

ESTABILIDAD EN CONDICIONES DRÁSTICAS DEL CIKRON-H

A. Escobar*, Tania Pérez**, Yamilka Riverón***, Luz M. Sánchez*, O. Fernández*
y Evangelina Marrero*

*Departamento de Química-Farmacología-Toxicología; **Producciones Biofarmacéuticas;

***Aseguramiento de Calidad. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10,
San José las Lajas, La Habana Cuba. Correo electrónico: escobar@censa.edu.cu

RESUMEN: Se evaluó el producto CIKRON-H y su componente activo mayoritario en condiciones drásticas, a través del perfil cromatográfico e indicadores de taninos y compuestos fenólicos polimerizados. Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución (CLAR) con una columna de fase reversa C18 y metanol al 60% como fase móvil. Los indicadores que mejor reflejaron la degradación del componente activo mayoritario en el producto CIKRON-H fueron los taninos totales, el porcentaje de compuestos fenólicos polimerizados (CFP) y su perfil cromatográfico (área de CFP). El compuesto mayoritario parcialmente purificado mostró un mayor efecto a la oxidación que el producto en su totalidad, incrementando su coloración. El peróxido de hidrógeno constituyó el mejor modelo para simular una oxidación en el producto en condiciones drásticas.

(Palabras clave: CIKRON-H; polifenoles; condiciones drásticas; taninos)

STABILITY OF CIKRON-H UNDER STRESS CONDITIONS

ABSTRACT: CIKRON-H and its major component were evaluated under stress conditions through the chromatographic profile, tannin indicators and polymerized polyphenolic compounds. Liquid chromatography with a reverse phase column (C18) and methanol at 60% as mobile phase was used. The indicators that better reflect the degradation of the major component in CIKRON-H were total tannins, percentage of polymerized polyphenolic compounds (PPC) and chromatographic profile. The major compound partially purified showed a higher effect to oxidation than the product, increasing its coloration. Hydrogen peroxide constituted the best model to simulate an oxidation in the product under stress conditions.

(Key words: CIKRON-H; polyphenols; stress conditions; tannin)

INTRODUCCIÓN

CIKRON-H es un producto obtenido a partir de la corteza de *Rhizophora mangle* L que presenta indicaciones como antiséptico, estimulante de la curación de heridas, antiinflamatorio, antioxidante y analgésico.(1; 5,11, 12; 14), el mismo se comercializa por la casa comercial C-KURE en frascos de polietileno de alta densidad en dos presentaciones (30 y 500 mL).

Los compuestos fenólicos polimerizados son los componentes mayoritarios del producto CIKRON-H donde el 80% corresponde a taninos condensados y el 20% a taninos hidrolizables (19). La estructura química de los taninos condensados no ha sido identificada, sin embargo en la fracción de bajo peso

molecular están presentes catequina, epicatequina, ácido elágico, ácido clorogénico y ácido gálico (19).

Estudios biológicos realizados con el extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* L. y de sus fracciones de alto y bajo peso molecular han demostrado efectos antioxidantes (17) y actividad inhibitoria de la enzima ciclooxigenasa 2 y fosfolipasa A2 (11), lo que corrobora que la acción biológica del producto no se debe a una sola molécula.

Organismos nacionales e internacionales, para el registro de un medicamento, regulan que en los estudios de estabilidad de una forma farmacéutica líquida se deben evaluar sus características organolépticas, pH, productos de degradación, contenido microbiano, actividad biológica y se deben contar con métodos

validados para evaluar el principio activo (2). Cuando los medicamentos son obtenidos a partir de productos naturales, los estudios de estabilidad se dificultan al no tener un compuesto único, por lo que se requiere desarrollar metodologías propias que garanticen la calidad del producto (24).

Fue objetivo de este trabajo estudiar los perfiles cromatográficos y los indicadores de taninos y compuestos fenólicos polimerizados del producto CIKRON-H y su compuesto activo mayoritario expuesto a condiciones drásticas, para establecer los indicadores óptimo que permitan evaluar el producto en condiciones de anaquel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectó la corteza de *Rhizophora mangle* L de árboles adultos de la provincia de la Habana en octubre del 2003, la autenticidad de la planta fue confirmada por el Jardín Botánico Nacional, depositando una muestra de la misma.

El material colectado se secó a temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) hasta alcanzar una humedad inferior al 15%, posteriormente se guardó en sacos de polietileno y se almacenó en un local a temperatura ambiente y humedad relativa inferior al 80%.

Preparación del extracto acuoso

Se pesó 100 g de la corteza de *Rhizophora mangle* L previamente molinada y se le adicionó un litro de agua desionizada para una concentración final del 10%, y se puso en un reactor de acero inoxidable de 2,5 L con agitación de 200 rpm a una temperatura de 90°C durante 60 minutos, seguidamente se centrifugó a 3000 rpm para eliminar los residuos sólidos. El extracto acuoso se almacenó a temperatura ambiente en frascos plásticos de polietileno de alta densidad hasta su análisis.

El producto CIKRON-H (No Lote C500011002) fue proporcionado por el Laboratorio Mario Muñoz de la Industria Médico Farmacéutica, MINBAS.

Evaluaciones físico químicas

Taninos totales (TT): Se realizó mediante una precipitación cuantitativa de los taninos en el extracto acuoso o del producto con albúmina sérica y su posterior determinación colorimétrica con cloruro férrico (21).

Compuestos fenólicos polimerizados (CFP): Se precipitaron a partir del extracto acuoso o del producto con cloruro de sodio (16) y se caracterizaron por cromatografía líquida de alta resolución, empleando un detector UV

(modelo Knauer) a 280 nm en un rango de 002 y una columna de fase reversa (Kromasil 100C18 $5\mu\text{m}$ $15 \times 0,4$ cm), como fase móvil se empleó una solución de metanol al 60% en ácido acético al 1% y se aplicó 10 μL de la muestra previamente filtrada por $0,45\mu\text{m}$. Los cromatogramas fueron registrados usando una interfase TIC-8EA y procesados con el software BIOCROM (6).

Evaluaciones en condiciones drásticas

Efecto de agente oxidante (Peróxido de hidrógeno) en el compuesto mayoritario precipitado con cloruro de sodio

Los compuestos fenólicos polimerizados (CFP) provenientes del extracto acuoso de corteza de *Rhizophora mangle* L (1 mg peso seco/mL equivale 0.11 mg TT/mL) se pusieron en contacto con una solución de peróxido de hidrógeno a diferentes porcentajes (1, 5 y 10%) y se evaluaron a las 68 horas los perfiles cromatográficos de cada solución. El cálculo del porcentaje de reducción en el área del primer pico en el tiempo se calculó a partir de los resultados obtenidos en el tiempo cero de cada variante ensayada. Se realizó un análisis de regresión en el tiempo para cada concentración vs porcentaje de degradación.

Efecto de la fotólisis (Luz ultravioleta)

Cien mililitros del compuesto mayoritario (1mg PS/mL 0.11 mgTT/mL) se expusieron a luz ultravioleta de 254 y 362 nm durante 7 días, midiendo el área del pico a través de su perfil cromatográfico por HPLC y los cambios de coloración en el frasco. El cálculo del porcentaje de reducción en el área se determinó a partir de los resultados obtenidos en el tiempo cero.

Efecto de agente oxidante (Peróxido de hidrógeno) en el CIKRON-H

A 50 mL del producto CIKRON-H se le adicionó 8.3 mL de una solución de peróxido de hidrógeno (30%) para una concentración final del 5% (v/v) del agente oxidante y se mantuvo durante dos horas a 40°C , manteniendo un control sin peróxido a temperatura ambiente y otro a 40°C para evaluar el efecto de la temperatura en condiciones drásticas. Se emplearon tres réplicas en el ensayo.

Efecto del aire y la temperatura en el CIKRON-H

Método A: A 50 mL del producto CIKRON-H se le burbujeó aire comprimido a una presión de 2.5 psi durante tres horas a 40°C , seguidamente se mantuvo en reposo durante 16 horas a esta temperatura.

Método B: A 50 ml del producto CIKRON-H se le burbujeó aire comprimido a una presión de 2.5 psi du-

rante una hora a 100°C, seguidamente se mantuvo en reposo durante 16 horas a temperatura ambiente.

Se consideró como control la misma muestra sin burbujear aire a temperatura ambiente en cada uno de los métodos ensayados, 3 réplicas en cada una de las variantes ensayadas.

En todos los ensayos con el producto CIKRON-H se determinaron los taninos totales, porcentaje de CFP y perfil cromatográfico del CFP.

Análisis estadísticos

Se realizó una prueba no paramétrica (Kruskall Wallis) para determinar si existían diferencias significativas con respecto al tratamiento del peróxido y efecto de la temperatura en los indicadores de indicadores de taninos totales, porcentaje de CFP y perfil cromatográfico del CFP en los ensayos con el CIKRON-H.

Se realizó una prueba de T-student de dos colas ($p < 0.5$) para determinar si existían diferencias significativas entre las muestras oxidadas a diferentes temperaturas.

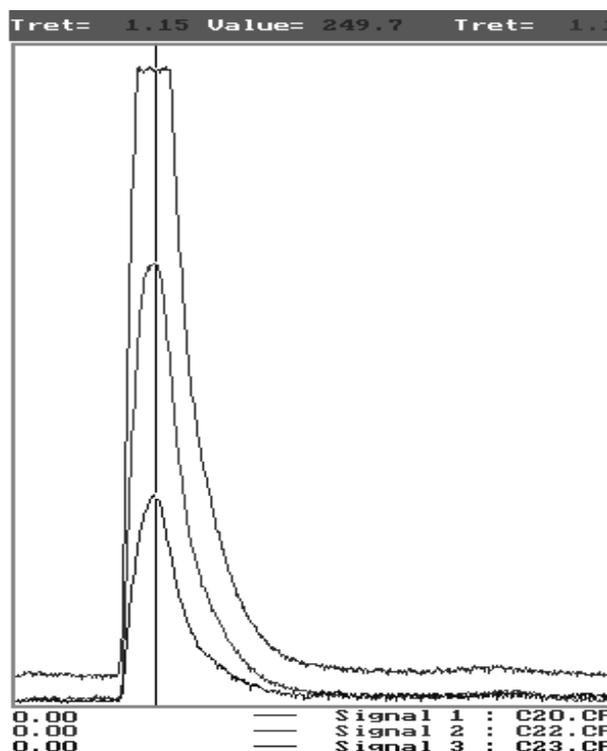
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El producto CIKRON-H está compuesto por una mezcla compleja de compuestos polifenoles, donde no se puede enmarcar uno como el responsable de la actividad biológica, esta característica es muy común cuando se evalúan productos naturales (4; 8).

Más del 90% de los componentes fenólicos presentes en el CIKRON-H precipitan con el cloruro de sodio constituyendo principalmente taninos condensados en forma polimerizada. La separación y determinación de estos polifenoles se dificulta debido a la enorme variedad de isómeros y oligómeros con diferentes grados de polimerización (24).

En la Figura 1 se muestra el perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos polimerizados obtenidos a partir del extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* L. donde aparece un solo pico, debido a la alta polaridad que presenta estos compuestos de alta masa molecular, que hace que su hidrofobicidad disminuya con el incremento del grado de polimerización (24), por otra parte el empleo de metanol al 60% como fase móvil favorece la obtención de un solo pico, ya que no permite la separación entre ellos.

El CIKRON-H además del principio activo contiene otros excipientes que forman parte de su formulación como son metil parabeno (MP) y propil parabeno



Identificación	Conc	Area MV
C20	5 mg/mL	141.8
C22	1 mg/mL	82.1
C23	0.5 mg/mL	36.6

FIGURA 1. Perfil cromatográfico del componente mayoritario obtenido a partir del extracto acuoso./ *Chromatographic profile of major component from watery extract.*

(PP) (22). Estos excipientes pueden precipitar con el cloruro de sodio en forma de benzoato debido a que presentan una estructura del tipo ésteres del ácido 4 hidroxibenzoico, lo que implica que el método de análisis propuesto debe identificar con un alto grado de especificidad estos componentes sin que interfieran entre sí.

En la Figura 2 se observa el perfil cromatográfico obtenido a partir del producto CIKRON-H donde aparecen dos picos en los tiempos de retención de 0.95 y 2.99 min que corresponde con los CFP y el MP respectivamente, no aparece el PP (7.12 min), ya que se encuentra en una concentración inferior al MP (nueve veces), a diferencia del análisis en la muestra directa donde aparecen el MP y PP con tiempos de retención de 3.76 y 5.34 min respectivamente (22). La no coincidencia en los tiempos de retención se debe a que ambos trabajos emplean diferentes columnas y fase móvil durante la separación.

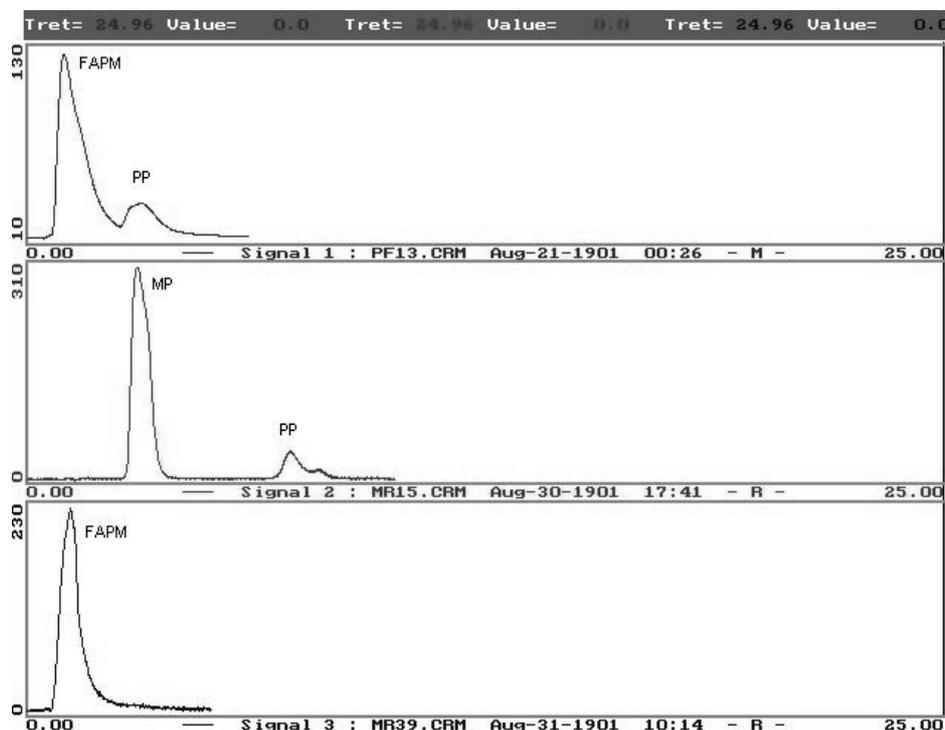


FIGURA 2. Perfil cromatográfico del producto CIKRON./ *Chromatographic profile of CIKRON product.*

Las condiciones de ensayo preestablecidas empleando columna de fase reversa y fase móvil de metanol al 60% con un flujo de 1 mL/min nos permite identificar los tres componentes fundamentales que conforman el producto CIKRON-H sin interferencia, donde los compuestos fenólicos polimerizados se agrupan en un solo pico. Otros estudios donde emplean columnas de exclusión con soportes de sephadex LH 20 (15; 16) o del tipo TSK (23), incluso con columnas de fase reversa o normal (9; 25) para la identificación de compuestos fenólicos polimerizados, logran alcanzar mayor resolución entre sus componentes. Sin embargo a pesar de no tener una identificación físico-química del componente mayoritario en el producto CIKRON-H, el método propuesto a partir de su perfil cromatográfico es capaz de identificar los productos de degradación que se forman a partir de una oxidación.

En la Figura 3. aparece el perfil cromatográfico del CFP en presencia del agente oxidante (H_2O_2 1%) observándose la formación de un segundo pico a los 1.31 min con respecto al control. Este segundo pico puede ser debido a la ruptura de monómeros de bajo peso molecular del tanino polimerizado, donde el área del segundo pico va aumentando. El producto de degradación que se forma durante la oxidación es dependiente de la concentración y muestra un coeficiente de regresión mayor de 0.80 (Tabla 1).

El CFP expuesto a la luz ultravioleta mostró una reducción en el área del 30% al final del ensayo con respecto a su valor inicial y el extracto acuoso se tornó de un color carmelita claro a un carmelita oscuro evidenciando una oxidación en sus componentes (Tabla 2). El cambio de color es característico de estas sustancias cuando se van oxidando debido a que aumenta el grado de polimerización (13). Por otra parte el color también puede estar influenciado por el pH, las condiciones de almacenamiento, la luz y otros compuestos fenólicos o flavonoides que puedan estar presentes en la solución (17,10).

Los indicadores taninos totales, porcentaje de compuestos fenólicos y perfil cromatográfico del CIKRON-H expuesto a diferentes condiciones drásticas se muestran en las Tablas 3 y 4. En presencia del agente oxidante (peróxido) (Tabla 3) existieron diferencia significativa ($p < 0.05$) en los indicadores evaluados, mostrando una reducción del 10% en el área de la muestra oxidada, mientras el producto a temperatura extrema ($100^\circ C$) (Tabla 4), no mostró diferencias significativas en los indicadores de taninos y porcentaje de compuestos polifenólicos. De los resultados que se muestran en las Tablas 3 y 4 se pueden decir, que el producto CIKRON-H es termo estable, ya que no se afecta los valores de taninos, ni el porcentaje de compuestos fenólicos polimerizados cuando el producto fue expuesto a 40 y $100^\circ C$ y solamente el perfil cromatográfico de la muestra expuesta a $100^\circ C$ fue ligeramente significativo.

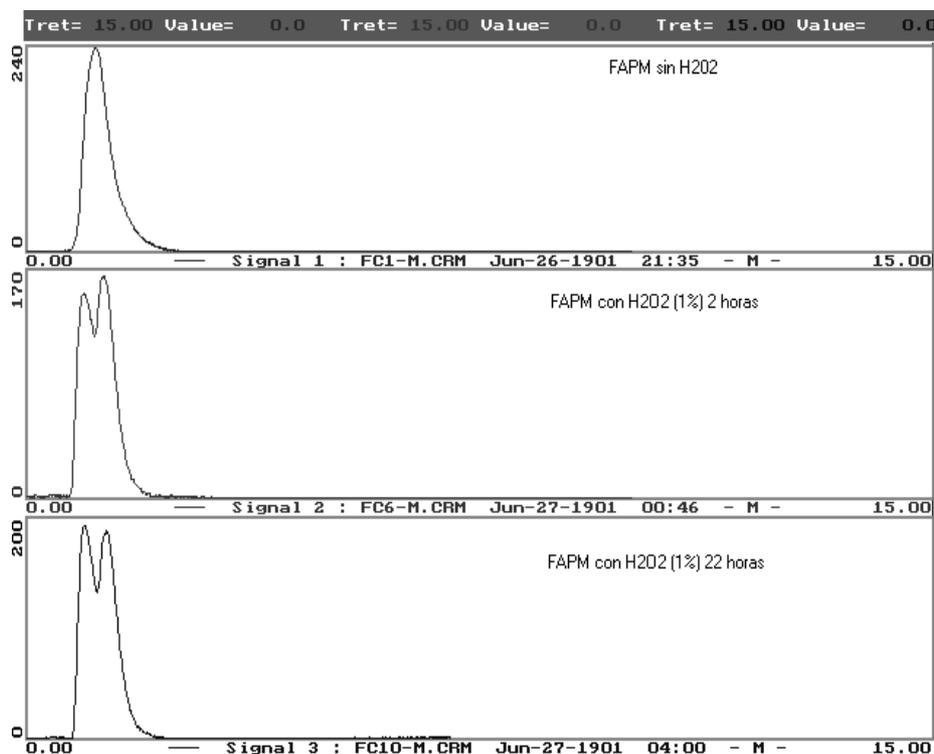


FIGURA 3. Perfil cromatográfico del compuesto fenólicos polimerizados (CPF) en presencia de H₂O₂ (1%)./ *Chromatographic profile of polymerized polyphenolic compounds in presence of H₂O₂ (1%).*

TABLA 1. Porcentaje de degradación de compuestos fenólicos polimerizados (CFP) en función de la concentración del peróxido a las 68 h./ *Percentage of the polymerized polyphenolic compound degradation based on the concentration of peroxide at 68 h*

% H ₂ O ₂	% reducción del área del primer pico
1	58±5
5	85±12
10	93±7
Coef.Reg	0.87

Quando se analiza el componente mayoritario (fenoles polimerizados que corresponde principalmente a taninos condensados) expuesto al peróxido de hidrógeno (5%) se observa una mayor reducción del área del primer pico (85% Tabla 1), con respecto al producto CIKRON-H donde la reducción fue del 10% (Tabla 3), esto puede deberse a que se encuentra parcialmente purificado, mientras en el producto en su conjunto aparecen otras moléculas (fenoles de bajo peso molecular) que hacen que la cinética de aparición de otros componentes sea más lenta debido al efecto protector que puedan ejercer moléculas tales como la catequina y epicatequina que presentan propiedades antioxidantes.(18)). Lo anteriormente mencionado está en correspondencia con el estudio de

TABLA 2. Porcentaje de degradación de compuestos fenólicos polimerizados (CFP) l CFP expuesto a luz ultravioleta (254 y 362 nm)./ *Percentage of polymerized polyphenolic compound degradation exposed to ultraviolet light (254 and 362 nm)*

Tiempo (h)	Área MV2	% Degradación	Color
0	126	0	Carmelita claro
2	119	6	Carmelita claro
22	123	2	Carmelita claro
26	113	10	Carmelita claro
45	112	11	Carmelita claro
68	110	13	Carmelita mate
163	88	30	Carmelita oscuro

estabilidad de un pigmento de color púrpura obtenido de *hordeumin* donde se corroboró que los extractos totales presentaron mayor estabilidad cuando se compararon con estándares o sustancias parcialmente purificadas (3).

TABLA 3. Efecto del peróxido (5%) en los indicadores de calidad del producto CIKRON-H./ *Effect of peroxide (5%) in the quality indicators of the product CIKRON-H*

Efecto en CIKRON-H	TT extracto mg/mL	% CFP	Perfil cromatográfico		
			% 1er Pico	Área corregida MV2	Reducción del área (%)
S/H ₂ O ₂ 40°C	13.6±0.95 a	94.7±0.79 a	94±1.5	56.45±10.8 a	0
C/H ₂ O ₂ 40°C	8.58±0.98 b	98.7±1.00 b	94±2.3	49.78±9.27 a	10.16
Control TA	13.29±1.00 a	94.6±0.85 a	94±2.3	55.41±7.40 a	0

Letras desiguales por columna significan diferencia significativa (p<00.5).

Valores expresado como MEDIA ±DE

TABLA 4. Efecto de la temperatura en los indicadores de calidad del producto CIKRON-H./ *Effect of temperature in the quality indicators of the product CIKRON-H*

Método	Tratamiento	TT extracto mg/mL	% CFP	Perfil cromatográfico	
				Área corregida MV	(%) reducción del área
A (40 °C)	Oxidado	15.62±0.83 a	96.14±0.85 a	10.09±1.38 a	3.33
	Sin Oxidar	14.14±1.73 a	96.10±0.73 a	10.51±1.88 a	
	P(T≤ t) dos colas	0,1019	0.9456	0.7002	
B (100 °C)	Oxidado	9.63±0.29 a	92.53±4.70 a	3.39±0.48 a	22.25
	Sin Oxidar	9.87±0.29 a	90.13±0.40 a	4.35± 0.34 b	
	P(T≤ t) dos colas	0.4470	0.4718	0.0461	

Letras desiguales por columna significan diferencia significativa (p<00.5).

Valores expresado como MEDIA ±DE

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran que la oxidación y la polimerización son los dos eventos más importantes que causan inestabilidad de compuestos polifenólicos, estos se observan cuando el producto fue expuesto a diferentes agentes oxidantes ocurriendo diferentes cambios físico químico en la composición del producto. Un estudio realizado sobre el compuesto mayoritario presente en el té, mostró que la autooxidación y la polimerización son las principales causas de la inestabilidad del compuesto epigallocatechin-3-gallate donde el grado de afectación está dado por la temperatura, el pH y la presión parcial de oxígeno (20). Durante el procesamiento de jugos de frutas en el proceso de oxigenación compuestos como catequina y pronicianidinas fueron afectado en su concentración por la oxidación (7).

De manera general los indicadores que mejor reflejaron la degradación del componente activo mayoritario en el producto CIKRON-H fueron los taninos totales, el porcentaje de compuestos fenólicos polimerizados (CFP) y su perfil cromatográfico (área de CFP), constituyendo estos una alternativa en la evaluación de la estabilidad del producto en condiciones de anaquel.

REFERENCIAS

1. Bulnes, C., Fernandez, O.; Navarro, D.; Marrero, E.; Rueda, D.; Figueroa, O.; Melchor, G. y Proenza, T. (2001). Healing effect of a red mangrove extract on open aseptic wounds in rats. *Rev. Salud Anim.* 23(2):102-108.
2. CECMED (2000): Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. Regulación 23.
3. Deguchi, T.; Shohara, S.; Ohba, R. y Ueda, S. (2000): Effects of pH and light on the storage stability of the purple pigment, hordeumin, from uncooked barley bran fermented broth. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 64(10): 2236-9.
4. Del Carlo, M.; Sacchetti, G.; Di Mattia, C.; Compagnone, D.; Mastrocola, D.; Liberatore, L. y Cichelli, A. (2004): Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 52(13): 4072-9.

5. Fernández, O.; Capdevila, J.; Dalla, G. y Melchor, G. (2002). Efficacy of *Rhizophora mangle* bark aqueous extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*. 73 (7/8): 564-568.
6. Gómez, A. (1992): BioCROM. Sistema automatizado de cromatografía líquida. Manual de usuario. Versión 2.1.
7. Guyot, S.; Marnet, N.; Sanoner, P.; Drilleau, J.F. (2003): Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *J. Agric. Food Chem.* 51(25): 7522.
8. Hernández, Maureen y Prieto, A. (1999): Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro de estilo de vida. *Revista Cubana Investigaciones Biomedica*. 18(1): 12-14.
9. Li, Z.; Wangl, L.; Yang, G.; Shi, H.; Jiang, C.; Liu, W. y Zhang, Y. (2003): Study on the Determination of Polyphenols in Tobacco by HPLC Coupled with ESI-MS after Solid-Phase Extraction. *Journal of Chromatographic Science*. 41(1): 36-40.
10. Malien-Aubert, C.; Dangles, O. y Amiot, M.J. (2002): Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *J. Agric Food Chem.* 50(11): 3299-305.
11. Marrero, E.; Sánchez, J.; Escobar, A.; Melchor, G.; Bermejo, P. y Alcaraz, M.J. (2006): COX-2 and sPLA2 *in vitro* inhibitory activity from aqueous extract and high and low molecular weight polyphenols fractions obtained from *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia*. 77: 313-315.
12. Melchor, G.; Armenteros, M.; Fernández, O.; Linares, E. y Fragas, I. (2001): Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* Bark. *Fitoterapia*. 72(6): 689-691.
13. Melchor, G.; Fernández, O.; Alvarez, E.; Fragas, I y Lobo, E. (2001): Evaluación del efecto antiséptico: *in vivo* de CIKRON-H. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 32(2): 25-30.
14. Melchor, G.; Sánchez, L.M. y Armenteros, Mabelin (2000): Caducidad y vida media del CIKRON mediante estudio de envejecimiento acelerado. *Rev. Salud Anim.* 22(1): 9-12.
15. Ossipova, S.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Loponen, J. y Pihlaja, K. (2001): Proanthocyanidins of mountain birch leaves: quantification and properties. *Phytochem Anal.* 12(2): 128-33.
16. Oszmiannski, J. y Sapis, J.C. (1989): Fractionation and identification of some low molecular weight grape seed phenolic. *J. Agric. Food Chem.* 37: 1293-1297.
17. Rein, M.J. y Heinonen, M. (2004): Stability and enhancement of berry juice color. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3106-3111.
18. Sánchez, J.; Melchor, G.; Martínez, G.; Escobar, A.; Faure, R. (2006): Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* Bark. *Fitoterapia*. 77(2): 141-143.
19. Sánchez, Luz M.; Melchor, Gleiby, Álvarez, Silvia y Bulnes, C. (1998): Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. *Rev. Salud Anim.* 20(2): 69-72.
20. Sang, S.; Lee, M.J.; Hou, Z.; Ho, C.T.; Yang, C.S. (2005): Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J. Agric. Food Chem.* 53(24): 9478-84.
21. Travieso, M.C.; Hechevarria, O.L.; Betancourt, A.; Frontela, M.; y Miranda, I. (1998): Validación del método de determinación de taninos totales en productos naturales vegetales. *Rev. Protección Veg.* 13(2): 189-194.
22. Valcárcel, L. y Fragas, I. (2001): Method for determining methyl and propyl paraben of a product (CIKRON) obtained from natural origin. *Rev. Salud Anim.* 23(2): 109-113.
23. Yanagida, A.; Kanda, T. Takahashi, T.; Kamimura, A.; Hamazono, T. y Honda, S. (2000): Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr A.* 890(2): 251-259.
24. Yanagida, A.; Shoji, T. y Shibusawa, Y. (2003): Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 56(1-3): 311-322.
25. Yanagida, A.; Shoji, T. y Kanda, T. (2002): Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 66(9): 1972-1975.

(Recibido 14-11-2006; Aceptado 10-9-2007)