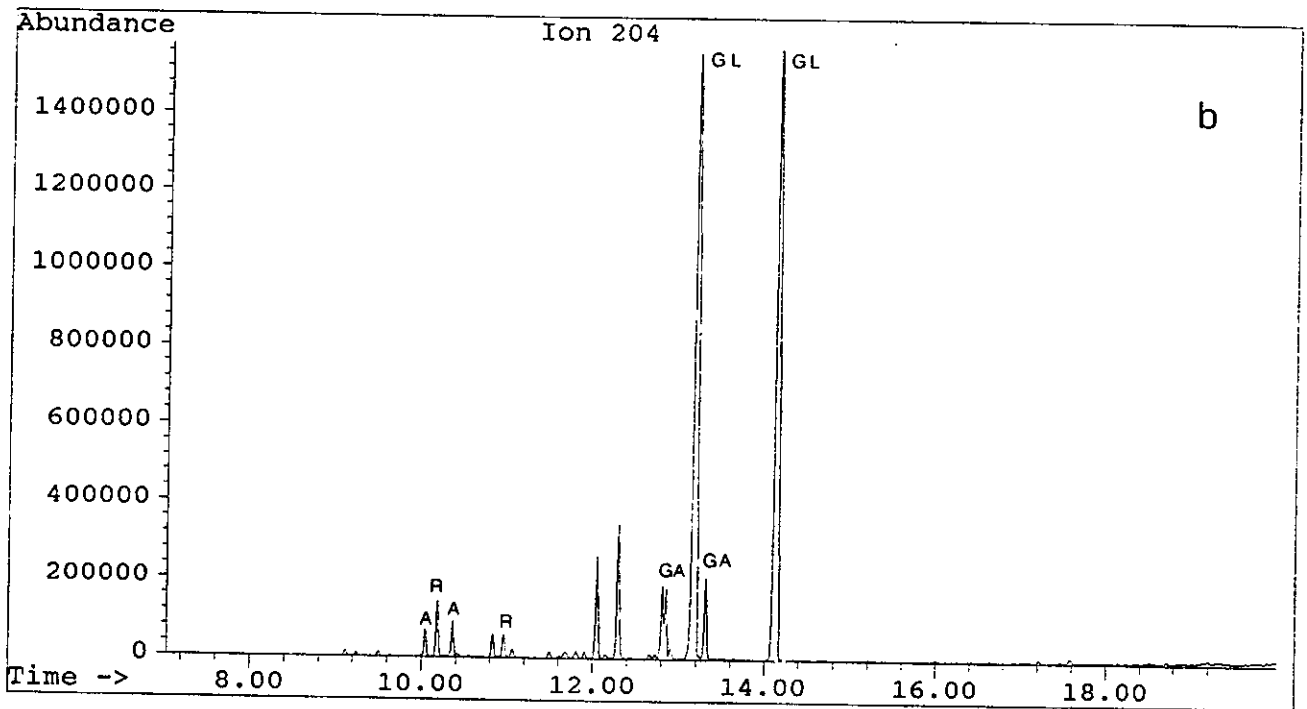
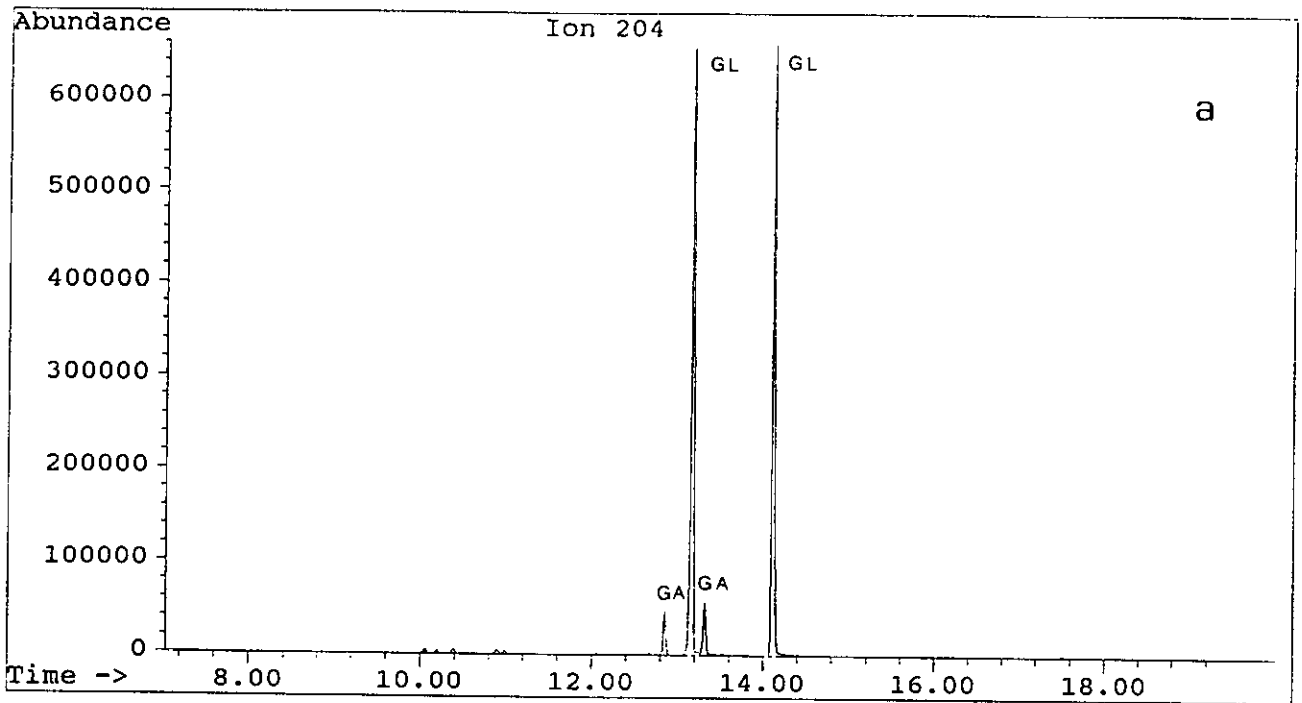


FIGURA V.5-7 Cromatograma CG-EM de los TMS-azúcares de hojas, obtenidos mediante ión de m/z 204. GL= glucosa. GA= galactosa. R= ramnosa. A= arabinosa. a= HER5. b= HEC3.

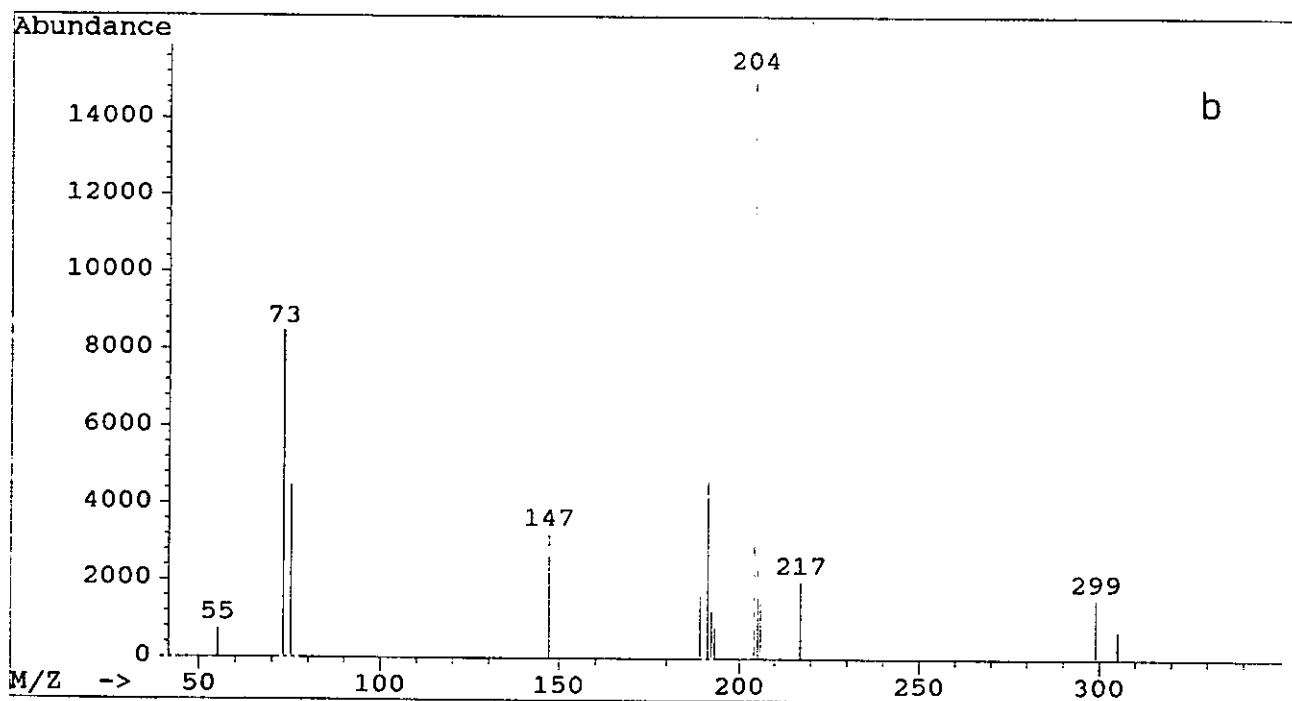
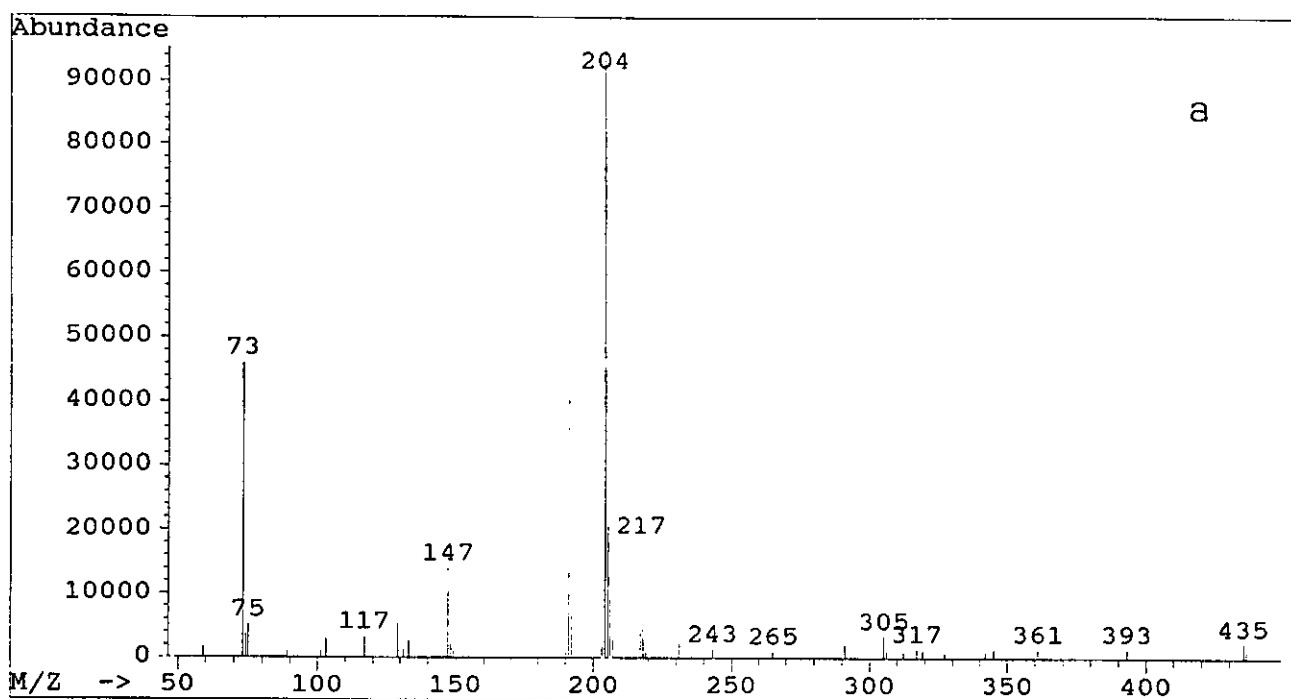


FIGURA V.5-8 Espectros de masas de los TMS-derivados de la glucosa (a) y de la ramnosa (b) en su forma piranosa.

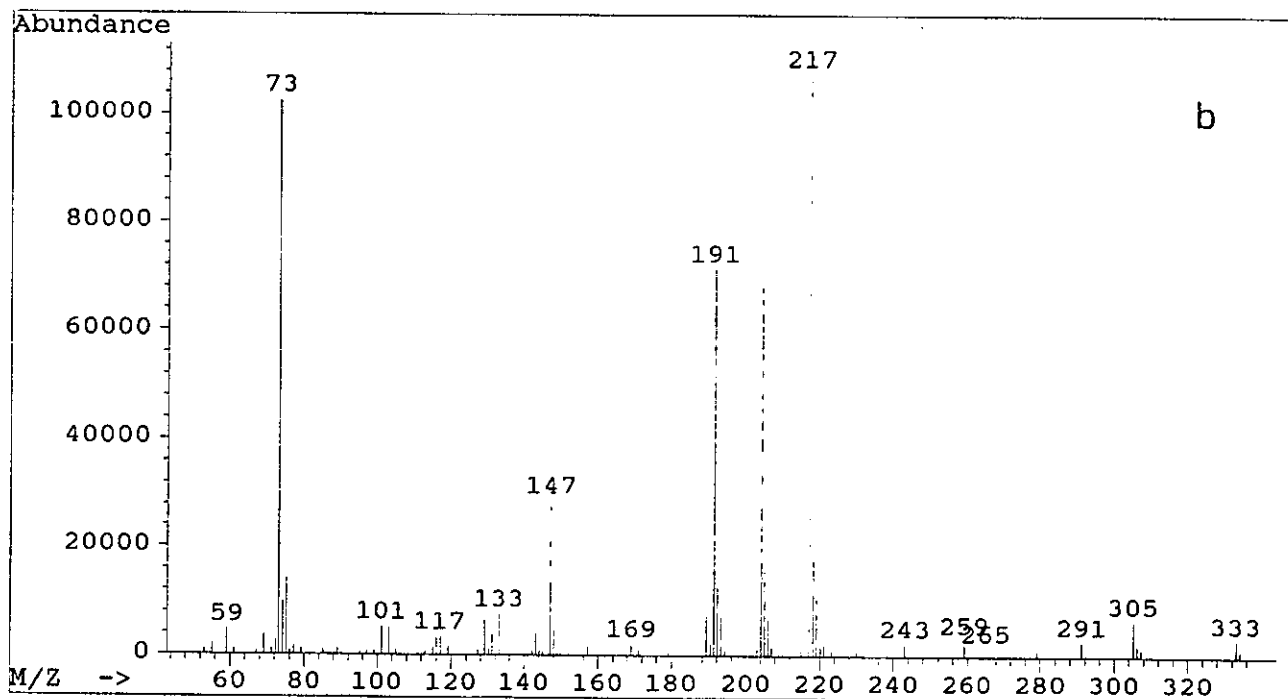
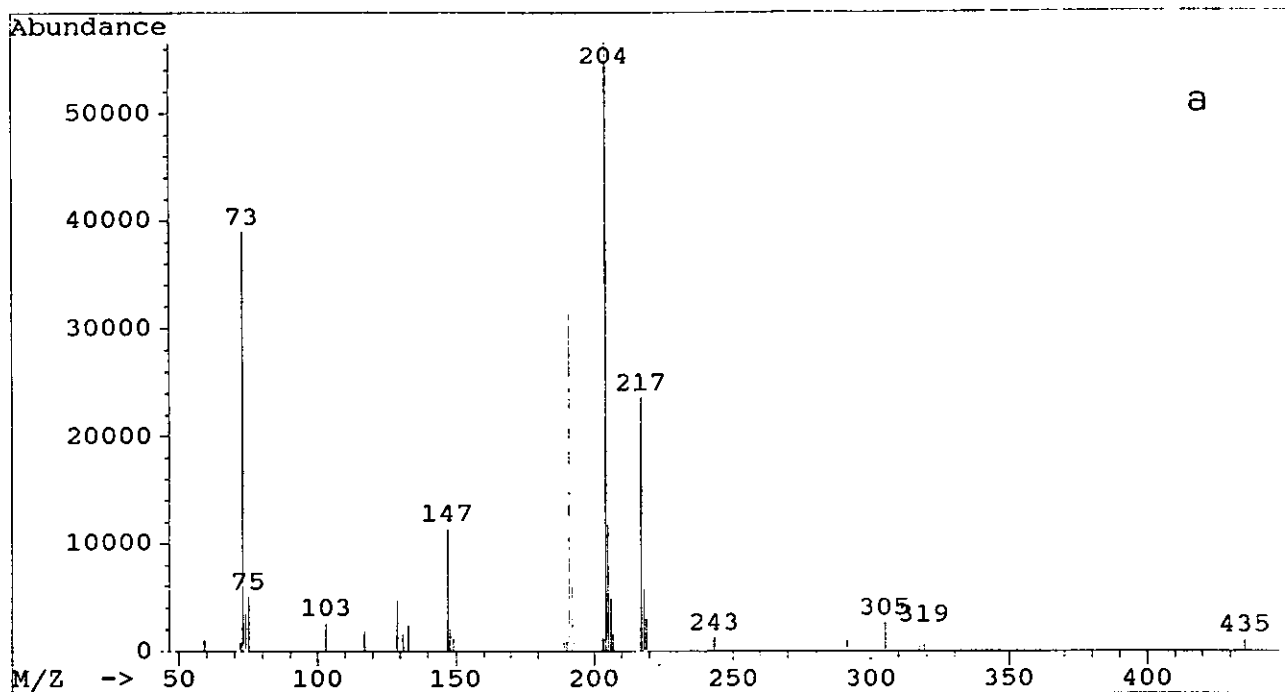


FIGURA V.5-9 Espectro de masas de los TMS-derivados de la galactosa (a) en su forma de ciclación piranosa y de la arabinosa (b) en su forma furanosa.

de *E. globulus* y *E. regnans* (Yazaki y Hillis, 1976). Por otra parte, en hidrolizados procedentes de extractos de taninos de corteza de diferentes especies de *Eucalyptus* ha sido descrita la presencia de glucosa, ramnosa y arabinosa, aunque no se hayan asociado a una estructura determinada de elagitanino (Fechtal y Riedl, 1991).

En lo que respecta a los hidrolizados procedentes de los extractos de hojas, la composición en azúcares varió considerablemente de unas muestras a otras. Es preciso considerar que en el extracto en acetato de etilo de las hojas, se extraían, además de los elagitaninos, derivados glicosilados de flavonoles (fig. V.5-5); y así los azúcares liberados en la hidrólisis ácida pueden proceder tanto de dichos derivados glicosilados como de los elagitaninos.

En la figura V.5-7 se presentan algunos cromatogramas modelo de hojas de diferentes especies y procedencias. En el primero (cromatograma a), representativo de los extractos de composición más simple en los que, por otra parte, se da una escasa presencia de derivados glicosilados de flavonoles, se ha identificado solo glucosa y galactosa; y en el segundo tipo de cromatograma (cromatograma b), común entre muestras en las cuales sí se detecta una importante variedad de derivados glicosilados de flavonoles, se han identificado glucosa, arabinosa, ramnosa y galactosa.

Cada uno de los azúcares obtenidos ha dado lugar, bajo nuestras condiciones de análisis, a dos picos cromatográficos, cuyos tiempos de retención y forma de ciclación se especifican en la tabla V.5-5.

En resumen, la glucosa parece ser el principal azúcar constituyente de los elagitaninos de hojas de las especies de *Eucalyptus* estudiadas, ya que ha resultado ser mayoritario en los hidrolizados procedentes tanto de muestras pobres como ricas en derivados glicosilados de flavonoles; y, por otra parte, la presencia de arabinosa y ramnosa, además de parte de la glucosa, puede ser justificada como procedente de la

hidrólisis de dichos derivados glicosilados de flavonoles, como se verá en el capítulo V.7.

Por último, la galactosa detectada en los hidrolizados de algunas muestras, aunque en mucha menor proporción que la glucosa, podría ser también azúcar constituyente de los elagitaninos; por otra parte, entre el escasísimo número de trabajos publicados sobre

TABLA V.5-5 Tiempo de retención y forma de ciclación de los azúcares analizados mediante CG-EM

	t_R (min)	Ciclación
Arabinosa	10,04	Furanosa
	10,36	Furanosa
Ramnosa	10,24	Piranososa
	11 04	Piranososa
Galactosa	12,85	Piranososa
	13,31	Piranososa
Glucosa	13,16	Piranososa
	14,08	Piranososa

la estructura de los elagitaninos de hojas en el género *Eucalyptus*, sólo se han citado elagitaninos, cuyo azúcar constituyente es la glucosa (Nonaka *et al.*, 1981; Hatano *et al.*, 1988b).

5.3 Conclusiones.

- 1- Los elagitaninos de las muestras de madera de las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas: *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* están compuestos principalmente por glucósidos de los ácidos polifenólicos gálico y elágico. Ha sido detectada también, aunque en mucha menor proporción, la presencia de ramnósidos y, por otra parte, de glicósidos de derivados monometilados del ácido elágico.

- 2- En lo que respecta a la composición de la corteza de *Eucalyptus spp.*, se ha puesto de manifiesto que, al igual que ocurría en la madera, los elagitaninos de la corteza de las especies de *Eucalyptus* estudiadas están constituidos en su mayoría por glucósidos y, en menor proporción, por ramnósidos de los ácidos gálico y elágico. La corteza de la especie *E. globulus* se caracteriza, en particular, por la presencia de glicósidos de derivados monometilados del ácido elágico, los cuales no han sido detectados en las cortezas de *E. camaldulensis* y *E. rudis*, aunque fueron encontrados en pequeña proporción en la madera de las tres especies consideradas.

- 3- Los elagitaninos constituyentes de las hojas de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* se caracterizan por presentar en su estructura molecular polifenólica, derivados del ácido elágico no presentes en los elagitaninos procedentes de la madera y de la corteza, presumiblemente grupos valoneoilo o grupos tergaloilo (entre sí isómeros de posición). Por otra parte, la glucosa ha resultado ser el azúcar constituyente principal de dichos elagitaninos.

6. Caracterización de proantocianidinas.

Las variaciones estructurales en las moléculas de las proantocianidinas dependen, como ya ha sido discutido ampliamente en la Introducción, de los patrones de hidroxilación de las unidades que los constituyen, de la naturaleza de los enlaces interflavánicos y de la estereoquímica de los centros quirales del anillo C, siendo, en particular, los patrones de hidroxilación de los anillos A y B de las unidades flavan-3-ol, los determinantes de la reactividad química de estos taninos condensados y, así, de su potencial aplicación en la industria química.

Por otra parte, para poder determinar la naturaleza de las unidades estructurales

de las proantocianidinas es esencial acometer su degradación y son, precisamente, las reacciones de ruptura del enlace interflavánico de gran utilidad en la elucidación de la estructura de los taninos condensados. Dentro de este tipo de reacciones degradativas se pueden considerar algunas de especial utilidad, entre las que cabe destacar aquellas que conducen a la formación de antocianidinas y que son llevadas a cabo mediante la ruptura oxidativa del enlace interflavánico, ya sea en medio alcohólico acidificado o en medio ácido débil y en presencia de nucleófilos tales como tioles y floroglucinol (ver apartado 2.3.2.3 de Introducción).

Concretamente, en este trabajo, hemos abordado el estudio de la composición del conjunto de los polímeros proantocianidinas, mediante el análisis por CLAR de las antocianidinas generadas en la hidrólisis, en medio BuOH-HCl, de los extractos acuosos liofilizados de madera, corteza y hojas de los eucaliptos considerados, según fue descrito en los apartados IV.5.1 y IV.5.2.

En la figura V.6-1, se muestra un cromatograma modelo, correspondiente al hidrolizado de proantocianidinas obtenido de corteza de *E. globulus*. El registro se ha realizado a la longitud de onda de 525 nm, específica de antocianidinas, evitándose así que se produzca la interferencia de otros productos de degradación.

Las antocianidinas, generadas por hidrólisis oxidativa de las proantocianidinas de madera, corteza y hojas de *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* e identificadas directamente por CLAR en base a los espectros UV-VIS y a los tiempos de retención, han resultado ser la delfinidina y la cianidina, como se muestra en las figuras V.6-1 y V.6-2. Por tanto, en principio, las proantocianidinas poliméricas de *Eucalyptus spp.*, están constituidas esencialmente de procianidinas y prodelfinidinas, aunque no se haya podido llegar a determinar si dichos polímeros se presentan como copolímeros de procianidinas y prodelfinidinas, o como polímeros de cada una de ellas por separado.

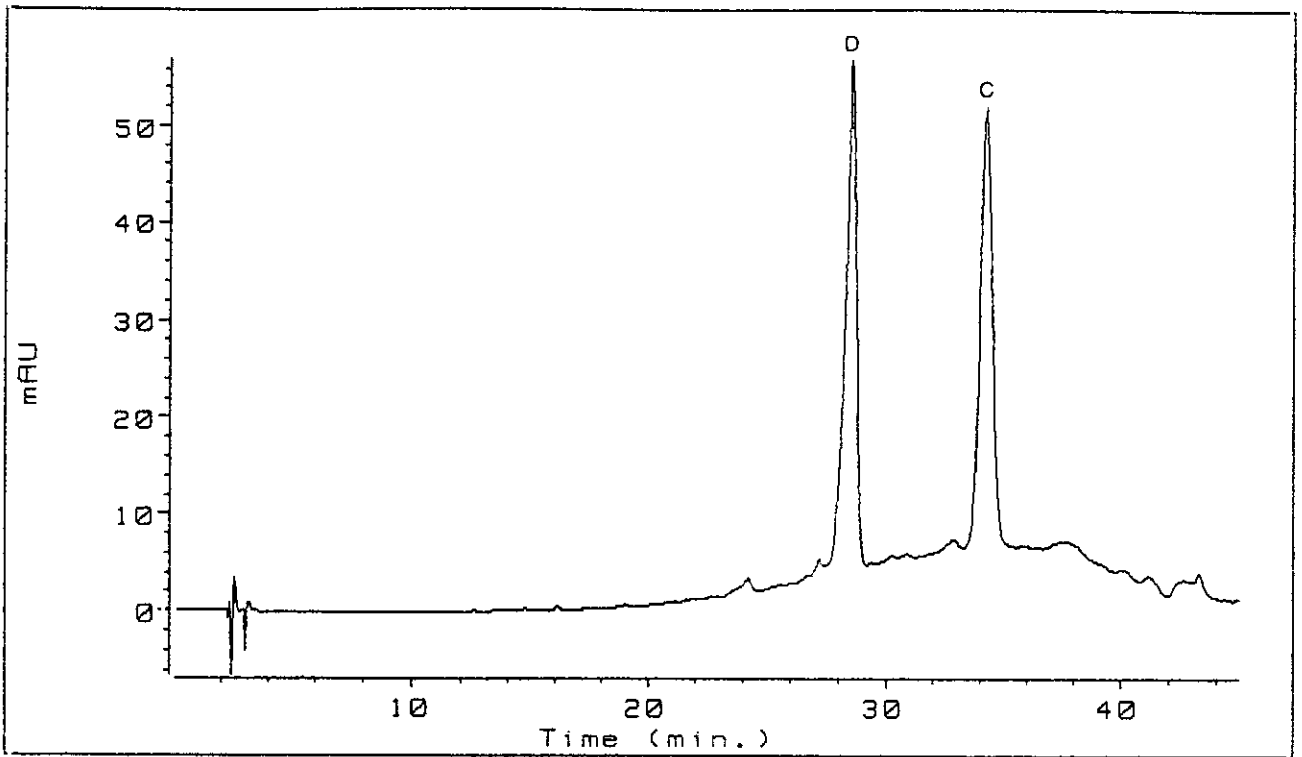


FIGURA V.6-1 Cromatograma de CLAR de los extractos de proantocianidinas hidrolizadas de corteza de *E. globulus* (HEG2). D= delphinidina. C= cianidina.

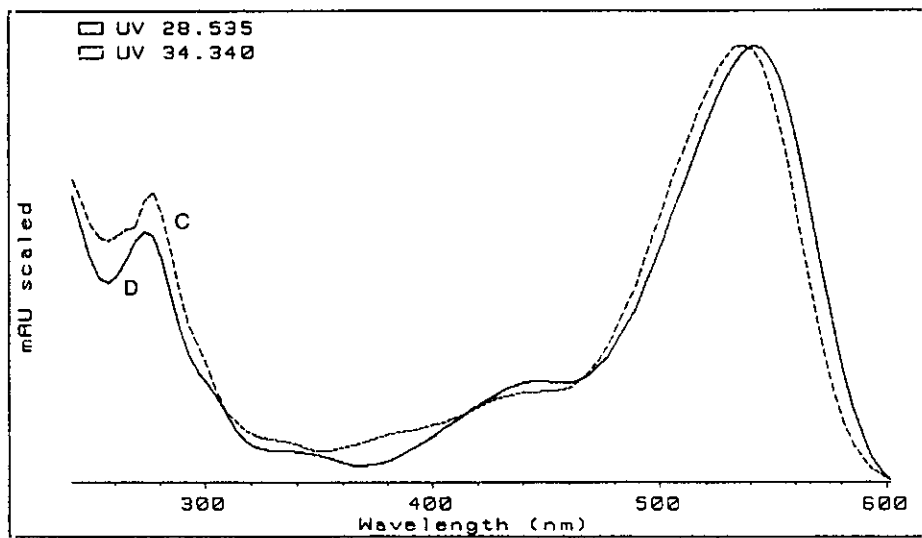


FIGURA V.6-2 Espectros UV-VIS de los picos D y C de la figura V.6-1.

Los patrones de hidroxilación de procianidinas y prodelfinidinas, como hemos descrito anteriormente en la figura II.6 de la Introducción, son respectivamente 3, 3', 4', 5, 7 y 3, 3', 4', 5, 5', 7 y, así, pues las unidades flavan-3-ol constituyentes de las cadenas poliméricas de las proantocianidinas, la catequina y la galocatequina (fig. II.5). Como consecuencia dichas proantocianidinas contienen los anillos A de tipo floroglucínico y los anillos B de tipo catecol (procianidinas) o pirogalol (prodelfininas) (fig. II.9).

La ruptura oxidativa del enlace interflávico de las proantocianidinas no da, sin embargo, información sobre la naturaleza del propio enlace interflavínico y de su estereoquímica, ni tampoco acerca de la estereoquímica de los carbonos asimétricos C-2 y C-3 (ver apartado II.2.2.2.1). Es así posible que las unidades constituyentes de las cadenas poliméricas no sólo pudieran ser la catequina y galocatequina (esteroisómeros 2R y 3S), sino también los correspondientes esteroisómeros epicatequina y epigalocatequina (2R y 3R) y/o los correspondientes enantiómeros 2S, nombrados con el prefijo *ent*- (fig. II.7), como ya se mencionó en el apartado II.2.2.2.1.

Con objeto de obtener información sobre todas estas cuestiones, así como sobre la naturaleza de las unidades iniciales y las unidades de extensión de los polímeros, se ha realizado la hidrólisis del enlace interflavínico en medio ácido débil, en ausencia de oxígeno, y en presencia de diferentes nucleófilos, en particular tioles y floroglucinol. En general, este tipo de reacciones son selectivas y respetan la estereoquímica de C-2 y C-3 (fig. II.17) (apartado II.2.3.2.3), pero suelen dar un bajo rendimiento y, por otra parte, no se debe prolongar el tiempo de reacción, aún en ausencia de oxígeno, ya que pueden producirse epimerizaciones.

A pesar de que hemos ensayado varios nucleófilos (floroglucinol, fenilmetanotiol) y medios y condiciones de reacción diferentes, no se ha llegado a conseguir una degradación efectiva de los enlaces interflavínicos. Así, el análisis de los productos de degradación, mediante CLAR, no puso de manifiesto la presencia de monómeros de la

familia de las catequinas.

Posiblemente, las dificultades de degradación bajo dichas condiciones sean debidas, en primer lugar, a la abundancia en los extractos de oligómeros de alto peso molecular, y también a que la hidrólisis se aplica directamente en el extracto bruto liofilizado, sin el previo aislamiento y purificación de cada uno de los polímeros. Dichas reacciones han sido descritas en la bibliografía, aplicadas a oligómeros de bajo peso molecular de 2 a 4 unidades y, además, purificados (Kolodziej, 1990; Rigaud *et al.*, 1991; Koupai-Abyazani *et al.*, 1993; Escribano-Bailón, 1993) pero no a oligómeros de 5 ó más unidades.

Finalmente, los resultados concernientes a la composición de los polímeros de proantocianidinas, expresados como relación delfinidina-cianidina para cada uno de los tipos de muestras, madera, corteza y hojas de las tres especies de *Eucalyptus* consideradas se muestran en la tabla V.6-1 y se discuten a continuación:

Madera. La relación delfinidina/cianidina de las proantocianidinas obtenidas de madera ha oscilado entre 5/95 y 42/58, siendo la excepción la muestra HEG5 de *E. globulus* de Huelva, en la que resultó ser 50/50. Estos datos indican que las procianidinas son las unidades predominantes en este tipo de polímeros (tabla V.6-1).

Por otra parte, esta relación resultó considerablemente variable para las diferentes especies estudiadas. En cuanto a la proporción de cianidina, se han obtenido valores significativamente superiores en los taninos condensados de la madera de *E. camaldulensis* y *E. rudis*, respecto de *E. globulus*; siendo esta última especie, la que ha presentado mayor variabilidad intraespecífica. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas según la procedencia de las muestras (tabla V.6-2).

Corteza. La composición de las proantocianidinas de las cortezas de *Eucalyptus spp.* varió considerablemente según la especie, al igual que lo ocurrido en madera. Mientras

Tabla V.6-1 Cuantificación relativa de las antocianidinas producidas por hidrólisis en BuOH-HCl, de las proantocianidinas de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.*

	MADERA		CORTEZA		HOJAS	
	D	C	D	C	D	C
<i>E. camaldulensis</i>						
HEC1	5	95	6	94	39	61
HEC2	31	69	10	90	25	75
HEC3	9	91	7	93	32	68
HEC4	8	92	17	83	36	64
HEC5	7	93	6	94	25	75
PEC1	12	88	38	62	72	28
PEC2	29	71	25	75	71	29
<i>E. globulus</i>						
HEG1	38	62	70	30	59	41
HEG2	25	75	53	47	58	42
HEG3	37	63	63	37	44	56
HEG4	25	75	64	36	57	43
HEG5	50	50	64	36	50	50
PEG1	30	70	9	91	40	60
PEG2	28	72	62	38	40	60
PEG3	42	58	69	31	44	56
PEG4	17	83	56	44	49	51
PEG5	37	63	71	29	44	56
<i>E. rudis</i>						
HER1	26	74	8	92	47	53
HER2	26	74	8	92	32	68
HER3	21	79	25	75	50	50
HER4	24	76	10	90	40	60
HER5	26	74	9	91	24	76
PER1	20	80	—	—	30	70
PER2	14	86	—	—	41	59
PER3	13	87	—	—	35	65
PER4	17	83	—	—	33	67

D= delfinidina. C= cianidina.

Las cantidades relativas de cada antocianidina están expresadas como porcentaje del total.

TABLA V.6-2 Análisis univariante de los valores relativos de delfinidina y cianidina en los hidrolizados de proantocianidinas de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.*

	<i>E. camaldulensis</i>						<i>E. globulus</i>						<i>E. rudis</i>						Especie	Procedencia		Int.		
	H			P			H			P			H			P				Dif.sig./Agrup.	Dif.sig./Agrup.			
	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV	x	σ	CV						
MADERA																								
D	12	11	87	20	12	57	35	11	30	31	11	36	25	2	9	18	3	21	***	CR-G	NO	-PH-	NO	
C	87	11	12	80	12	15	65	11	16	69	11	16	75	2	3	84	3	4						
CORTEZA																								
D	9	5	53	32	9	30	63	8	10	53	25	48	12	7	61	-	-	-	***	R-C-G	--	-	-	
C	91	5	5	68	9	14	37	8	16	47	25	55	88	7	8	-	-	-						
HOJAS																								
D	31	8	20	72	1	1	53	8	12	43	4	9	36	10	27	35	5	14	***	R-GC	***	H-P	***	
C	69	8	9	28	1	2	47	8	13	57	4	7	64	10	15	65	5	7						

Dif.sig./Agrup.= diferencias significativas/agrupamiento entre especies o procedencia por semejanza. $10\% \geq * \geq 5\%$, $5\% \geq ** \geq 1\%$, $1\% \geq ***$.

Int.=interacción.

C= cianidina.

D= delfinidina.

H= Huelva.

P= Pontevedra.

x= media.

σ = desviación estándar.

CV= coeficiente de variación.

que las procianidinas resultan ser las unidades predominantes de los polímeros de corteza de *E. camaldulensis* (D/C, 9/91 y 32/68) y *E. rudis* (D/C, 12/88), en *E. globulus* (D/C, 63/37 y 53/47) predominan las prodelfinidinas con la excepción de la muestra PEG1 de Pontevedra (D/C, 9/91), como se muestra en las tablas V.6-1 y V.6-2.

Es de señalar que, en el caso de las muestras de corteza de *E. rudis* procedentes de Pontevedra no ha sido posible la detección de las antocianidinas cianidina y delfinidina. Ello parece ser debido, por una parte, a la pobreza en proantocianidinas de estas muestras, como han mostrado los análisis de valoración cuantitativa realizados tanto mediante el método de la vainillina (apartado V.2.2) como por CLAR (apartado V.3.3) y, por otra, a causa del bajo rendimiento en antocianidinas, inherente al método de la hidrólisis en medio BuOH-HCl.

Hojas. En el caso de hojas de *Eucalyptus spp.* las proantocianidinas extraídas presentaron relaciones delfinidina/cianidina oscilando entre 25/75 y 72/28, lo que supone que tanto las procianidinas como las prodelfinidinas pueden ser las unidades predominantes de estos polímeros, según la muestra.

Ha sido observada una importante variación de composición, según la especie considerada y, además, dentro de cada especie según el origen de las muestras (tabla V.6-1). Así, mientras que en hojas de *E. camaldulensis* las procianidinas han sido mayoritarias en las muestras procedentes de Huelva, en las de Pontevedra predominan las prodelfinidinas, presentándose altos niveles de significación (tabla V.6-2). Por el contrario en *E. globulus*, son las muestras originarias de Huelva las que han presentado mayor proporción de prodelfinidinas, aunque, en general, en esta especie la relación D/C, se aproxima a 50/50.

Por último, en el caso de la especie *E. rudis*, tanto las hojas procedentes de Huelva como las de Pontevedra contienen mayor proporción de procianidinas y, además, en

cantidad significativamente superior respecto de las especies *E. camaldulensis* y *E. globulus*.

6.1 Conclusiones.

- 1- Los taninos condensados de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus* son esencialmente procianidinas y prodelfinidinas, ya que, mediante la ruptura oxidativa de los enlaces interflavánicos, han producido las antocianidinas: cianidina y delfinidina.
- 2- En madera, las proantocianidinas predominantes han sido del tipo procianidina, en las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*.
- 3- Las cortezas de *E. camaldulensis* y *E. rudis* contienen taninos condensados con una mayor proporción de procianidinas. Por el contrario, las de *E. globulus* tienen taninos más ricos en prodelfinidinas.
- 4- La composición de las proantocianidinas de hojas de los eucaliptos estudiados ha resultado dependiente de la especie y, dentro de cada especie, de la procedencia de las muestras.

7. Caracterización de otros compuestos polifenólicos presentes en los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.*

Los extractos acuosos (extractos en metanol-agua, libres de la fracción soluble en éter) de hojas de *Eucalyptus*, como se vió en el apartado V.3.3.4, resultaron ser ricos en glicósidos de flavonoles, de cuya caracterización se va a tratar de forma específica en este

apartado.

Los glicósidos de flavonol se extrajeron con acetato de etilo a partir de los extractos acuosos y se purificaron por CCF preparativa. La caracterización de dichos compuestos se llevó a cabo en esta fracción después de ser sometida a una hidrólisis ácida suave, analizando tanto los aglicones (flavonoles) como los azúcares constituyentes, según la metodología descrita en los apartados IV.6, IV.3.1.2 y IV.4.3.

Respecto a la purificación de los glicósidos de flavonoles por CCF preparativa, es preciso indicar que las cromatoplasmas obtenidas del extracto en acetato de etilo presentaron, entre otras, dos fracciones a R_f 0,12 y 0,72 que se consideraron fracciones flavonólicas por dar coloración amarilla en el revelado con reactivo A de Neu. Ambas fracciones fueron extraídas de la celulosa de la placa con MeOH y sometidas posteriormente a análisis por CLAR (apartado IV.3.1.2, gradiente nº 2), para comprobar la ausencia en dichas fracciones de otros compuestos como elagitaninos que pudieran interferir en su análisis. Los cromatogramas así obtenidos muestran, como se puede apreciar en la figura V.7-1, la presencia casi exclusiva de glicósidos de flavonoles, libres pues de la interferencia de los elagitaninos habitualmente extraídos con acetato de etilo.

La hidrólisis ácida del conjunto de los glicósidos de flavonoles dio lugar a los aglicones: quercetina (3, 5, 7, 3', 4'-pentahidroxi flavona) y, en mucha menor proporción, kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxi flavona), puestos de manifiesto mediante el análisis por CLAR e identificados por comparación de los espectros UV y tiempos de retención con los de patrones comerciales de ambos compuestos (fig. V.7-2). Por otra parte, se analizaron también los azúcares generados en la hidrólisis, mediante CG-EM, identificándose así glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, como constituyentes de los glicósidos de flavonoles y cuyas características cromatográficas y espectrométricas se detallaron en el apartado V.5.2.

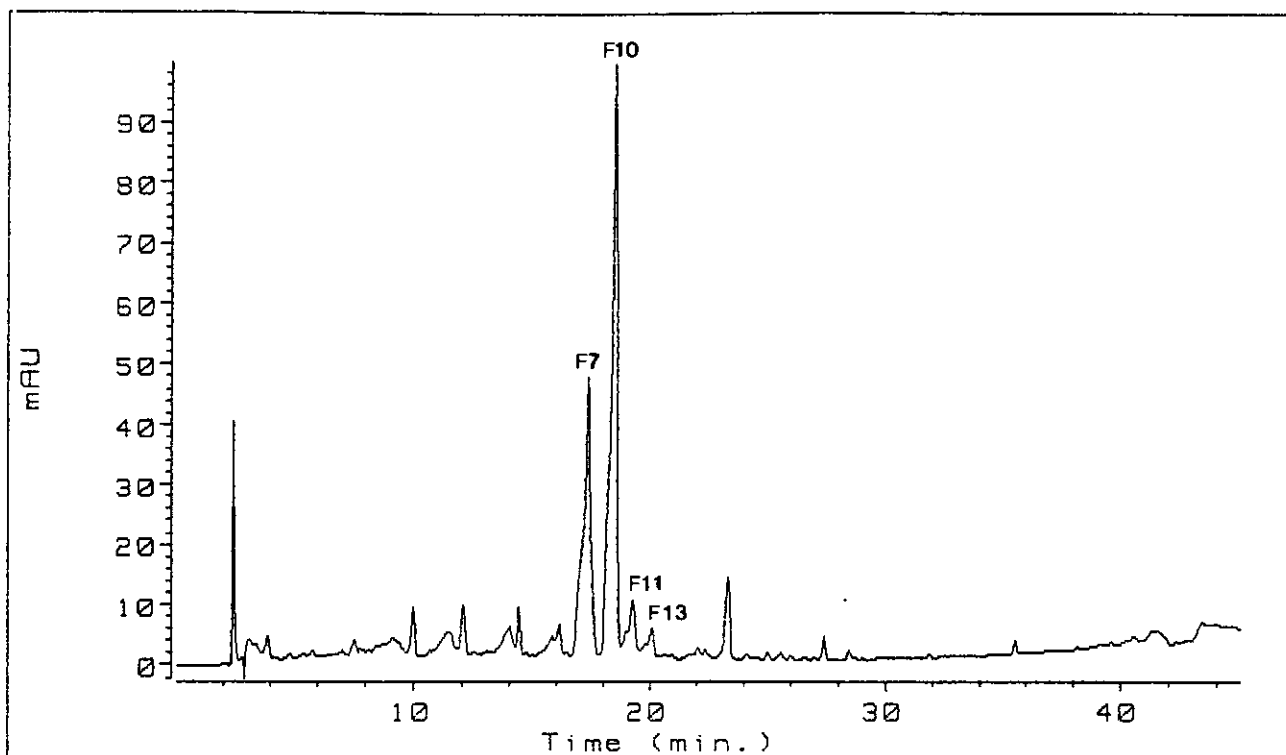


FIGURA V.7-1 Ejemplo de cromatograma de CLAR de la fracción flavonólica de los extractos en acetato de etilo de hojas de *Eucalyptus spp.* (HEC3). F=flavonol.

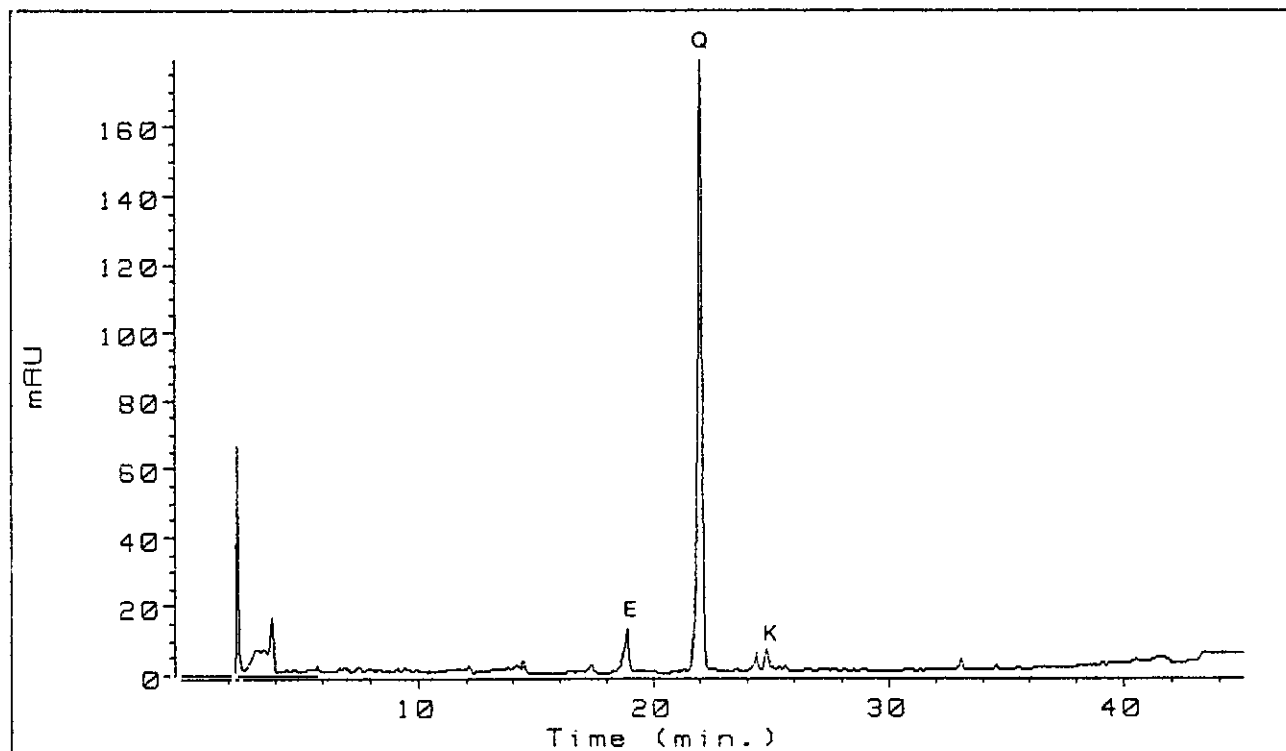


FIGURA V.7-2 Cromatograma de la fracción flavonólica hidrolizada de los extractos en acetato de etilo de hojas de *Eucalyptus spp.* (HEC3). E= ácido elágico. Q= quercetina. K= kaempferol.

Teniendo en cuenta estos resultados, y por comparación de los glicósidos de flavonoles encontrados, con los identificados por Conde (1994) en extractos etéreos de hojas de las mismas especies de *Eucalyptus* que las consideradas por nosotros, hemos podido asignar para los principales picos cromatográficos las estructuras siguientes:

Pico	t_R (min)	Componente
10	18,2	quercetín-3-arabinósido
11	19,2	quercetín-3-ramnósido (quercitrina)
13	20,1	kaempferol-3-arabinósido

Al pico 7, con un t_R de 17,3 min, le podríamos asignar tanto la estructura de la rutina (quercetín-3-rutinósido) como la del hiperósido (quercetín-3-galactósido) o las de ambos, ya que sus t_R y sus espectros UV son coincidentes. La primera de ellas, la rutina, ha sido identificada por Conde (1994) en los extractos etéreos de hojas de *Eucalyptus spp.* antes citados y nuestros resultados estarían de acuerdo con los de esta autora si consideramos que el disacárido rutinosa, en las condiciones de nuestro análisis, se hidroliza en los monosacáridos ramnosa y glucosa. Por otra parte, sin embargo, la otra estructura asignada, la del hiperósido (quercetín-3-galactósido), se justificaría, en nuestro caso por la presencia de galactosa en los hidrolizados. Esto hace pensar que el pico de $t_R=17,3$ puede ser una mezcla de ambos compuestos.

7.1 Conclusiones.

- 1- Los extractos acuosos obtenidos de las hojas de las especies de *Eucalyptus*, *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* han presentado una amplia variedad de glicósidos de flavonol entre los que hemos podido identificar, quercetín-3-arabinósido, quercetín-3-ramnósido y kaempferol-3-arabinósido y, probablemente, rutina y/o hiperósido.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1- La determinación de los contenidos globales de los dos tipos de taninos: elagitaninos y proantocianidinas, y de los fenoles totales así como del rendimiento extractivo de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* de dos procedencias diferentes de la Península ha puesto de manifiesto su considerable riqueza en taninos y la elevada variabilidad cuantitativa y cualitativa de estos compuestos, dependiente del tejido vegetal, de la especie y del origen.

El tipo de tanino predominante dependió fundamentalmente del tejido en estudio. En madera y corteza, con la excepción de la especie *E. rudis*, predominaron las proantocianidinas y en hojas, por el contrario, claramente para todas las especies, los elagitaninos.

En corteza y madera, se ha observado una relación de proporcionalidad directa entre el contenido de proantocianidinas, y el de fenoles totales y también de ambos con el rendimiento extractivo, especialmente en corteza. Ello indica que la máxima contribución al contenido en fenoles totales procede de las proantocianidinas y así una mayor abundancia relativa en estos tejidos de las proantocianidinas frente a los elagitaninos, y a otros compuestos fenólicos y no fenólicos del extracto.

En el caso de las hojas no se obtuvo proporcionalidad alguna entre los niveles de elagitaninos, tipo de tanino mayoritario, ni tampoco de proantocianidinas con los restantes parámetros considerados, debido a la presencia en los extractos de otros compuestos fenólicos no tánicos en considerable proporción.

Los niveles de proantocianidinas además de dependientes del tejido vegetal se muestran influenciados por el origen geográfico en mayor medida que por la especie, mientras que, por el contrario el contenido en elagitaninos apareció más relacionado con la especie, siendo *E. globulus* la más rica.

2- El análisis de taninos de los extractos de madera de *Eucalyptus spp.*, realizados mediante CIAR, ha revelado la existencia de una amplia variedad y abundancia de formas moleculares tanto de proantocianidinas como de elagitaninos, especialmente en las maderas de *E. camaldulensis* y *E. globulus*, resultando por el contrario *E. rudis* mucho más pobre en ambos grupos de taninos. En particular, el análisis cualitativo y semicuantitativo de los elagitaninos ha permitido la clara diferenciación de las tres especies en estudio, así como el establecimiento de grupos, dentro de cada especie, según la procedencia.

Los extractos de corteza se han caracterizado por su riqueza en proantocianidinas poliméricas. El análisis cualitativo y semicuantitativo de los elagitaninos nos ha llevado a la discriminación de *E. globulus* respecto de *E. camaldulensis* y *E. rudis*, aunque no ha permitido diferenciar estas últimas especies entre sí. Estos resultados están de acuerdo con la clasificación botánica de las tres especies, que sitúa a *E. camaldulensis* y *E. rudis* dentro de la misma sección del género *Eucalyptus*, mientras que *E. globulus* se incluye en otra sección diferente.

Los extractos de hojas de *Eucalyptus spp.* han mostrado estar constituidos principalmente por tres grupos de compuestos polifenólicos, elagitaninos, proantocianidinas y glicósidos de flavonoles, estos últimos exclusivos de las hojas. De nuevo, la composición cualitativa y semicuantitativa en elagitaninos hace posible la diferenciación entre especies, sobre todo de *E. globulus* respecto de *E. camaldulensis* y *E. rudis*. La composición en glicósidos de flavonoles, sin embargo, permite discriminar sólo *E. rudis* de las otras dos especies. La diferenciación en función de la composición en elagitaninos estaría pues más de acuerdo con la clasificación botánica de las tres especies que la establecida en función de los flavonoles.

3- El amplio intervalo de los valores de los pesos moleculares de los taninos extraídos de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.*, ha puesto de manifiesto la gran

variedad de polifenoles poliméricos presentes en este género. El perfil de distribución se vio relacionado en primer lugar, con el tejido vegetal, después con la especie y sólo en algunos casos con la procedencia geográfica de la muestra.

Los taninos extraídos presentaron un amplísimo intervalo de pesos moleculares, comprendido entre los valores correspondientes a unidades monoméricas ($M_w=300$) y los correspondientes a polímeros de más de doscientas unidades ($M_w=79000$), si bien los más abundantes se incluyen dentro del intervalo de 1000 a 8000. Entre los tejidos considerados en este estudio, la corteza ha sido el que ha presentado un mayor contenido en taninos de peso molecular medio (M_n , M_w) y con valores de dispersividad mayores (D_p), seguida de la madera y, en último lugar, de las hojas.

4- La estructura molecular de los elagitaninos de *Eucalyptus spp.* ha resultado dependiente principalmente del tejido vegetal y de la especie considerados. En madera y corteza los elagitaninos son mayoritariamente glucósidos de los ácidos gálico y elágico y, en mucha menor proporción ramnósidos de los mismos ácidos. Es de destacar la corteza de *E. globulus* que se caracterizó por la presencia de glicósidos de derivados monometilados del ácido elágico.

Los elagitaninos de las hojas de las tres especies en estudio: *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* se caracterizaron por presentar en su parte polifenólica, además del común ácido elágico, derivados del mismo, presumiblemente los isómeros valoneoilo o tergaloilo. Por otra parte, al igual que en el caso de madera y corteza, el principal azúcar constituyente de sus elagitaninos fue la glucosa.

5- Los taninos condensados presentes en la madera, corteza y hojas de *Eucalyptus spp.* han resultado ser esencialmente mezclas de procianidinas y prodelfinidinas. En madera y corteza predominan las procianidinas, exceptuando la corteza de *E. globulus* que presentó mayor proporción de prodelfinidinas.

La composición en taninos condensados de las hojas de las tres especies de *Eucalyptus* consideradas, ha resultado ser muy variable, dependiendo de la especie, del origen de las muestras e incluso del individuo estudiado.

6- Los extractos de las hojas *E.camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis* han presentado, además de los polifenoles tánicos, una amplia variedad de glicósidos de flavonoles, entre los que hemos podido identificar, quercetín-3-arabinósido, quercetín-3-ramnósido y kaempferol-3-arabinósido.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AASTRUP S., OUTTRUP H., ERDAL K. (1984). Location of the proanthocyanidins in the barley grain. *Carlsberg Res. Commun.* 49: 105.

AHN G. Z., GSTIRNER F. (1970). Enzymtische dimerisierung von (+)-catechin. *Arch. Pharm.* 303: 925.

ALLUE ANDRADE J. L. (1990). Atlas fitoclimático de España. M.A.P.A. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid.

AMRHEIN N., TOPP H., JOOP O. (1984). The pathway of gallic acid biosynthesis in higher plants. *Plant. Physiol. Suppl.* 75: 18.

ANDERSON D. M. W. (1976). En Simpson C. F. (Ed.). *Practical high performance liquid chromatography*. Heyden, Londres.

APARICIO-TEJO P. M., PENA J. I., SANCHEZ-DIAZ M., BECANA M. (1986). Coat phenolic compounds inhibit germination of *Halimium halimifolium*. *Plant Physiol. Suppl.* 80: 128.

ARPINO P., MOREAU J. P., ORUEZABAL C., FLIEDER F. (1977). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of tannin hydrolysates from the ink of ancient manuscripts (XIth to XVIth century). *J. Chromatogr.* 134: 433.

ASANO K., OHTSU K., SHINAGAWA K., HASHIMOTO N. (1984). Affinity of proanthocyanidins and their oxidation products for haze-forming proteins of beer and the formation of chill haze. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1139.

ASANO K., SHINAGAWA K., HASHIMOTO N. (1982). Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J. Amer. Soc. of Brewing Chemists.* 40: 147.

- ASQUITH T. N., BUTLER L. G. (1986). Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry* **25**: 1591-1593.
- BAILEY R. G., McDOWELL I., NURSTEN H. E. (1990). Use of an HPLC photodiode-array detector in a study of the nature of a black tea liquor. *J. Sci. Food Agric.* **52**: 509.
- BANKOVA V. S., MOLLOVA N. N., POPOV S. S. (1986). Chemical ionization mass spectrometry with amines as reactant gases. *Org. Mass Spectrom.* **21**: 109.
- BARTOLOME SUALDEA B. (1994). Incidencia de los compuestos fenólicos en la fibra alimentaria. Interacción con proteínas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma. Madrid.
- BAROFSKY D. F. (1989). FAB-MS Applications in the elucidation of proanthocyanidins structures. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 175-196.
- BATE-SMITH E. C. (1972). Detection and determination of ellagitannins. *Phytochemistry* **11**: 1153.
- BATE-SMITH E. C. (1973 a). Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* **12**: 1809.
- BATE-SMITH E. C. (1973 b). Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry* **12**: 970.
- BATE-SMITH E. C. (1975). Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry* **14**: 1107.
- BEART J. E., LILLEY T. H., HASLAM E. (1985). Plant polyphenols secondary metabolism and chemical defence: some observations. *Phytochemistry* **24**: 33.
- BECKMAN C. H., MUELLER W. C., MACE M. E. (1974). The stabilization of artificial and natural cell wall membranes by phenolic infusion and its relation to wilt disease resistance. *Phytopathology* **64**: 1214.

- BELL A. A. (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**: 21.
- BETTS M. J., BROWN B. R., BROWN P. E., PIKE W. T. (1967). Degradation of condensed tannins structure of the tannin from common heather. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 1110.
- BHATIA I. S., UPPAL D. S., BAJAJ K. L. (1972). Study of phenolic contents of resistant and susceptible varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in relation to early blight disease. *Indian Phytopathol.* **25**: 231.
- BIDDINGTON N. L. (1985). A review of mechanically induced stress in plants. *Sci. Hortic.* **36**: 12.
- BIGGS A. R. (1986). Wound age and infection of peach bark by *Cytospora leucostoma*. *Can. J. Bot.* **64**: 2319.
- BILLINGHAM N. C. (1976). En Simpson C. F. (Ed.). *Practical high performance liquid chromatography*. Heyden, Londres.
- BISWAS K. M., ALI M. E., JACKSON A. H., GAMES D. E. (1978). Application of field desorption and electron impact mass spectrometry and NMR spectroscopy in the study of flavonoid O-glycosides. *J. Ind. Chem. Soc.* **55**: 1240.
- BLAND D. E. (1985). The composition and analysis of eucalypt wood. *Appita* **38**(4): 291.
- BLISS E. D. (1989). Using tannins to produce leather. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 493-502.
- BOTHA J. J., FERREIRA D., ROUX D. G. (1981). Synthesis of condensed tannins. Part 4. A direct biomimetic approach to [4,6]-and [4,8]-biflavanoids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 1235.

- BOTHA J. J., VIVIERS P. M., YOUNG D. A., DUPREEZ I. C., FERREIRA D., ROUX D. G., HULL W. E. (1982). Synthesis of condensed tannins. Part 5. The first angular [4,6;4,8]-triflavanoids and their natural counterparts. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1: 527.
- BOUGHDAD A., GILLON Y., GAGNEPAIN C. (1986). Influence des tanins condensés du tegument de feres sur le développement larvaire de *Callosobruchus maculatus*. *Ent. Exp. and Appl.* 42: 125.
- BROADHURST R. B., JONES W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* 29: 788.
- BROWN W. (1967). Solution properties of lignin. Thermodynamic properties and molecular weight determinations. *J. of Appl. Pol. Sci.* 11: 2381.
- BUSTAMANTE EZPELETA L., SANTOS VIQUEIRA J. A. (1983). Aptitudes de diferentes especies del género *Eucalyptus* como materia prima celulósica. Monografías I.N.I.A. 44. Madrid.
- BUTLER L. G. (1992). Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. *Basic Life Sci.* 59(Plant Polyphenols): 693-698.
- BUTLER L. G., PRICE M. P., BROTHERTON J. E. (1982). Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): Modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1087.
- CALDERON P., VAN BUREN J., ROBINSON W. B. (1968). Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolyzable tannins. *J. Agric. Food Chem.* 16: 479.
- CALDWELL M. M., ROBBERECHT R., FLINT S. D. (1983). Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol. Plant.* 58: 445.
- CHALKER-SCOTT L., KRAHMER L. (1989). Microscopic studies of tannin formation

and distribution in plant tissues. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. N. Y. y London. p. 345-368.

CLAUSEN T. P., REICHARDT P. B. (1992). Condensed tannins in plant defense: a perspective classical theories. *Basic Life Sci.* **59**(Plant Polyphenols): 639-651.

COCHRAN R. L. (1986). Fast atom bombardment/mass spectrometry (FAB/MS) and its industrial applications. *Appl. Spectrosc. Rev.* **22**: 137.

COLE R. A. (1984). Phenolic acids associated with the resistance of lettuce cultivars to the lettuce root aphid. *Ann. Appl. Biol.* **105**: 129.

CONDE E., CADAHIA E., GARCIA-VALLEJO M. C. (1992). Optimization of TLC research on the flavonoids in wood and bark of species of the genus *Eucalyptus* L'Héritier. *Chromatographia* **33**(9/10): 418.

CONDE E. (1994). Contribución al conocimiento de la composición polifenólica de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus rudis*. Tesis doctoral. Universidad Complutense, Facultad Ciencias Químicas. Madrid.

CONDE E., CADAHIA E., GARCIA-VALLEJO M. C., FERNANDEZ de SIMON M. B. (1995). Polyphenolic composition of wood extracts from *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. *Holzforschung* (en prensa).

CONN E. E., SWAIN T. (1961). Biosynthesis of gallic acid in higher plants. *Chem. Ind.*: 592.

CONTI G. G., BASSI M., MAFFI D., BOCCI A. M. (1986). Host parasite relationship in a susceptible and a resistant rose cultivar inoculated with *Sphaerotheca pannosa*. *J. Phytopathol.* **117**: 312.

CORK S. J., KROCKENBERGER A. K. (1991). Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plantas: insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. *J. Chem. Ecology* **17**(1): 123.

DAIGLE D. J., CONKERTON E. J. (1983). Analysis of flavonoids by HPLC. *J. Liquid Chromatography* **6**: 105.

DELCOUR J. A., SERNEELS E. J., FERREIRA D., ROUX D. G. (1985). Synthesis of condensed tannins. Part 13. The first 2,3-trans-3,4-cis procyanidins: sequence of units in a "trimer" of mixed stereochemistry. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 669.

DEWICK P. M. (1985). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **2**: 495.

DEWICK P. M., HASLAM E. (1969). Phenol biosynthesis in higher plants. Gallic acid. *Biochem. J.* **113**: 537.

DHINGRA B. S., DAVIS A. (1988). Determination of free ellagic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* **447**: 284.

DICOSMO F., TOWERS G. H. N. (1983). Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. En Timmermann B. N., Steelink C., Loewus F. A. (Eds.). *Phytochemical adaptation to stress*. Plenum Publishing Company, New York. p. 97-175.

DIX B., MARUTZKY R. (1989). Modification of diisocyanate-based particleboard and plywood glues with natural polymers; polyphenols, carbohydrates and proteins. En Hemingway R. W., Conner A. H., Branham S. J. (Eds.). *Adhesives from renewable resources*. ACS Symposium Series No. 385, American Chemical Society, Washington, DC., p. 229-241.

DOMON B., HOSTETTMAN K. (1985). Mass spectrometric studies of underivatized polyphenolic glycosidos. *Phytochemistry* **24**: 575.

DURAN N., BAEZA J., FREER J., ROJAS N. (1985). Biomass photochemistry: VI - Light-induced oxidation of phlobaphene from wood. *Polym. Photochem.* **6**: 393.

EGLEY G. H., PAUL R. N. Jr., DUKE S. O., VAUGHN K. C. (1985). Peroxidase involvement in lignification in water-impermeable seed coats of weedy leguminous and malvaceous species. *Plant. Cell and Environ.* **8**: 253.

EL-BASYOUNI S. Z., CHEN D., IBRAHIM R. K., NEISH A. C., TOWERS G. H. N. (1964). The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Phytochemistry* **3**: 485.

ESCRIBANO-BAILON M. T., RIGAUD J., CHEINIER V., MOUTOUNET M. (1992). *Bull. Liaison Groupe Polyphenols*, **16**: 79.

ESCRIBANO-BAILON M. T. (1993). Estudio de la composición flavánica de la semilla de uva. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Facultad de Ciencia Químicas.

ESPELIE K. E., DAVIS R. W., KOLATTUKUDY P. E. (1980). Composition, ultrastructure and function of the cutin- and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfed.). *Planta* **149**: 498.

FAIX O., LANGE W., BEINHOF O. (1980). Molecular weights and molecular weight distributions of milled wood lignins of some wood and bambusoideae species. *Holzforschung* **34**(5): 174.

FAIX O., LANGE W., SALUD E. C. (1981). The use of HPLC for the determination of average molecular weights and molecular weight distribution of milled wood lignins from *Shorea polysperma* (Blco.) *Holzforschung* **35**: 3.

FECHTAL P. M., RIEDL B. (1991). Analyse des extraits tannants des écorces des eucalyptus après hydrolyse acide par la spectrométrie de masse (GC-MS). *Holzforschung* **45**(4): 269.

FENSELEAU C., COTTER R. J. (1987). Chemical aspects of fast atom bombardment. *Chem Rev.* **87**: 501.

FERREIRA D., BRANDT E. V. (1989). New NMR experiments applicable to structure and conformation analysis. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 153-174.

FEUCHT W., SCHMID P. P. S., CHRIST E. (1986). Distribution of flavanols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *J. Plant Physiol.* **125**: 1.

FLOSS H. G. (1986). The shikimate pathway: an overview. En Conn E. E. (Ed.). *Recent advances in Phytochemistry* 20. Plenum Press, p. 13-56.

FOLIN O., DENIS W. (1915). A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* 22: 305.

FOO L. Y. (1982). Polymeric proanthocyanidins of *Photinia glaubrescens*, modification of molecular weight and nature of products from hydrogenolysis. *Phytochemistry* 21: 1741.

FOO L. Y. (1984). Condensed tannins: co-occurrence of procyanidins, prodelphinidins and profisetinidins in the heartwood of *Acacia baileyana*. *Phytochemistry* 23: 2915.

FOO L. Y. (1985). Facile self-condensation of melacacidin: a demonstration of the reactivity of the pyrogallol A-ring. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 1273.

FOO L. Y., JONES W. T., PORTER L. J., WILLIAMS V. M. (1982). Proanthocyanidins polymers of fodder legumes. *Phytochemistry* 21: 933.

FOO L. Y., KARCHESY J. J. (1989). Procyanidin dimers and trimers from douglas fir inner bark. *Phytochemistry* 28: 1743.

FOO L. Y., MCGRAW G. W., HEMINGWAY R. W. (1983). Condensed tannins: preferential substitution at the interflavanoid bond by sulfite ion. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 672.

FOO L. Y., PORTER L. J. (1980). The phytochemistry of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry* 19: 1747.

FOO L. Y., PORTER L. J. (1983). Synthesis and conformation of procyanidin diastereoisomers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 1535.

FOO L. Y., WONG H. (1986). Diastereoisomeric leucoanthocyanidins from the heartwood of *Acacia melanoxylon*. *Phytochemistry* 25: 1961.

FRIEND J. (1981). Plant phenolics, lignification and plant disease. En Reinhold L.,

Harbone J. B., Swain T. (Eds.). *Progress in Phytochemistry*. Pergamon Press, New York. p. 197-261.

FUHRER J. (1982). Early effects of excess cadmium uptake in *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell and Environ.* 5: 263.

FURLONG J. J. P., NUDLEMAN N. S. (1983). Base-catalyzed aromatic hydrogen exchange in phenols. *Acta Sudamericana de Química* 3: 129.

GANEM B. (1978). From glucose to aromatics-recent developments in natural products of the shikimic acid pathway. *Tetrahedron* 34: 3353.

GARCIA DE MARINA A., DEL CASTILLO B. (1988). *Cromatografía líquida de alta resolución*. Noriega (Ed.). Limusa, México.

GARCIA-RASO A., FERNANDEZ-DIAZ M., PAEZ M. I., SANZ J., MARTINEZ-CASTRO I. (1989). Gas chromatographic retention of carbohydrate trimethylsilyl ethers. III. Ketohexoses. *J. Chromatogr.* 471: 205-216.

GARCIA-RASO A., MARTINEZ-CASTRO I., PAEZ M. I., SANZ J., GARCIA-RASO J., SAURA-CALIXTO F. (1987). Gas chromatographic behaviour of carbohydrate trimethylsilyl ethers. I. Aldopentoses. *J. Chromatogr.* 398: 9.

GARCIA-RASO A., PAEZ M. I., MARTINEZ-CASTRO I., SANZ J. (1992). Gas chromatographic retention of carbohydrate trimethylsilyl ethers. IV. Disaccharides. *J. Chromatogr.* 607: 221.

GEIGER H., SCHWINGER G. (1980). Field desorption mass spectrometry and thermal fragmentation of flavonoid glucosides. *Phytochemistry* 19: 897.

GERSHENZON J. (1983). Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. En Timmermann B. N., Steelink C., Loewus F. A. (Eds.). *Phytochemical adaptations to stress*. Plenum Publishing Company, New York. p. 273-321.

GIL-ALBERDI E. (1987). Estudio analítico de flavonas y sus trimetilsilil derivados por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Tesina de licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.

GOLSTEIN J. L., SWAIN T. (1963). Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry* 2: 371.

GOMEZ-CORDOVES C. (1993). Comunicacion personal.

GRISEBACH H. (1985). Biosynthesis of flavonoids. En Higuchi T. (Ed.). *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*. Academic Press, New York. p. 291.

GROSS G. G. (1983). Synthesis of mono-, di-, and trigalloyl- β -D-glucose by β -glucogallin dependent galloyltransferases from oak leaves. *Z. Naturforsch.* 38c: 519.

GROSS G. G. (1989). Enzymology of gallotannin biosynthesis. En Lewis N. G., Paice M. G. (Eds.). *Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation*. ACS Symposium Series.

GROVE J. F., POPLE M. (1979). The identification and characterization of o-dihydric phenols. *Phytochemistry* 18: 1071.

GUPTA R. K., AL-SHAFI S. M. K., LAYDEN K., HASLAM E. (1982). The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants. Part 2. Esters of (S)-hexahydroxydiphenic acid with D-glucopyranose (4C_1). *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1: 2525.

GUSTAVSON K. H. (1954). Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. *J. Polym. Sci.* 12: 317.

HADDOCK E. A., GUPTA R. K., AL-SHAFI S. M. K., LAYDEN K., HASLAM E., MAGNOLATO D. (1982 a). The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomy considerations. *Phytochemistry* 21: 1049.

HADDOCK E. A., GUPTA R. K., HASLAM E. (1982 b). The metabolism of gallic acid

and hexahydroxydiphenic acids in plants. Part 3. Esters of (R)- and (S)-hexahydroxydiphenic acids and dehydrohexahydroxy acid with D-glucopyranose. *J. Chem Soc. Perkin Trans. 1*: 2535.

HADDOCK E. A., GUPTA R. K., AL-SHAFI S. M. K., HASLAM E., MAGNOLATO D. (1982 c). The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid. Part 1. Introduction. Naturally occurring galloyl esters. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2515.

HAGERMAN A. E. (1987). Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ecol.* 13: 437.

HAGERMAN A. E. (1988). Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *J. Chem Ecol.* 14: 453.

HAGERMAN A. E. (1989). Chemistry of tannin-protein complexation. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 323-334.

HAGERMAN A. E. (1991). Tannins and lignins. En *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. Vol. 1: The chemical participants. Academic Press, Inc. New York. p. 355-387.

HAGERMAN A. E., BUTLER L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.* 26: 809.

HAGERMAN A. E., BUTLER L. G. (1980 a). Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated proteins. *J. Agric. Food Chem.* 28: 947.

HAGERMAN A. E., BUTLER L. G. (1980 b). Determination of protein in tannin-protein precipitates. *J. Agric. Food Chem.* 28: 944.

HAGERMAN A. E., BUTLER L. G. (1981). Specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 256: 494.

HAGERMAN A. E., BUTLER L. G. (1989). Choosing appropriate methods and standars for assaying tannin. *J. Chem. Ecol.* **15**(6): 1795.

HAGERMAN E., KLUCHER K. M. (1986). Tannins-protein interations. En Cody V., Middleton E., Harbone J. (Eds.). *Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and structure activity relationships*. Alan R. Liss. Inc., New York. p. 67-76.

HAGERMAN A. E., ROBBINS C. T. (1987). Implications of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *J. Chem Ecol.* **13**: 1243.

HARBORNE J. B. (1985). Current trends in the chromatographic analysis of plant phenolics. *Adv. Med. Plant. Res. Plenary Lect. Int. Cong. 32nd. 1984. (Publ. 1985)*. p. 135.

HARVEY D. J. (1992). The role of mass spectrometry in glycobiology. *Glycoconjugate Journal* **9**: 1.

HASLAM E., HAWORTH R. D., HILLIS S. D., ROGERS H. J., ARMITAGE R., SEARLE T. (1961). Gallotannins. Part II. Some esters and depsides of gallic acid. *J. Chem. Soc.:* 1836-1842.

HASLAM E. (1966). *Chemistry of vegetable tannins*. Academic Press, New York. p. 14-30.

HASLAM E. (1982). The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in higher plants. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **41**: 1.

HASLAM E. (1989). *Plant polyphenols*. Cambridge University Press. Cambridge.

HATANO T., KIRA R., YOSHIZAKI M., OKUDA T. (1986). Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formasana* reflecting their biogenesis. *Phytochemistry* **25**: 2787.

HATANO T., YOSHIDA T., OKUDA T. (1988 a). Chromatography of tannins: III Multiple peaks in high-performance liquid chromatography of some hydrolyzable tannins. *J. Chromatogr.* **435**: 285.

HATANO T., YOSHIDA T., SHINGU T., OKUDA T. (1988 b). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of hydrolyzable tannins. II. Tannins forming anomer mixtures. *Chem Pharm. Bull.* **36**: 2925.

HATANO T., OGAWA N., KIRA R., YASHUARA T., OKUDA T. (1989). Tannins of cornaceous plants. I. Cornusins A, B and C, dimeric, monomeric and tetrameric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis* and orientation of valoneoyl group in related tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 2083.

HATANO T., YASHUARA T., MATSUDA M., YAZAKI K., YOSHIDA T., OKUDA T. (1990). Denothein B, a dimeric hydrolyzable tannins with macrocyclic structure and accompanying tannins from *Denothera erythrosepala*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2735.

HEDIN P. A., JENKINS J. N., COLLUM D. H., WHITE W. H., PARROTT W. L. (1993). Multiple factors in cotton contributing to resistance to the tobacco bud-worm *Heliothis virescens*. *F. ACS Symp.* **208**: 347.

HELLER W., FORKMANN G. (1988). Biosynthesis. En Harborne J. B. (Ed.). *The flavonoids: advances in research since 1980*. Academic Press, New York. p. 399.

HEMINGWAY R. W. (1989 a). Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 83-108.

HEMINGWAY R. W. (1989 b). Reactions at the interflavanoid bond of proanthocyanidins. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 265-284

HEMINGWAY R. W. (1989 c). Biflavonoids and proanthocyanidins. En Rowe J. W. (Ed.). *Natural products extraneous to the lignocellulosic cell wall of wood plants*. Springer-Verlag, New York.

HEMINGWAY R. W., FOO L. Y., PORTER L. J. (1982). Linkage isomerism in trimeric

and polymeric 2,3-cis-procyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 1209.

HEMINGWAY R. W., MCGRAW G. W. (1978). Formaldehyde condensation products of model phenols for conifer bark tannins. *J. Liq. Chromatog.* 1: 163.

HEMINGWAY R. W., LAKS P. E. (1985). Condensed tannins: a proposed route to 2R, 3R-(2,3-cis)-proanthocyanidins. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 746.

HENDRY G. (1986). Why do plants have cytochrome P-450?. Detoxification versus defense. *New Phytol.* 102: 239.

HEYWOOD V. H. (1985). Las plantas con flores. Editorial Reverté S.A. Barcelona. p. 157.

HILLIS W. E. (1956). Leucoanthocyanidins as the possible precursors of extractives in woody tissues. *Aust. J. Biol. Sci.* 9: 263.

HILLIS W. E. (1962). The distribution and formation of polyphenols within the tree. En Hillis W. E. (Ed.). *Wood extractives*. Academic Press, New York. p. 60-131.

HILLIS W. E. (1972). Review article: Formation and properties of some wood extractives. *Phytochemistry* 11: 1207.

HILLIS W. E. (1985). Biosynthesis of tannins. En Higuchi T. (Ed.). *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press. p. 325-347.

HILLIS W. E. (1986). Forever Amber. A story of the secondary wood components. *Wood Sci. Technol.* 20: 203.

HILLIS W. E., CARLE A. (1963) Chemistry of eucalypt kinos. IV: *Eucalyptus hemiphloia* kino. *Aust. J. Chem.* 16: 147.

HILLIS W. E., CARLE A. (1964). Citado por Hillis (1972).

HILLIS W. E., HART J. H., YAZAKI Y. (1974). Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*

wood. *Phytochem.* **13**: 1591.

HILLIS W. E., URBACH G. (1959). Reactions of polyphenols with formaldehyde. *J. Appl. Chem.* **9**: 665.

HOSTETTMANN K., MARSTON A. (1986). Isolation, purification and characterization of flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* **213**(Plant Flavonoids Biol. Med.): 43-51.

HOWELL C. R., BELL A. A., STIPANOVIC R. D. (1976). Effect of aging on flavonoid content and resistance of cotton leaves to verticillium wilt. *Physiol. Plant Pathol.* **8**: 181.

HRAZDINA G., WAGNER G. J. (1985). Compartmentation of plant phenolic compounds: sites of synthesis and accumulation. *Ann. Proc. Phytochem. Europe* **25**: 119.

HSU F., NONAKA G., NISHIOKA I. (1985). Tannins and related compounds. XXXIII. Isolation and characterization of procyanidins in *Dioscorea cirrhosa* Lour. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 3293.

HUNDT H. K. L., ROUX D. G. (1978). Condensed tannins: determination of the point of linkage in "terminal" (+)-catechin units and degradative bromination of 4-flavanylflavan-3,4-diols. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*: 696.

INGLE H. D., DADSWELL H. E. (1953). The anatomy of the timbers of the South-West Pacific area. III. *Myrtaceae. Aust. J. Bot.*, **1**: 353.

INOUE K. H., HAGERMAN A. E. (1988). Determination of gallotannin with rhodanine. *Anal. Biochem.* **169**: 363.

ISOBE R., TANAKA T., NONAKA G., NISHIOKA I. (1989). A new method for structural study of hydrolyzable tannins by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(7): 1748.

ITOKAWA H., OSHIDA Y., IKUTA A., SHIDA Y. (1982). In beam-electron impact, chemical ionization and negative ion chemical ionization of flavonoid glycosides. *Chem.*

Lett. : 49.

JACOBS E., FERREIRA D., ROUX D. G. (1983). Atropisomerism in a new class of condensed tannins based on biphenyl and *o*-terphenyl. *Tetrahedron Letters* 24: 4627.

JONES W. T., BROADHURST R. B., LYTTLETON J. W. (1976). The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochemistry* 15: 1407.

JULKUNEN-TIITO R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows. Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33: 213.

KARCHESY J. J., LOVELAND P. M., LAVER M. L., BAROFSKY D. F., BAROFSKY E. (1976). Condensed tannins from the barks of *Alnus Rubra* and *Pseudotsuga menzies II*. *Phytochemistry* 15: 2009.

KARCHESY J. J., HEMINGWAY R. W. (1980). Loblolly pine bark polyflavanoids. *J. Agric. Food Chem.* 28: 222.

KARCHESY J. J., HEMINGWAY R. W., FOO Y. L., BAROFSKY E., BAROFSKY D. F. (1986). Sequencing procyanidin oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.* 58: 2563.

KARCHESY J. J., BAE Y., CHELKER-SCOTT L., HELM R. F., FOO L. Y. (1989). Chromatography of proanthocyanidins. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 139-151.

KARCHESY J. J., FOO L. Y. (1989). Negative ion fast atom bombardment mass spectrometry of procyanidin oligomers. *J. of wood Chem. and Technology* 9(3): 313.

KASHIWADA Y., NONAKA G., NISHIOKA I. (1986). Tannins and related compounds. XLV. Rhubarb. (5). Isolation and characterization of flavan-3-ol and procyanidin glucosides. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 3208.

KEFELI V. I., DASHEK W. V. (1984). Non-hormonal stimulators and inhibitors of plant growth and development. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* **59**: 273.

KEMP M. S., BURDEN R. S. (1986). Phytoalexins and stress metabolites in the sapwood of trees. *Phytochemistry* **25**: 1261.

KENNEDY J. A., POWELL H. K. J. (1985 a). Polyphenol interactions with aluminium (III) and iron (III): their possible involvement in the podzolization process. *Aust. J. Chem.* **38**: 879.

KENNEDY J. A., POWELL H. K. J. (1985 b). Aluminium (III) and iron (III) 1,2-diphenolato complexes: a potentiometric study. *Aust. J. Chem.* **38**: 659.

KIATRAGRAJAI P., WELLONS J. D., GOLLUB L., WHITE J. D. (1982). Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. *J. Org. Chem.* **47**: 2910.

KIEHLMANN E., LEHTO N., CHERNIWCHEN D. (1988). Iodination and deuteration of catechin derivatives. *Can. J. Chem.* **66**: 2431.

KLOK J., NIEBERG-VAN VELZEN E. H., LEEUW J. W., SCHENKP A. (1981). Capillary gas chromatographic separation of monosaccharides as their alditol acetals. *J. Chromatogr.* **207**: 273.

KNAPP D. R. (1979). Handbook of analytical derivatization reactions. John Wiley and Sons. New York.

KOŁODZIEJ H. (1990). Thiolysis of birch bark procyanidins: structural dependence in formation of 2,3-cis-3,4-cis-flavan-4-benzylthioethers from procyanidins. *Phytochemistry* **29**(5): 1671.

KOŁODZIEJ H. (1992). Proton NMR spectral studies of procyanidin derivatives: diagnostic proton NMR parameters applicable to the structural elucidation of oligomeric procyanidins. *Basic Life Sci.* **59**(Plant Polyphenols): 295-319.

KOUPAI-ABYAZANI M. R., MUIR A. D., BOHM B. A., TOWERS G. H. N., GRUBER M. Y. (1993). The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry* 34(1): 113.

KREIBICH R. E. (1989). Tannin-based wood adhesives. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 457-478.

KREIBICH R. E., HEMINGWAY R. W. (1985). Condensed tannin-resorcinol adducts in laminating adhesives. *For. Prod. J.* 35: 23.

KREIBICH R. E., HEMINGWAY R. W. (1989). Tannin-based adhesives for finger-jointing wood. En Hemingway R. W., Conner A. H., Branham S. J. (Eds.). *Adhesives from renewable resources*. ACS Symposium Series No. 385, American Chemical Society, Washington DC. p. 203-216.

KRISPER P., TISLER V., SKUBIC V., RUPNIK I., KOBAL S. (1992). The use of tannin from chestnut (*Castanea vesca*). *Basic Life Sci.* 59(Plant Polyphenols): 1013-1019.

KRISTERSSON P., LUNDQUIST K., SIMONSON R., TINGSVIK K. (1983). Gel permeation chromatography of lignin carbohydrate compounds. *Holzforschung* 37(1): 51.

KUC J. (1982). Induced immunity to plant disease. *Bio Science* 32: 854.

LAKS P. E. (1987). Flavonoid biocides: phytoalexin analogs from condensed tannins. *Phytochemistry* 26: 1617.

LAKS P. E. (1988). Wood preservation as trees do it. Proceeding of the American wood-preserves association. Minneapolis. p. 147-155.

LAKS P. E. (1989 a). Chemistry of the condensed tannin B-ring. In chemistry and significance of condensed tannins. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 249-264.

- LAKS P. E. (1989 b). Condensed tannins as a source of novel biocides. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 503-516.
- LAKS P. E., HEMINGWAY R. W. (1987). Condensed tannins: base-catalyzed reactions of polymeric procyanidins with toluene- α -thiol. Lability of the interflavanoid bond and pyran ring. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 465.
- LAKS P. E., HEMINGWAY R. W., CONNER A. H. (1987). Condensed tannins: base-catalyzed reactions of polymeric procyanidins with phloroglucinol. Intramolecular rearrangements. *J. Chem Soc. Perkin Trans. 1*: 1875.
- LAKS P. E., McKAIG P. A., HEMINGWAY R. W. (1988). Flavonoid biocides: wood preservatives based on condensed tannins. *Holzforschung* 42: 299.
- LAMA GUTIERREZ G. De La. (1976). Atlas del Eucalipto. Ministerio de Agricultura. INIA-ICONA. Madrid.
- LANGE W., FAIX O., BEINHOF O. (1983). Über eigenschaften und abbaubarkeit von mit alkohol-wasser-gemischen isolierten ligninen. 8. The inhomogeneity of the lignins from birch and spruce wood. *Holzforschung* 37(2): 63.
- LANGE W., SCHWEERS W., BEINHOF O. (1981). Über eigenschaften und abbaubarkeit von mit alkohol-wasser-gemischen isolierten ligninen. 5. Mitt. Orientierende untersuchungen über ausbeuten und eigenschaften von unter vershiedenen aufschlußbedingungen mit und ohne katalysatorzusatz isolierten ligninen. *Holzforschung* 35(3): 119.
- LEA A. G. H. (1979). High performance liquid chromatography of cider procyanidins. *J. Sci. Food Agric.* 30: 833.
- LEA A. G. H. (1980). Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatography of procyanidins and their oxidation products in ciders and wines, optimised by Snyder's

procedures. *J. Chromatogr.* **194**: 62.

LEA A. G. H. (1982). Reversed-phase high-performance liquid chromatograph of procyanidins and other phenolics in fresh and oxidising apple juices using a pH shift technique. *J. Chromatogr.* **238**: 253.

LEWIS N. G., YAMAMOTO E. (1989). Tannins: their place in plant metabolism. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 23-46.

LINDROTH R. L., PAJUTEE M. S. (1987). Chemical analysis of phenolic glycosides. Art. facts. and artifacts. *Oecologia* **74**: 144.

LOOMIS W. D., BATTAILE J. (1966). Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* **5**: 423.

LUNTE S. M. (1987). Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet-visible and electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **384**: 371.

MABRY T. J., MARKHAM K. R. (1975). Mass spectrometry of flavonoids. En Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H. (Eds.). *The flavonoids*. Academic Press, New York.

MABRY T. J., ULUBELEN A. (1980). Mass spectrometry of flavonoids and related plant phenolics. En Waller G. R., Dermer O. C. (Eds.). *Biochemical applications of mass spectrometry*, 1st Suppl. Vol. Wiley, New York.

MACE M. E., HOWELL C. R. (1974). Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. *Can. J. Bot.* **52**: 2423.

MACE M. E., BELL A. A., STIPANOVIC R. D. (1978). Histochemistry and identifications of flavanols in *Verticillium* wilt-resistant and suseptible cottons. *Physiol. Plant Pathol.* **13**: 143.

- MAKKAR H. P. S. (1989). Protein precipitation methods for quantitation of tannins: A review. *J. Agric. Fodd Chem.* 37: 1197.
- MAKKAR H. P. S., BECKER K. (1993). Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. *J. Chemical Ecology* 19(4): 613.
- MALAN E., ROUX D. G. (1975). Flavonoids and tannins of *Acacia* species. *Phytochemistry* 14: 1835.
- MANSSON P. (1981). GPC of kraft lignins. International Symposium on wood and pulping chemistry "The Ekman-Days". Vol 5. Stockholm 1981. SPCI report No.38, Vol. 5: 94-95.
- MARKHAM K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London.
- MARTIN J. S., MARTIN M. M. (1983). Tannin assays in ecological studies. Precipitation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase by tannic acid, quebracho, and oak foliage extracts. *J. Chem. Ecol.* 9: 285.
- MARTIN M. M., MARTIN J. S. (1984). Surfactants: their role in preventing the precipitation of protein by tannins in insect guts. *Oecologia* (Berlín). 61: 342.
- MARTIN M. M., ROCKHOLM D. C., MARTIN J. S. (1985). Effects of surfactants, pH and certain cations on precipitation of proteins by tannins. *J. Chem. Ecol.* 11: 485.
- MARTINEZ-CASTRO I., PAEZ M. I., SANZ J., GARCIA-RASO A. (1989). Gas chromatographic behaviour of carbohydrate trimethylsilyl ethers. *J. Chromatogr.* 462: 49.
- MARTINEZ-VERGES F. (1989). Nuevas perspectivas en el análisis de los compuestos polifenólicos: cromatografía de fluidos en condiciones supercríticas y cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas. *An. Real Acad. Farm.* 55: 265.
- MAYER W., MERGER F. (1959). Condensation of (+)-catechin with phloroglucinol:

a model for the condensation of catechins and catechin tannins. *Chem. and Indust.* April: 485.

McGRAW G. W. (1989). Reactions at the A-ring of proanthocyanidins. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 227-248.

McMANUS J. P., DAVIS K. G., LILLY T. H., HASLAM E. (1981). The association of proteins with polyphenols. *J. Chem. Soc. Commun.* 7: 309.

McMANUS J. P., DAVIS K. G., BEART J. E., GAFFNEY S. H., LILLEY T. H., HASLAM E. (1985). Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; Some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 1429.

MEHANSHO H., BUTLER L. G., CARLSON D. M. (1987) Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction and defense mechanisms. *Ann. Rev. of Nutr.* 7: 423.

MEIER D., SCHWEERS D. (1981). Über eigenschaften und abbaubarkeit von mit alkohol-wasser-gemischen isolierten ligninen. 4. Mitteilung: katalytische hydrogenolyse zur erzeugung monomerer phenole. *Holzforschung* 35: 81.

MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES. (1984). MCI GEL for liquid chromatography. Technical Bulletin 603, Tokyo, Japan. 14 pp.

MIYAMOTO K., KISHI N., KOSHIURA R., YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA T. (1987). Relationship between the structures and the antitumor activities of tannins. *Chem. Pharm. Bull.* 35(2): 814.

MOLE S., WATERMAN P. G. (1987 a). A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia* 72: 137.

MOLE S., WATERMAN P. G. (1987 b). A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tannins. *Oecologia* 72: 148.

MORIMOTO S., NONAKA G., NISHIOKA I. (1986 a). Tannins and related compounds. XXXVIII. Isolation and characterization of flavan-3-ol glucosides and procyanidin oligomers from cassia bark (*Cinnamomum cassia* Blume). *Chem. Pharm. Bull.* 34: 633.

MORIMOTO S., NONAKA G., NISHIOKA I. (1986 b). Tannins and related compounds. XXXIX. Procyanidin C-glucosides and an acylated flavan-3-ol glucoside from the barks of *Cinnamomum cassia* Blume and *Cinnamomum obtusifolium* Ness. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 643.

MORIMOTO S., NONAKA G., NISHIOKA I. (1988). Tannins and related compounds. LX. Isolation and characterization of proanthocyanidins with a doubly-linked unit from *Vaccinium vitis-idaea* L. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 33.

MUELLER-HARVEY I., REED J. D., HARTLEY R. D. (1987). Characterization of phenolic compounds, including flavonoids and tannins of ten ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 39: 1.

NEWMAN R. H., PORTER L. J. (1992). Solid state carbon-13 NMR studies on condensed tannins. *Basic Life Sci.* 59(Plant Polyphenols): 339-347.

NISHIMURA H., NONAKA G., NISHIOKA I. (1986). Scyllo-quercitol gallates and hexahydroxydiphenates from *Quercus stenophylla*. *Phytochemistry* 25: 2599.

NISSI D. (1969). Citado por Hillis. 1972.

NISSI D. (1970). Chemistry of some tannins extracted from the wood of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Cellulosa Carta* 21(4): 23.

NISSI D., PANIZZII L. (1966). Citado por Hillis. 1972.

NONAKA G., NISHIOKA I., NAGASAWA T., OURA H. (1981). Tannins and related compounds 1. Rhubarb. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 2862.

NONAKA G., HSU F., NISHIOKA I. (1981). Structures of dimeric, trimeric and tetrameric procyanidins from *Areca catechu*. *J. Chem. Soc. Commun.* 15: 781.

NONAKA G., EZAKI E., HAYASHI K., NISHIOKA I. (1983 a). Flavanol glucosides from rhubarb and *Raphiolepis imbellata*. *Phytochemistry* 22: 1659.

NONAKA G., MORIMOTO S., NISHIOKA I. (1983 b). Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*: 2139.

NONAKA G., NISHIMURA H., NISHIOKA I. (1985). Tannins and related compounds. Part 26. Isolation and structures of stenophyllanins A, B y C novel tannins from *Quercus stenophylla*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 163.

NONAKA G., NARAYAMA S., NISHIOKA I. (1989). Tannins and related compounds. LXXXIII. Isolation and structures of hydrolyzable tannins phillyracoidins A-E from *Quercus phillyracoides*. *Chem. Pharm. Bull.* 37(8): 2030.

NONAKA G., SAKAI T., MIHASHI K., NISHIOKA I. (1991). Tannins and related compounds. CIX. Isolation of alienanis A and B, Novel C,C-linked ellagitannin dimers from *Quercus aliena Blume*. *Chem. Pharm. Bull.* 39(4): 884-888.

OH H. I., HOFF J. E., ARMSTRONG G. S., HAFF L. A. (1980). Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric Food Chem.* 28: 394.

OHARA S., HEMINGWAY R. W. (1989). The phenolic extractives in Southern Red Oak (*Quercus falcata Michx. var. falcata*) Bark. *Holzforschung* 43: 149.

OKAMURA H., MIMURA A., YAKOU Y., NIWANO M., TAKAHARA Y. (1993). Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33: 557.

OKUDA T., YOSHIDA M., ASHIDA M., YAZAKI K. (1983). Tannins of Casuarina and Stachyurus species. Part 1. Structures of pendunculagin, casuarictin, strictinin, casuarinin, cuasariin and stachyurin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1(8): 1765.

OKUDA T., YOSHIDA T., HATANO T., YAZAKI K., KIRA R., IKEDA Y. (1986). Chromatography of tannins. II. Preparative fractionation of hydrolyzable tannins by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr.* 362: 375.

OKUDA T., YOSHIDA T., HATANO T. (1989 a). New methods of analyzing tannins. *Journal of Natural Products* 52(1): 1.

OKUDA T., YOSHIDA T., HATANO T. (1989 b). Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Médica* 55: 117.

OKUDA T., YOSHIDA T., HATANO T. (1990). Oligomeric hydrolyzable tannins. A new class of plant polyphenols. *Heterocycles* 30(2): 1195.

OKUDA T., YOSHIDA T., HATANO T., KUBO M., ORIME T., YOSHIZAKI M., NARUHASHI N. (1992). Tannins of Rosaceous plants. Part 11. Hydrolyzable tannins as chemotaxonomic markers in the Rosaceae. *Phytochemistry* 31: 3091.

OKUDA T., YOSHIDA T., HATANO T. (1993). Classification of oligomeric hydrolyzable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry* 32: 507.

OSAWA T., NAMIKI M. (1985). Natural antioxidants isolated from *Eucalyptus leaf* Waxes. *J. Agric. Food Chem.* 33: 777.

OSHIMA R., KUMANOTANI J., WATANABE L. (1983). Gas-chromatographic resolution of sugar enantiomers as diastereoisomers methylbenzylaminoalditols. *J. Chromatogr.* 259: 159.

OSTROFSKY W. D., SHORTLE W. C., BLANCHARD R. O. (1984). Bark phenolics of American beech (*Fagus grandifolia*) in relation to the beech bark disease. *Eur. J. For. Pathol.* 14: 52.

- PAUCKNER W. (1992). The 1992 John Arthur Wilson memorial Lecture: Leather tanning in the year 2000. *JALCA* 87: 156.
- PENFOLD A. R., WILLIS J. L. (1961). The Eucalypts. Botany, cultivation and utilization. Leonard Hill, London.
- PEREIRA H. (1988). Variability in the chemical composition of plantation eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.). *Wood and Fiber Science* 20(1): 82.
- PEREZ-ILZARBE F. J., MARTINEZ V., HERNANDEZ T., ESTRELLA I. (1992). Liquid chromatographic determination of apple pulp procyanidins. *J. Liquid Chromatogr.* 15(4): 637.
- PHILIP C. V., ANTHONY R. G. (1984). Analysis of petroleum crude and distillates by gel permeation chromatography. En Provder T. (Ed.). *Size exclusion chromatography*. ACS Symposium series 245: 257-272, Washington, DC: American Chemical Society.
- PIERCE A. E. (1968). Silylation of organic compounds. Pierce Chemicals Company. Rockford, IL.
- PIERCE A. E. (1993). GC-Derivatization. Pierce Chemicals Company. Rockford, IL.
- PIZZI A. (1983). Tannin-based wood adhesives. En Pizzi A. (Ed.). *Wood adhesives: chemistry and technology*. Marcel Dekker, Inc., New York. p. 177-246.
- PIZZI A. (1992). Tannin structure and the formulation of tannin based wood adhesives. *Basic Life Sci.* 59(Plant Polyphenols): 991-1003.
- PIZZI A. (1993). Natural polyphenols in the wood adhesives industry. En Scalbert A. (Ed.). *Polyphenolic Phenom.*: 267-274.
- PIZZI A., ROSSOUW D. du T., DALING G. M. E. (1980). The role of aldehydes other than HCHO in tannin-based wood adhesives. *Holzforsch. Holzverwert* 32: 101.
- PIZZI A., CAMERON F. A. (1986). Flavonoid tannins-structural wood components for

drought-resistance mechanisms of plants. *Wood Sci. Technol.* **20**: 119.

POLUNIN O. (1977). Guía de campo de las flores de Europa. Editorial Omega. Barcelona.

PORTER L. J. (1989 a). Tannins. En *Methods in plant biochemistry*, Vol. 1. p. 389-419. Academic Press, New York.

PORTER L. J. (1989 b). Viscosity and formaldehyde consumption of procyanidin solutions. En Hemingway R. W., Corner A. H., Branham S. J. (Eds.). *Adhesives from renewable resources*. Symposium series, No. 385, American Chemical Society, Washington, DC. p. 172-184.

PORTER L. J. (1992). Structure and chemical properties of the condensed tannins. *Basic Life Sci.* **59**(Plant Polyphenols): 245-258.

PORTER L. J., HRSTICH L. N., CHAN B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **25**: 223.

PORTER L. J., WONG R. Y., BENSON M., CHAN B. G., VISWANADHAN V. N., GANDOUR R. D., MATTICE W. (1986 a). Conformational analysis of flavans. *J. Chem. Res.* (S): 86-87. (M): 0830-0880.

PRICE M. P., BUTLER L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* **25**: 1268.

PRICE M. L., VAN SCOYOC S., BUTLER L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* **26**: 1214.

PUTMAN L. J., BUTLER L. G. (1985). Fractionation of condensed tannins by counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* **318**: 85.

PUTMAN L. J., BUTLER L. G. (1989). Separation of high molecular weight sorghum procyanidins by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **37**: 943.

RANDALL J. M., BERMAN R. L., GARRET V., WAISS A. C. Jr. (1974). Use of bark to remove heavy metal ions from waste solutions. *For. Prod. J.* 24(9): 80.

RADFORD T., De JONGH D. C. (1972). En Waller G. R. (Ed.). *Biomedical applications of mass spectrometry*. Wiley Interscience, New York, p. 313.

RIBEREAU-GAYON P. (1968). *Les composés phenoliques des vegetaux*. Dunod, Paris.

RIBEREAU-GAYON P. (1972). *Plant phenolics*. Hafner Publishing Co. New York. p. 135-168.

RICARDO da SILVA J. M., RIGAUD J., CHEYNIER V., CHEMINAT A., MOUTOUNET M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* 30(4): 1259.

RIGAUD J., PEREZ ILZARBE J., RICARDO da SILVA J. M., CHEYNIER V. (1991). Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 540: 401.

RIGAUD J., ESCRIBANO-BAILON M. T., PRIEUR C., SOUQUET J. M., CHEYNIER V. (1993). Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *J. Chromatogr.* 654: 255.

ROBINSON G. M., ROBINSON R. (1993). A survey of anthocyanins. Part III. *Biochem. J.* 27: 206.

ROUX D. G. (1959). Methods of fractionation and identification of constituents of condensed tannins. *J. Am. Leather Chem. Assn.* 53: 384.

ROUX D. G. (1972). Recent advances in the chemistry and chemical utilization of the natural condensed tannins. *Phytochemistry* 11: 1219.

ROUX D. G., EWELYN S. R. (1958). Condensed tannins. 1. A study of complex leucoanthocyanins present in condensed tannins. *Biochem. J.* 69: 530.

- ROUX D. G., FERREIRA D., HUNDT H. K. L., MALAN E. (1975). Structure, stereochemistry and reactivity of natural condensed tannins as basis for their extended industrial application. En Timell T. E. (Ed.). *Proc. of the eight cellulose conf.* Appl. Polym Symp. No. 28. John Wiley and Sons, New York.
- ROUX D. G., FERREIRA D. (1985). Rationalization of divergent condensation sequences in flavanoid oligomerization. *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* 25: 221.
- RUIZ DE LA TORRE J. (1979). Arboles y arbustos de ls España peninsular. Publicaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Madrid.
- RYDER T. B., HEDRICK S. A., BELL J. N., LIANG X., CLOUSE S. D., LAMB C. J. (1987). Organization and differential activation of gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseous vulgaris*. *Mol. Gen. Genet* 210: 219.
- SAIJO R. (1983). Pathway of gallic acid biosynthesis and its esterification with catechins in young tea shoots. *Agric. Biol. Chem.* 47(3): 455.
- SAKAR S. K., HOWARTH R. E. (1976). Specificity of the vanillin test for flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 24: 317.
- SAMEJIMA M., YOSHIMOTO T. (1979). Procyanidins from the inner bark of sugi (*Cryptomerin japonica* D. Don). *Mokuzai Gakkaishi* 25: 671.
- SAMEJIMA M., YOSHIMOTO T. (1981). General aspects of phenolic extractives from coniferous barks. *Mokuzai Gakkaishi* 27(6): 491.
- SCALBERT A. (1991). Review article number 63. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30(12): 3875.
- SCALBERT A. (1992). Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. *Basic Life Sci.* 59(Plant Polyphenols): 259-280.
- SCALBERT A., MONTIES B., FAVRE J. M. (1988). Polyphenols of *Quercus rubur*:

adult tree and in vitro grown calli and shoots. *Phytochemistry* 27(11): 3483.

SCALBERT A., MONTIES B., JANIN G. (1989). Tannins in wood: comparaisón of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.* 37: 1324.

SCALBERT A., DUVAL L., PENG S., MONTIES B., PENHOAT C. (1990). Polyphenols of *Quercus robur* L. 11^a. Preparative isolation by low-pressure and high-pressure liquid chromatography of heartwood ellagitannins. *J. Chromatogr.* 502: 107.

SCALBERT A., HASLAM E. (1987). Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur*. *Phytochemistry* 26: 3191.

SCHMIDT O. Th., SCHLUZ J., FIESSER. (1967). Natural tannins. XXXVIII. Myrobalan tannins. *Justus Liebigs. Ann. Chem.* 706: 187.

SCHMIDT S. W., DENZEL K., SCHILLING G., GROSS G. G. (1987). Enzymatic synthesis of 1,6-digalloylglucose from β -glucogallin: β -glucogallin 6-O-galloyltransferase from oak leaves. *Z. Naturforsch.* 42c: 87.

SCHULTEN H. R., GAMES D. E. (1974). High resolution field desorption mass spectrometry. II. Glycosides. *Biomed. Mass Spectrom.* 1: 120.

SCHULTZ J. C. (1989). Tannin-insect interactions. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 417-434.

SEARS K. D., CASEBIER R. L. (1968). Cleavage of proanthocyanidins with thioglycollic acid. *J. Chem. Soc. Chem. Commun:* 1437.

SEARS K. D. (1972). Sulfonation of catechin. *J. Org. Chem.* 37: 3546.

SEIKEL M. K., HILLIS W. E. (1970). Hydrolysable tannins of *Eucalyptus delegatensis* wood. *Phytochemistry* 9: 1115.

SEKHON B. S., KAUSHAL G. P., BHATIA I. S. (1983). Use of zirconium(IV) and

antimony(III) for structural investigation of flavonoids. *Mikrochim. Acta* (Wien) II: 421.

SELF R., EAGLES J., GALLETTI G. C., MUELLER-HARVEY I., HARTLEY R. D., LEA A. G. H., MAGNOLATO D., RICHLI U., GUJER R., HASLAM E. (1986). Fast atom bombardment mass spectrometry of polyphenols (*syn.* vegetable tannins). *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 13: 449.

SINGH B. K., CONNELLY J. A. (1985). Chorismate mutase isozymes from *Sorghum bicolor*: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 374.

SINGLETON V. L., ROSSI J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics and phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144.

SLABBERT N. (1992). Complexation of condensed tannins with metal ions. *Basic Life Sci.* 59(Plant Polyphenols): 421-436.

STAFFORD H. A. (1989). The enzymology of proanthocyanidin biosynthesis. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 47-70.

STAFFORD H. A. (1993). Proanthocyanidin and flavan-3-ol biosynthesis: comparison with the anthocyanidin pathway and future needs. En Scalbert A. (Ed). *Polyphenolic Phenom.*: 73-80.

STAFFORD H. A., CHENG T. Y. (1980). The procyanidins of douglas fir seedlings, callus and cell suspension cultures derived from cotyledons. *Phytochemistry* 19: 131.

STAFFORD H. A., LESTER H. H. (1985). Flavan-3-ol biosynthesis. The conversion of (+)-dihydromyricetin to its flavan-3,4-diol (leucodelphinidin) and to (+)-gallocatechin by reductases extracted from tissue cultures of *Ginkgo biloba* and *Pseudotsuga menziesii*. *Plant Physiol.* 78: 791.

STERMER B. A., HAMMERSCHMIDT R. (1984). Heat shock induces resistance to *Cladosporium cucumerinum* and enhances peroxidase activity in cucumbers. *Physiol. Plant*

Pathol. **25**: 239.

SUN D., WONG H., FOO L. Y. (1987). Proanthocyanidin dimers and polymers from *Quercus dentata*. *Phytochemistry* **26**: 1825.

SWAIN T. (1979). Tannins and lignins. En Rosenthal G. A., Janzen D. H. (Eds.). *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolism*. Academic Press, New York. p. 657-682.

SWAIN T., HILLIS W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* **10**: 63.

SWEELEY C. C., BENTLEY R., MAKITA M., WELLS W. W. (1963). Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2497.

SZTEJNBERG A., AZAIZA H., CHET I. (1983). The possible role of phenolic compounds in resistance of horticultural crops to *Dematophora necatrix* Hartig. *Phytopathol. z.* **107**: 318.

THOMPSON R. S., JACKES D., HASLAM E., TANNER R. J. N. (1972). Plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction: the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin* **1**: 1387.

TIARKS A. E., BRIDGES J. R., HEMINGWAY R. W., SHOULDERS E. (1989). Condensed tannins in southern pine and their interactions with the ecosystem. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 369-390.

TISLER V. (1992). Spruce tannins in specialty applications. *Basic Life Sci.* **59**(Plant Polyphenols): 967-977.

TOBIASON F. L., HOFF L. A. (1989). MNDO molecular orbital analysis of models for proanthocyanidin-methylol reactions. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.).

- Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 205-226.
- TREUTTER D. (1989). Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr.* **467**: 185.
- VANDE CASTEELE K., GEIGER H., DeLOOSE R., VAN SUMERE C. F. (1983). Separation of some anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidins and related substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **259**: 291.
- VENERE R. J. (1980). Role of peroxidase in cotton resistant to bacterial blight. *Plant Sci. Lett.* **20**: 47.
- VERZELE N., DELAHAYE P., Van DAMME F. (1986). Determination of the tanning capacity of tannic acids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **362**: 363.
- VIVIERS P. M., BOTHA J. J., FERREIRA D., ROUX D. G. (1983). Synthesis of condensed tannins. Part 7. Angular [4,6: 4,8]-prorobinetinidin triflavanoids from black wattle ("Mimosa") bark extract. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 17.
- WAITE T. (1991). Tannin analysis: a 130 years problem. *J. Soc. Leather Tech. Chemists* **76**: 187.
- WALKINSHAW C. H. (1989). Are tannins resistance factors against rust fungi?. En R. W. Hemingway y J. J. Karchesy (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. N. Y. y London. p. 435-446.
- WATTERSON J. J., BUTLER L. G. (1983). Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. *J. Agric. Food Chem.* **31**: 41.
- WEINGES K., MATTAUCH H., WILKINS C., FROST D. (1971). Spektroskopische und

chemische konstitutionsaufklärung des dehydro-dicatechins A. *Liebigs Ann. Chem.* **754**: 124.

WILKINS C. (1988). Galloyl glucose derivatives from *Heucea cylindrica*. *Phytochemistry* **27**: 2317.

WILKINS C. K., BOHM B. A. (1976). Ellagitannins from *Tellima grandiflora*. *Phytochemistry* **15**: 211.

WILLIAMS V. M., PORTER L. J., HEMINGWAY R. W. (1983a). Molecular weight profiles of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry* **22**: 569.

WILLIAMS D. H., SMITH R. J., SANTIKARN S., MAGGIO J. E., DALEY D. J., BRADLEY C. V. (1983b). FAB mass spectrometry of some biopolymers. *Spectros. Int. J.* **2**: 232.

WILLIAMS D. H., FINDEIS A. F., NAYLOR S., GIBSON B. W. (1987). Aspects of the production of FAB and SIMS mass spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 1980.

WILSON T. C., HAGERMAN A. E. (1990). Quantitative determination of ellagic acid. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 1678.

YA C., GAFFNEY S. H., LILLEY T. H., HASLAM E. (1989). Carbohydrate-polyphenol complexation. En Hemingway R. W., Karchesy J. J. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York y London. p. 307-322.

YAU W. W., KIRKLAND J. J., BLY D. D. (1979). Modern size exclusion chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography. John Wiley and Sons, New York.

YAZAKI Y., HILLIS W. E. (1976). Polyphenols of *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus regnans* and *Eucalyptus deghipta*. *Phytochemistry* **15**: 1180.

YAZAKI Y., COLLINS P. J., IWASHINA T. (1993). Extractives from blackbutt

(*Eucalyptus pilularis*) wood which affect gluebond quality of phenolic resins. *Holzforschung* 47: 412.

YOKOYAMA V. Y., MACKEY B. E. (1987). Protein and tannin in upper, middle and lower cotton plant strata and cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae) growth on foliage. *J. Econ. Entomol.* 80: 843.

YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA T., MEMON M. V., SHINGU T., INOUE K., FUKUSHIMA K. (1983). Nuclear magnetic resonance and mass spectral analyses of oligomeric hydrolyzable tannins and related tannins. *Tenne Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yushishu* 26: 158.

YOSHIDA T., MARUYAMA Y., MEMON M. V., SHINGU T., OKUDA T. (1985). Tannins of rosaceous medicinal plants. Part 3. Genins D, E and F, ellagitannins from *Geum japonicum*. *Phytochemistry* 24: 1041.

YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA T. (1989). Chromatography of tannins. IV. Separation of labile oligomeric hydrolyzable tannins and related polyphenols by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr.* 467: 139.

YOSHIDA T., HATANO T., KUWAJIMA T., OKUDA T. (1992 a). Oligomeric hydrolyzable tannins: their ^1H NMR spectra and partial degradation. *Heterocycles* 33(1): 463.

YOSHIDA T., MARUYAMA T., NITTA A., OKUDA T. (1992 b). Eucalbanins A, D and C monomeric and dimeric hydrolyzable tannins from *Eucalyptus alba* Reinw. *Chem. Pharm. Bull.* 40(7): 1750.

YOUNG D. A., KOLODZIEJ H., FERREIRA D., ROUX D. G. (1985). Synthesis of condensed tannins. Part 16. Stereochemical differentiation of the first "angular" (2S,3R)-profisetinidin tetraflavanoids from *Rhus lancea* (Karree) and the varying dynamic behaviour of their derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2537.

YOUNG E., BRANDT E. V., YOUNG D. A., FERREIRA D., ROUX D. G. (1986). Synthesis of condensed tannins. Part 17. Oligomeric (2R,3S)-3,3',4',7,8-pentahydroxyflavans: atropisomerism and conformation of biphenyl and m-terphenyl analogues from *Prosopis glandulosa* ("Mesquite"). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 1737.

YOUNG D. A., YOUNG E., ROUX D. G., BRANDT E. V., FERREIRA D. (1987). Synthesis of condensed tannins. Part 19. Phenol oxidative coupling of (+)-catechin and (+)-mesquitol. Conformation of bis-(+)-catechins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2345.

ZENK M. H. (1964). Zur frage der biosynthese von gallussaure. *Z. Naturforsch.* **196**: 83.

ZHANG T. Y., XIAO R., XIAO Z. Y., PANNEL L. K., ITO Y. (1988). Rapid separation of flavanoids by analytical highspeed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* **445**: 199.