

# Dosage colorimétrique et identification par HPLC du tanin majoritaire des gousses de *Acacia nilotica*

---

Abdoulaye SEREME<sup>1</sup>, Jeanne MILLOGO-RASOLODIMBY<sup>2</sup>,  
Sita GUINKO<sup>2</sup> et Mouhoussine NACRO<sup>3</sup>

## Résumé

L'analyse par HPLC de l'extrait purifié des gousses d'*Acacia nilotica* révèle que le tanin majoritaire de l'espèce est le tanin gallique. Le dosage montre que la gousse fraîche de l'espèce contient 32,5 % et la gousse sèche 18,9 % de tanins

**Mots-clés :** *Acacia nilotica*, tanins, analyses chimiques.

## Colorimetric assay and HPLC identification of majority tannin of *Acacia nilotica* pods

### Abstract

HPLC analysis of the purified extract from pods of *Acacia nilotica* reveals that the majority of tannin of the species is gallic tannin. The assay shows that the fresh pod contains 32,5% and dry pod 18,9% of tannins.

**Keywords:** *Acacia nilotica*, tanins, chemical analysis.

## Introduction

Les tanins végétaux sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000. Ils sont utilisés pour préparer le cuir et donnent les réactions classiques des phénols (SWAIN et BATE-SMITH, 1962 ; BRUNETON, 1997). En outre, ils ont certaines propriétés spéciales telles que l'aptitude à la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et des autres protéines.

Selon la nature des assemblages moléculaires, les tanins sont classés en 2 groupes :

- les tanins hydrolysables, constitués par une molécule glucidique sur laquelle est estérifiée de l'acide gallique ou un de ces dérivés (acide éllagique, acide m-digallique) d'où le nom de pyrogalliques et d'éllagitanins qu'on leur donne quelquefois. Ils sont facilement hydrolysés par voie chimique ou enzymatique. Les tanins galliques et ellagiques sont caractéristiques des angiospermes dicotylédones (BRUNETON, 1997 ; MUELLER-HARVEY, 2001).

---

<sup>1</sup> CNRST/IRSAT/DSN 03 BP 7047 Ouagadougou 03 B.F. Email : asereme@yahoo.fr (Auteur correspondant)

<sup>2</sup> Laboratoire d'écologie - UFR/SVT - Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03 Burkina Faso (Afrique de l'ouest).

<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie Organique Appliquée - UFR/SEA - Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03 Burkina Faso (Afrique de l'ouest).

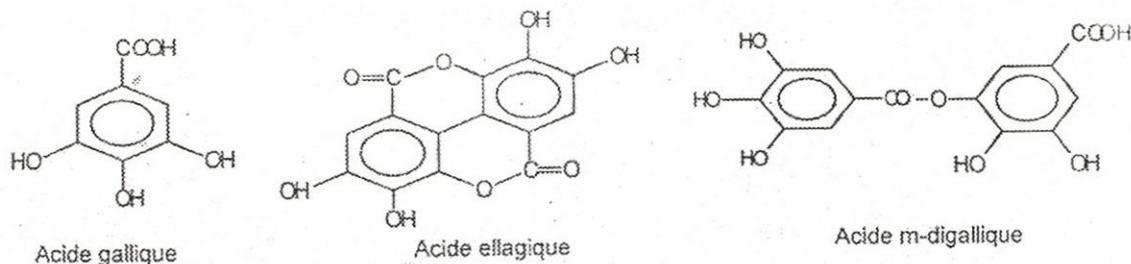


Schéma 1. Molécules de base des tanins hydrolysables.

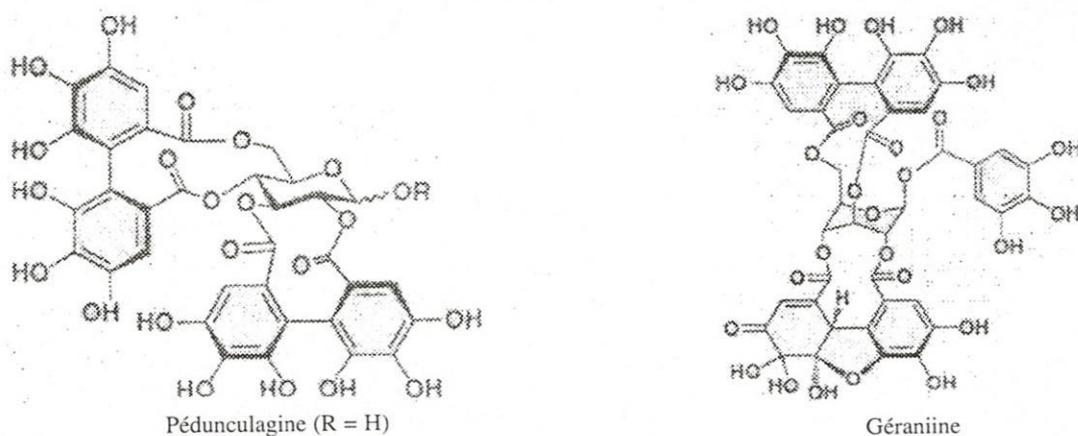


Schéma 2. Exemples de structures de tanins hydrolysables.

– les tanins condensés ou proanthocyanidols résultent de la polymérisation de molécules élémentaires de flavanes (flavane ol-3, flavane ol-4, flavane diol-3,4). Ils sont désignés aussi sous le nom de tanins « catéchiques », (GRAYER *et al.*, 1992 ; BRUNETON, 1997).

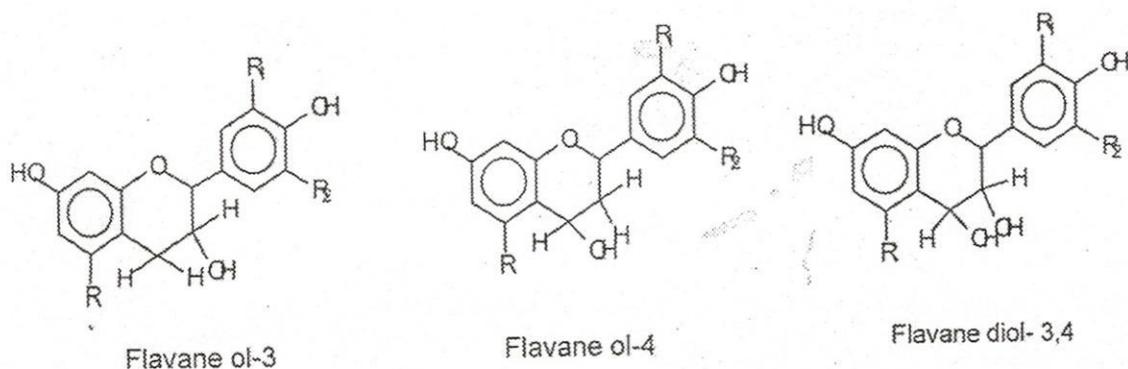
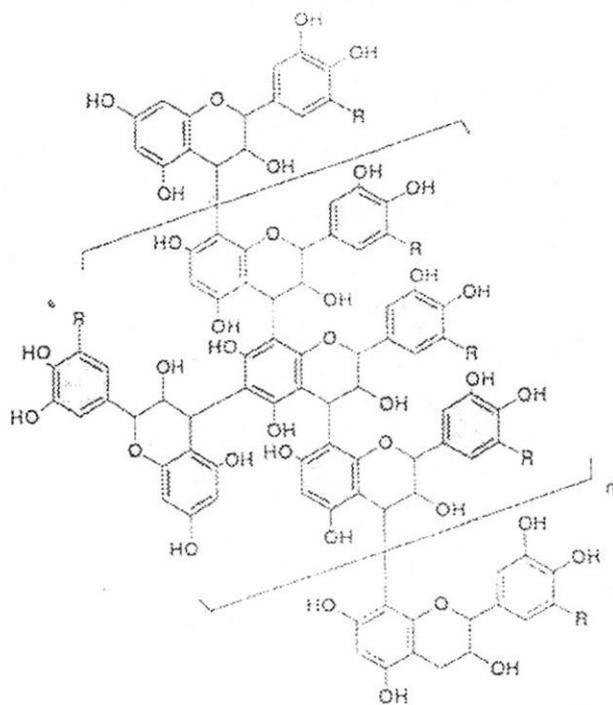


Schéma 3. Molécules de base des tanins condensés.



Polymère proanthocyanidolique

**Schéma 4.** Exemple de structure de tanin condensé.

Les plantes à tanins présentent un intérêt pour :

- l'artisanat et l'industrie de tannage où elles servent à tanner les peaux et à protéger les métaux enfouis dans le sol contre les bactéries (activités inhibitrices de l'attaque des bactéries) ;
- le laboratoire où elles sont utilisées pour préparer la résine synthétique et pour fabriquer les encres ;
- les médecines traditionnelle et moderne où les plantes à tanins entrent dans la composition de beaucoup de recettes de pharmacopée et la préparation de médicaments modernes (EROMOSELE *et al.*, 1991 ; NEUVONEN et HAUKIOJA, 1991 ; LAVERGNE *et al.*, 1989 ; KERHARO et ADAM, 1974 ; GIFFARD, 1974). Les vertus thérapeutiques des plantes tannifères seraient liées à leurs métabolites, notamment aux tanins contenus dans leurs organes (feuille, fruit, fleur, écorces), (NEUVONEN et HAUKIOJA, 1991 ; BRYANT *et al.*, 1993 ; LAVERGNE et VERA, 1989 ; Mc MILLIAN *et al.*, 1982 ; PRICE *et al.*, 1980) ; les tanins confèrent aux plantes des vertus antimicrobiennes antiparasitaires et pestifuges (BRYANT *et al.*, 1993 ; NEUVONEN et HAUKIOJA, 1991 ; LAVERGNE et VERA, 1989 ; HAHN *et al.*, 1983 ; BUTLER *et al.*, 1982 ; HASLAM, 1981 ; PRICE *et al.*, 1980 ; ROONEY *et al.*, 1982 ; LARWENCE et ABADA, 1991) ;
- l'agriculture pour la sélection des espèces ou des variétés résistantes. Les tanins empêchent aussi la pré-germination des graines (HARRIS et BURNS, 1973 ; BULLARD et ELIAS, 1980). Il faut noter que le développement de produits chimiques ces cinquante dernières années a considérablement diminué le marché des tanins végétaux.

Les tanins végétaux ont joué un rôle important dans le commerce international jusqu'à la fin du 19<sup>e</sup> siècle. Les progrès en chimie à partir de cette période ont permis de synthétiser et de produire à l'échelle industrielle des produits chimiques alternatifs, si bien que le commerce des tanins naturels a connu une chute vertigineuse. On a noté ainsi une baisse de l'intérêt des scientifiques pour les tanins végétaux. Mais avec prise de conscience croissante de la dégradation de l'environnement, de la toxicité des tanins synthétiques et de l'épuisement progressif des matières fossiles dont ils sont extraits, on observe un regain d'intérêt pour les tanins végétaux surtout par le fait qu'ils sont moins polluants et moins toxiques (PROTA, 2005). Une exploitation commerciale des tanins végétaux permettrait une revalorisation des plantes tannifères au Burkina Faso où l'artisanat et l'industrie de tannage sont prometteurs. Cela limiterait les sorties des devises pour l'achat des tanins synthétiques et constituerait une source de revenus pour les populations rurales impliquées dans l'activité ; ce qui contribuerait à réduire la pauvreté en milieu rural. D'où la nécessité d'avoir des informations scientifiques de base sur la concentration et la nature chimique des tanins des espèces tannifères locales.

## Matériel et méthodes

### Matériel d'étude

#### Matériel végétal

L'étude a porté sur les gousses de *Acacia nilotica* (Fabaceae-Mimosoideae) récoltées en janvier 2007 à Ouagadougou (Burkina Faso).

*Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Del. ; HUTCHINSON et DALZIEL (1958)

Synonymie : *Mimosa scorpioides* L., *Mimosa arabica* Lam., *Acacia arabica* Willd., *Acacia adansonii* Guill et Perot., *Acacia adstringens* (Schumach. et Thonn.) Roberty, *Acacia scorpioides* var. *adstringens* Bak.

Noms locaux : Pegnenga (Mooré) ; Bagana Yiri (Jula) ; Gaudi (Français)

#### Réactifs chimiques et solvants

Les standards utilisés pour l'analyse sont des tanins hydrolysables : acides tannique, Merck - 773 et acide gallique, Fluka Chemika - 48630. Les solvants sont de grade analytique pour HPLC. Le choix des tanins hydrolysables comme standards se justifie par le fait que ce type de tanins est caractéristique des Angiospermes Dicotylédones, (BRUNETON, 1997). Ce qui est confirmé par les travaux de BUTLER (1982) qui montrent que les monocotylédones tel que le sorgho contiennent majoritairement les tanins condensés (ou proanthocyanidols) et très peu de tanins hydrolysables.

### Méthodes d'études

#### Préparation des échantillons

Débarrasser l'échantillon de toutes les impuretés qui l'accompagnent par lavage à l'eau de robinet et rinçage à l'eau distillée avant de procéder comme suit :

- broyer finement l'organe dans un moulin à café ;
- lyophiliser le broyat jusqu'à l'obtention d'un poids constant ;
- délipider la poudre végétale ainsi obtenue au chloroforme sur Büchner dans les proportions 7 ml de chloroforme pour 1 g de poudre végétale ;
- lyophiliser à nouveau cette poudre délipidée jusqu'au départ total du chloroforme (pendant 5 heures environ);
- peser précisément 1g de poudre et l'introduire dans un flacon ;
- extraire les tanins à l'acétone 80 %. On introduit 20 ml d'acétone 80 % dans le flacon contenant la poudre lyophilisée, après agitation durant 1 heure, filtré si le résidu est encore coloré, procéder à une deuxième extraction et ainsi de suite jusqu'à obtention d'un résidu blanchâtre ;
- mettre le filtrat dans une ampoule à décanter ;
- ajouter environ 20 ml d'éther de pétrole ;
- agiter le mélange et le laisser reposer. Deux phases apparaissent: la phase inférieure acétonique contient les tanins et la phase supérieure étherée contient les autres pigments (Chlorophylle a, b ; Xanthophylle) ;
- poursuivre le lavage à l'éther de pétrole jusqu'à l'obtention d'une phase étherée incolore ;
- recueillir la phase acétonique et la conserver au réfrigérateur pour dosage ultérieur. Cette dernière opération se justifie par le fait qu'en plus des tanins, l'acétone extrait un certain nombre de composés tels que les carotènes, les xanthophylles, les chlorophylles a et b. Ces derniers influenceraient les résultats de la colorimétrie. C'est pourquoi la séparation des tanins par lavage à l'éther est adoptée (COFFE, 1979 ; CASSAGNES et KLEIBER, 1985 ; AYYAT *et al.*, 1988).

### **Purification et séparation des tanins**

La séparation des tanins est précédée par leur extraction et leur purification. Ainsi, après la préparation de l'échantillon et l'extraction des tanins comme indiqué précédemment, la procédure de purification adoptée est celle de STRUMEYER et MALIN (1975). Elle consiste pour l'essentiel à évaporer l'acétone sous vide avec l'aide d'un évaporateur rotatif à 30°C et à lyophiliser la fraction aqueuse contenant les tanins. L'échantillon sec est ensuite dissout dans une solution aqueuse de méthanol 80 % contenant 0,1% d'acide ascorbique (SMA). Le Sephadex LH-20 est ensuite également préparé avec une solution SMA. Le filtrat de la solution contenant l'échantillon est additionné au Sephadex LH-20. L'ensemble est agité pendant 5 mn environ avant d'être transvasé sur une colonne de verre. Le Sephadex LH-20 est par la suite lavé lentement avec une solution SMA par gravité sans utiliser le vide. La procédure élimine les composés autres que les tanins. Les tanins restent fixés sur le Séphadex LH-20 et lui donnent une couleur brune. Les tanins sont ensuite élués avec l'acétone diluée à 50 % contenant de l'acide ascorbique (1mg/ml). L'acétone est évaporée sous vide à 30 °C et après la solution aqueuse contenant les tanins est lyophilisée dans un ballon de poids connu.

L'échantillon contenant l'acide ascorbique est dissout dans du méthanol aqueux 80 % et additionnée au Séphadex LH-20 préparé avec une solution de méthanol aqueux 80 % (environ 300ml pour 25 g de gel). Les tanins sont adsorbés sur le gel et l'acide ascorbique est éliminé par lavage. Les tanins adsorbés sont élués avec de l'acétone aqueuse 50%. L'éluât débarrassée de l'acide ascorbique sera utilisée pour l'analyse HPLC.

## Chromatographie sur papier

La séparation des tanins hydrolysables a été faite par chromatographie sur papier à deux dimensions en utilisant le couple de solvants, acide acétique / butanol (7/93). La révélation est faite par le nitrate d'argent ammoniacal et/ou le mélange chlorure-ferricyanure de potassium. L'acide tannique et l'acide gallique sont utilisés comme produits de référence.

## Chromatographie Liquide Haute Performance

La méthode d'analyse par HPLC adoptée est celle d'INOUE et HAGERMAN (1988), (HARINDER *et al.* (1994) qui consiste à utiliser les tanins isolés et purifiés comme suit :

- hydrolyser 4 mg de la poudre de tanins obtenue avec 1,5ml d'acide sulfurique concentré ;
- filtrer et injecter ;
- identifier le pic de l'acide gallique par la comparaison des temps de rétention avec le pic de l'acide gallique standard.

## Dosage des tanins

Beaucoup de méthodes pour le dosage des tanins sont connues (MAKKAR, 1990 ; MUERLLER-HARVEY, 2001). La méthode CEE adaptée aux organes chlorophylliens (SEREME *et al.*, 1993) a été utilisée : elle consiste à utiliser le citrate d'ammonium ferrique qui forme des complexes de couleur bleu noir avec les macromolécules de tanins contenus dans la solution acétonique aqueuse. L'addition d'ammoniaque à ce mélange accentue la formation des phénates, ce qui intensifie la coloration bleu-noir ; cette dernière est mesurée à son maximum d'absorption à  $\lambda = 525$  nm au spectrophotomètre. On détermine enfin la teneur en tanins de l'échantillon en utilisant une courbe d'étalonnage établie à partir de l'acide tannique (JOURNAL OFFICIEL DE LA CEE, 1984).

## Mode opératoire

Après l'extraction des tanins, procéder comme suit :

- 1) prélever 1 ml de la phase acétonique et l'introduire dans un tube à essai noté n° 1. Ajouter successivement 6 ml d'eau distillée et 1 ml de la solution d'ammoniaque puis agiter quelques secondes à l'aide de l'agitateur à vortex.
- 2) prélever 1 ml de la phase acétonique et l'introduire dans un tube à essai noté n° 2. Ajouter successivement 5 ml d'eau distillée, 1 ml de la solution de citrate d'ammonium de fer. Agiter pendant quelques secondes à l'aide de l'agitateur à vortex puis ajouter 1 ml de la solution d'ammoniaque et agiter à nouveau pendant quelques secondes à l'aide de l'agitateur.
- 3) transvaser les solutions n° 1 et n° 2 dans les cuves de mesures (1cm) et mesurer les absorbances, au spectrophotomètre à  $\lambda = 525$  nm par rapport à l'eau, 10 min après la fin des opérations 1 et 2. Prendre comme résultats la différence des absorbances.
- 4) établir la courbe de référence comme suit :
  - préparer 6 fioles jaugées de 20 ml et introduire à l'aide d'une pipette respectivement 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 mg/ml d'acide tannique ;

- introduire à la pipette dans les tubes à essai 1 ml de chacune de ces solutions et y ajouter à la pipette successivement 5 ml d'eau, 1 ml de solution de citrate d'ammonium de fer (III). Agiter pendant quelques secondes à l'aide de l'agitateur à vortex;
- transvaser les solutions ainsi obtenues dans des cuves et mesurer après 10 min ± 1 mn les absorbances à  $\lambda = 525$  nm au spectrophotomètre par rapport à l'eau ;
- tracer la courbe d'étalonnage en portant en abscisses les concentrations correspondantes, en mg/ml.

### Expression des résultats

$$Pt = \frac{C \cdot Va}{10}$$

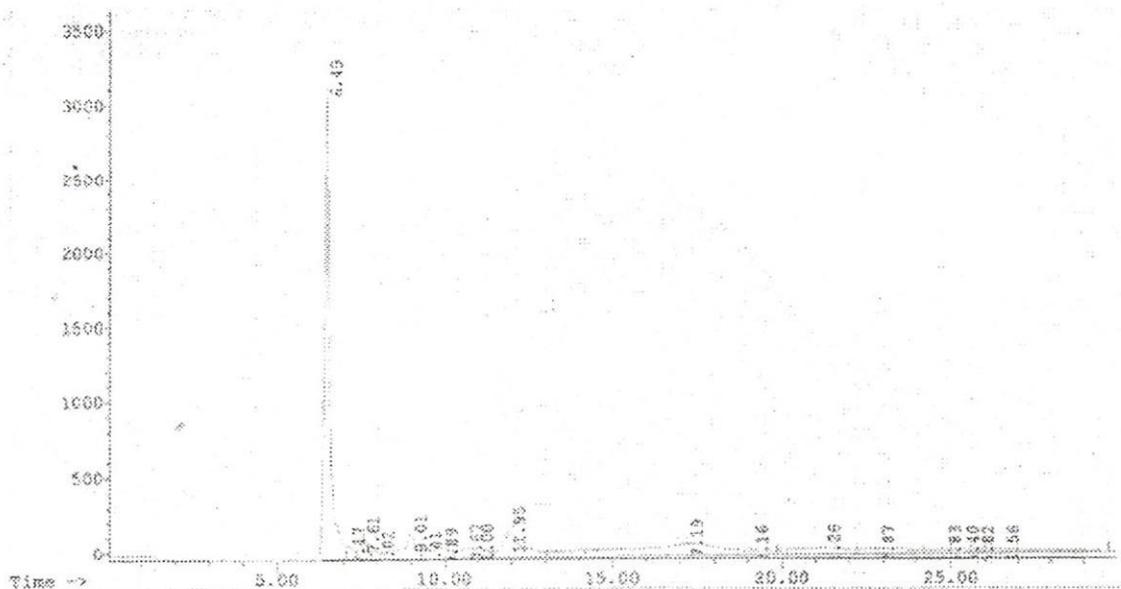
Va : volume total de la phase acétonique recueillie.

C : concentration en acide tannique (mg/ml) de la solution d'essai lue sur la courbe de référence.

Pt: pourcentage en tanins par rapport à la matière sèche.

### Résultats et discussion

Les chromatogrammes des figures 1, 2, 3 et 4 ont été obtenus à partir des tanins extraits et purifiés des gousses d'*Acacia nilotica* var *Adansonii*, de l'acide gallique et de l'acide tannique selon la technique décrite précédemment.



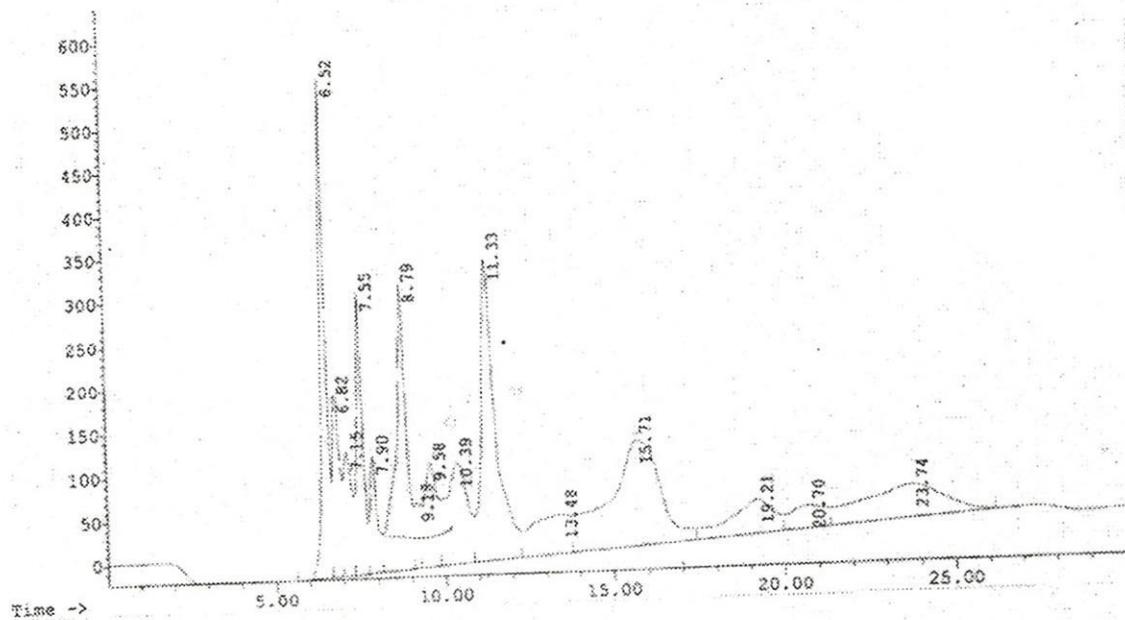


Figure 2. Chromatogramme de l'acide tannique.

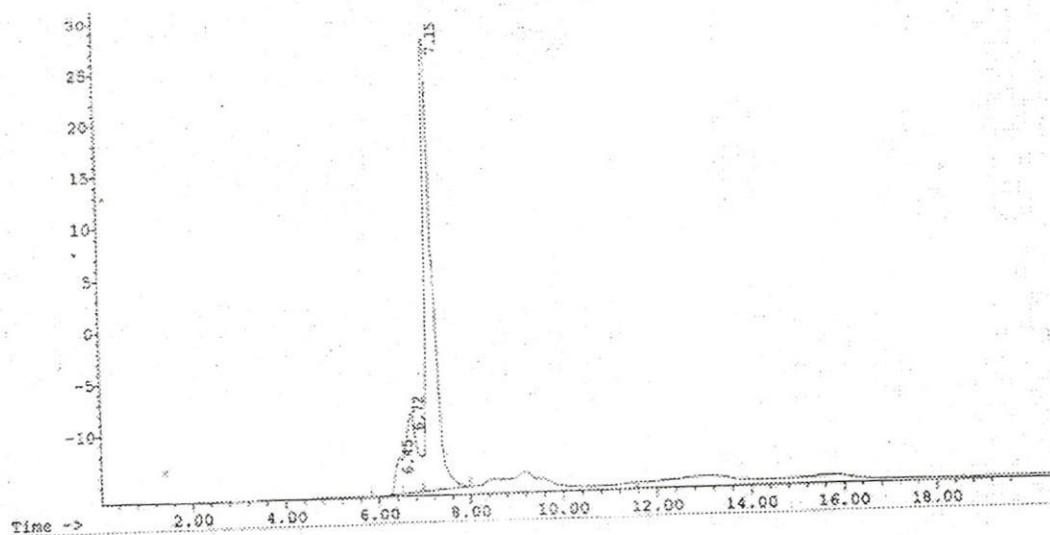


Figure 3. Chromatogramme de l'extrait hydrolysé des gousses de *Acacia nilotica*

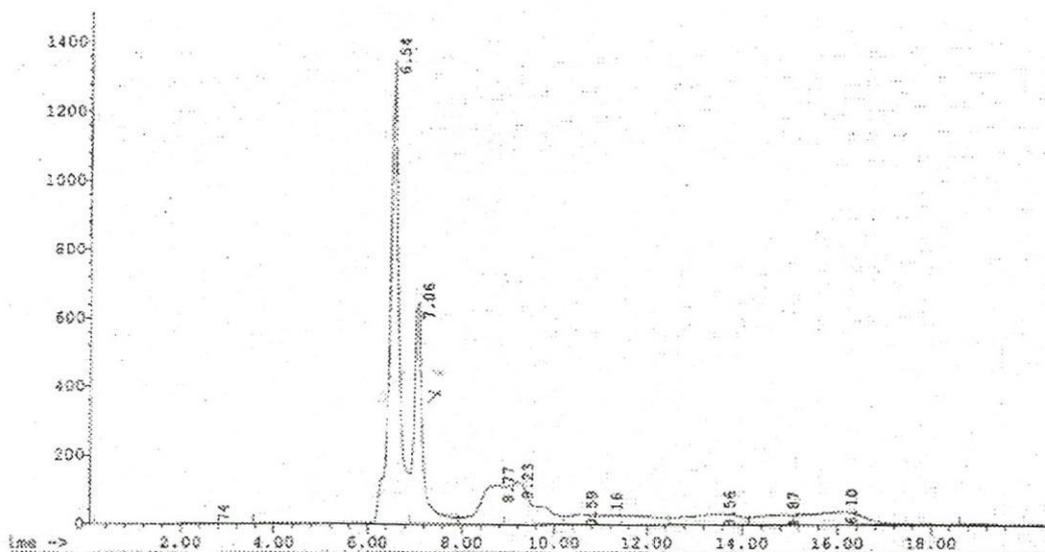


Figure 4. Chromatogramme de l'extrait hydrolysé + acide gallique.

La chromatographie sur papier à deux dimensions de l'acide tannique qui est le tanin hydrolysable le plus commercialement connu, a permis d'identifier 21 % d'acide gallique, 7 % d'acide m-digallique, 3 % de pentagalloylglucose et 1% d'acide trigallique et un produit non identifié. Le gallotanin proprement dit qui est le constituant principal de l'acide tannique représente environ 70 %. L'acide tannique analysé a été extrait des galls de *Rhus semialta* (Anacardiaceae) et de *Quercus infectoria* (Fagaceae) (RIBEREAU-GAYON, 1968 ; HAGERMAN *et al.*, 1997).

Le pic 2 (correspondant au temps de rétention 6,72) du chromatogramme (fig. 3) de l'extrait de l'échantillon hydrolysé correspondrait au pic 2 (temps 6,49) du chromatogramme (fig.1) du standard de l'acide gallique. La présence de l'acide gallique dans l'extrait de l'échantillon hydrolysé est confirmée par le chromatogramme (fig. 4) obtenu par la co-injection d'acide gallique avec l'échantillon à analyser. En effet, l'aire de l'acide gallique correspondant au pic 2 (temps 6,54) augmente significativement.

Le manque de standards n'a pas permis de procéder de même pour identifier les autres composés de l'échantillon si bien que leur identification est basée essentiellement sur la comparaison des pourcentages des composés de l'acide tannique obtenu dans la littérature.

En observant le chromatogramme de la figure 3 on note 3 pics ayant les proportions d'aires de 5,19 et 76 %. En comparant les proportions des aires de ces pics à la composition précédente de l'acide tannique obtenue de la littérature, on peut émettre les hypothèses que ces composés correspondraient aux gallotanins (76 %), à l'acide gallique (19 %) et 5 % pour les autres composés (acide m-digallique, pentagalloylglucose et acide trigallique). Toutefois une confirmation de cette hypothèse nécessitera l'utilisation des standards en co-injection avec les extraits purifiés des tanins de l'espèce.

Le dosage montre que la gousse fraîche de *Acacia nilotica* contient 32,5 % et la gousse sèche 18,9 % de tanins. Cette espèce est aussi riche en tanins que certaines espèces exotiques telles que

le Quebracho, *Schinopsis lorentzii* (bois), les Châtaigniers *Castanea sativa* et *Castanea dentata* (bois et aubier) et le Myrobolan, *Terminalia chebula* (fruits secs) dont les tanins sont utilisés dans les industries de tannage. Il en est de même de *Quercus alba* dont les tanins du bois sont commercialement exploités mais qui ne contient que 10% d'ellagitanins (vescalagin et castalagin) (ZHENTIAN *et al.*, 1999). Les gousses de *Acacia nilotica* pourraient être envisagées également pour une exploitation commerciale des tanins surtout que cela ne posera pas de problème particulier puisque n'endommageant pas la plante.

## Conclusion

Les tanins galliques sont les tanins majoritaires des gousses d'*Acacia nilotica*. Ces gousses contiendraient l'acide m-digallique, le pentagalloylglucose et l'acide trigallique.

*Acacia nilotica* a des concentrations en tanins comparables à celles d'espèces allochtones utilisées pour l'exploitation industrielle des tanins. De plus, l'analyse qualitative des tanins révèle que l'espèce a des tanins de nature chimique comparable à celle de ces espèces. *Acacia nilotica* constituerait donc une source potentielle de matière première pour la production commerciale des tanins. Une étude de marché de la mise sur pied d'une unité pilote pour une exploitation semi-industrielle serait une perspective intéressante.

## Références citées

- AYYAT M., BOLLING H., MOUSTAFA E.K. and MOHARRAM Y.G., 1988. Extraction, Determination, Fractionation of Sorghum Polyphenols – *Food Chemistry* 30, 103 – 111.
- BRUNETON J., 1997. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Impr. CEE PP 315-338.
- BRYANT J. P., REICHERDT P.B., CLAUSEN T. P. AND WERNER R. A. 1993. Effects of mineral nutrition on delayed inducible resistance in Alaska paper birch. *Ecology* 74, 2072-2084.
- BULLARD R.W. and ELIAS D. J., 1980. Sorghum polyphenolic compounds and resistance – P 43 in: polyphenols in cereals and legums. *J.H. Hulse ed IDRC-1453*, Ottawa Canada.
- BUTLER L.G., 1982. Polyphenols and their effects on Sorghum quality - *Proc. Int. Symp. Sorghum Grain Quality ICRISAT: Pantancheru, A.P. India* p. 294.
- CASSAGNES, P. et KLEIBER, D. 1985. Méthode d'analyse et de séparation des poly phénols du sorgho. E.S.A.P. (Toulouse-France).
- COFFE, M., 1979. Premiers résultats d'analyse de tanins sur plante entière - *Laboratoire de physiologie E.S.A.P.* (France), 192p.
- EROMOSELE I., EROMOSELE C. and KUZHKUZHA D., 1991. Evaluation of mineral element and ascorbic acid content in fruit of some wild plants - *Plant Foods for Human Nutrition*, 41 , 2 : 151 - 154.
- GRAYER R. J., KIMMINS F.M., PADGHAM D. E., HARBORNE B. J., RAO R.D.V., 1992. Condensed tannins levels and resistance of groundnuts (*Arachis hypogea*) against *Aphis craccivora*. *Phytochemistry*, vol. 31, N°11 pp. 3795-3800.
- GIFFARD P. L., 1974. L'ordre dans le paysage sénégalais, Sylviculture en zone tropicale sèche - *impr. Couesnon* 77810, THOMERY, 130 pages.
- HAHN D.H., ROONEY L.W. and FAUBION J.M., 1983. Sorghum phenolic acids, their HPLC separation and their relation to fungal resistance-Cereal chem 60 255-259.

- HAGERMAN A.E., ZHAO Y. And JOHNSON S., 1997.** Methods of determination of condensed and hydrolysable tannins. In: Shahidi, F. (Ed.) Antinutrients and Phytochemicals in Food, ACS Symposium Series No 662. *American Chemical Society*, pp. 209-222 Leaves of Some Trees and Shrubs and Their Properties. *J. Agric. Food Chem.* 42. 731-734.
- HARINDER P.S.M. and KLAUS B., 1994.** Isolation of Tannins from Leaves of Some Trees and Shrubs and Their Properties. *J. Agric. Food Chem.* 42. 731-734.
- HARRIS H.B., BURNS R.E., 1973.** Relationship between tannins content of sorghum and preharvest and molding. *Agron. J.*, 65, 957-9.
- HASLAM E., 1981.** Vegetable tannins. In: Conn, E.E. (Ed.) The biochemistry of plants, vol.7 Academic Press, London, PP. 527 – 555 (chapter 18).
- HUTCHINSON J. and DALZIEL J. M., 1958.** Flora of West-Tropical Africa. Ed. 2, by KEAY, R.W.J. and HEP-  
PER F.N. The Crown Agents for Overseas Governments and Administrations, London, Royaume - Unis, 2, 1: 500.
- INOUE K. H., HAGERMAN A. E., 1988.** Determination of gallotannin with rhodanine. *analytical biochemistry* 169, 363 – 369.
- JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, 1984.** Méthode de référence pour le dosage des tanins n° L 197/19 du 24 juillet.
- KERHARO J. et ADAM J.C., 1974.** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques - ed. Vigot Frères, 23 Rue de l'école de médecine 75006 Paris. Pp : 128-143.
- LARWENCE A. and ABADA S., 1991.** Feeding value of grape marc. 6. extraction, fractional distillation and quantification of condensed tannins - *Annales of Zoo-technie*, 40 : 3, 143-151.
- LAVERGNE R. et VERA R., 1989.** Etude ethnobotanique des plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle à la Réunion - Agence de la Coopération Culturelle et Technique.
- MAKKAR H., SINGH B., NEGI S., 1990.** Tannin levels and their degree of polymerization and specific activity in some agro-industrial by-products—*Biological-wastes*, 31, 2: 137 – 144. *economic Use Clarendon*, Press Oxford 2 vol. 1500 pages.
- Mc MILLIAN W.W. , WISEMAN B.R., BURNS R.E. and GLENNIE C.W., 1982.** polyhenols in sorghum grain, their change during melting and their inhibitory nature - *J. Agric. Fd. Chem.* , 30,450-6.
- MUELLER-HARVEY I., 2001.** Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 9, 3-20.
- NEUVONEN S. and HAUKIOJA E., 1991.** The effect of inducible resistance in host foliage on birch-feeding herbivores. In *Phytochemical Induction by Herbivores* eds D. W. Tallamy and M. Raupp, pp 277-291. Wiley, New York.
- PRICE M.L., HAGERMAN A.E. and BULTER L.G., 1980.** Tannin in sorghum grain: Effect of cooking on chemical assays and on nutritional properties in rats. *Nutrition Reports International*, 21, 761-6.
- PROTA 3., 2005.** Dyes and tannins. Jansen. PCM & Cardon D Editors 216 p.
- RIBEREAU-GAYON P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux - ed. Dunod, Paris (France) 231 pages.
- ROONEY L. W. and MILLER F.R., 1982.** Variation in the structure and kernel characteristics of Sorghum Page 143 in : *Proc Int. Symp Sorghum Grain Quality*. L.W.Rooney AND D.S. Murty eds. ICRISAT: Patancheru, India.
- SEREME A., KOUA-BONAFOS M. and NACRO M., 1993.** Phenolic compounds: in *Sorghum caudatum* tissues during plant development. *Biomass and Bioenergy*. 4, 1: 69-71. (Great Britain).
- STRUMEYER D.H., MALIN M.J., 1975.** Condensed tannin in grain Sorghum: isolation, fractionation and characterization . *J Agric. Food Chem.* 23, 909-914.
- SWAIN T. et BATE-SMITH E.C., 1962.** In *Comparative Biochemistry*, Vol. III A.M. Florin et H.S Mason editeurs *Academic Press*, New York.
- ZHENTIAN L., JERVIS J., HELM R. F., 1999.** C-Glycosidic ellagitannins from white oak heartwood and callus tissues. *Phytochemistry* 51, 751 – 756.