

Aspectos generales sobre los elagitaninos y su conversión a ácido elálgico

*Márquez-López, Anahí^a; Chávez-Parga, Ma. del Carmen^a
y Hernández-González, Juan Carlos^b*

^a Facultad de Ingeniería Química, UMSNH;

^b Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Morelia

Resumen

En la actualidad, gran cantidad de biomoléculas se asocian con propiedades “especiales”, algunas útiles para combatir ciertas enfermedades degenerativas. El ácido elálgico y los elagitaninos han logrado gran relevancia debido a la reducción o prevención de enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardiacas, hipertensión, disminución de colesterol, inhibición de bacterias, parásitos y virus, como el VIH y Papiloma. Esto ha propiciado su interés comercial para su consumo como complemento o incluso como medicamento, por lo que la demanda ha ido en aumento en los últimos años. La forma tradicional de obtención de ácido elálgico es a través de procesos que involucran sustancias altamente contaminantes como ácidos y álcalis y que además requieren gran cantidad de energía calorífica; esto ha propiciado la búsqueda del desarrollo de procesos biológicos que permitan obtener ácido elálgico. Las recientes investigaciones sobre estos procesos se han dirigido hacia fuentes naturales ricas en compuestos fenólicos, como son los elagitaninos, que puedan ser degradados por enzimas provenientes de especies de hongos filamentosos o de hongos levaduriformes, siendo estos últimos la alternativa más novedosa en los últimos años. Debido a esto, se presenta la siguiente revisión para

dar una perspectiva general de los últimos avances para la obtención de ácido elágico mediante fermentaciones con levaduras no-convencionales, utilizando como sustrato productos endémicos de la región. Para llegar a este punto es necesario hacer un repaso desde los fundamentos de compuestos fitoquímicos, clasificación, biosíntesis y extracción de los compuestos de interés, posteriormente se destacarán sus principales aplicaciones en el área médica, concluyendo con la revisión de las levaduras no-convencionales como posibles productoras de enzimas.

Palabras clave: ácido elágico, elagitaninos, fuentes naturales, hongos.

Abstract

At present, many biomolecules are associated with "special" properties, some useful for combating certain degenerative diseases. Ellagic acid and ellagitannins have achieved great relevance due to the reduction or prevention of diseases such as cancer, heart disease, hypertension, cholesterol reduction, inhibition of bacteria, parasites and viruses, such as HIV and Papilloma. This has led to its commercial interest, for consumption as a supplement or even as a medicine, so that demand has been increasing in recent years. The traditional way of obtaining ellagic acid is through processes that involve highly polluting substances such as acids and alkalis, and that also require a large amount of heat energy; this has led to the search for the development of biological processes that allow ellagic acid to be obtained.

Recent research on these processes has been directed towards natural sources rich in phenolic compounds, such as ellagitannins, which can be degraded by enzymes from filamentous fungi species, or yeast-like fungi, the latter being the most novel alternative in recent years, due to this, the following review is presented to give a general perspective of the latest advances in obtaining ellagic acid through fermentations with non-conventional yeasts, using as a substrate endemic products of the region. To reach this point it is necessary to review the basics of phytochemical compounds, classification, biosynthesis and extraction of the compounds of interest, later highlighting its main applications in the medical area, concluding with the review of non-conventional yeasts as possible producers of enzymes.

Key words: Ellagic acid, ellagitannis, natural sources, fungi.

Introducción

El consumo de frutas no es simplemente una consecuencia de gustos y preferencias personales, en la actualidad ayuda a solucionar problemas de salud debido al contenido de nutrientes. Además de los nutrientes esenciales, las frutas presentan compuestos como: micronutrientes, minerales, fibras, vitaminas y compuestos polifenólicos. Los compuestos polifenólicos son un grupo diverso de fitoquímicos que no se identifican como nutrientes esenciales, pero se les atribuyen efectos positivos sobre la salud de quienes los consumen habitualmente en la dieta, especialmente por su actividad como antioxidantes. Sin embargo, el mecanismo de acción de estos compuestos ha sido tema de múltiples estudios y debates, ya que poseen numerosos efectos biológicos incluyendo regulación de la expresión de genes y actividad de diversas enzimas (Beecher, 2003). El avance en las investigaciones demuestra la importancia de estos micronutrientes para la salud humana (Vasco *et al.*, 2008; Haces *et al.*, 2008). Dentro de estos compuestos se encuentra un grupo muy importante denominado taninos, que a su vez se divide en dos grupos: taninos condensados e hidrolizables (Vázquez-Flores, 2012). Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, son precursores del ácido gálico y el ácido elágico, respectivamente (Vázquez-Flores, 2012). El estudio, aplicación e interés por la obtención de los elagitaninos radica en los efectos terapéuticos que tienen en su forma hidrolizada primaria, el ácido elágico (Huang *et al.*, 2008). El ácido elágico se obtiene mediante la hidrólisis enzimática de los elagitaninos, mediante enzimas específicas como la tanasa, β -glucosidasa y elagitanasa, las cuales provienen de microorganismos como es el caso de los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, sin embargo, la utilización de hongos conlleva un aumento en la cantidad de sustrato requerido para su crecimiento, así como también demanda mayor tiempo para la fermentación, lo que repercute a su vez en los costos de energía, por lo tanto, se investiga el desarrollo de alternativas para mejorar dicho proceso, utilizando levaduras no-convencionales, como microorganismos productores de las enzimas de interés, reduciendo tiempo de fermentación y costos de mantenimiento y adaptación de los microorganismos. Aunado a esto, se realizó una serie de experimentos para obtener los elagitaninos de un grupo denominado frutillas, que se caracterizan por su coloración en tonos morados o rosáceos como son fresa (*Fragaria* sp.) y zarzamora (*Rubus* sp.), que pertenecen a la familia *Rosaceae*. La producción de frutillas en México está creciendo, particularmente en los estados de Michoacán y Jalisco. A pesar de que actualmente una proporción importante se destina a la exportación, el resto se

consume en el mercado nacional, por lo que el conocimiento sobre el contenido de los compuestos bioactivos antes descritos es importante.

Compuestos fitoquímicos

Las frutillas son fuentes conocidas de compuestos que promueven la salud. Tales compuestos comprenden vitaminas, minerales y una gama de diferentes antioxidantes polifenólicos (Beekwilder *et al.*, 2005). Los compuestos fenólicos o polifenoles, constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de sustancias en el reino vegetal. Pueden variar a partir de moléculas simples, tales como los ácidos fenólicos, a compuestos altamente polimerizados, tales como taninos. Las razones del reciente interés en compuestos fenólicos son que la mayoría de los compuestos fenólicos poseen potente capacidad antioxidante tanto *in vitro* como en vivo (Scalbert & Williamson, 2000). Fresas (*Fragaria* sp.) y zarzamoras (*Rubus* sp.) tienen altos niveles de compuestos fenólicos y vitamina C y como consecuencia son una fuente rica de antioxidantes en la dieta (De Ancos *et al.*, 2000). Los compuestos fenólicos incluyen antocianinas (Mullen *et al.*, 2002) y elagitaninos, los cuales se hidrolizan para producir el ácido elágico, éste es de particular interés desde un punto de vista dietético, además de que se ha mostrado que tienen actividad antiviral (Le Donne *et al.*, 2017), actividad antioxidante (Olivas-Aguirre *et al.*, 2014) y como protección contra los cánceres de colon (Umesalma & Sudhandiran, 2010), de pulmón y de esófago (Wang *et al.*, 2017). Las antocianinas, que son polifenoles de pigmento rojo, principalmente se encuentran en frutas y uvas de bayas y han sido implicados en la protección contra las enfermedades coronarias y ciertos tipos de cáncer (Middleton *et al.*, 2010).

Taninos

Los taninos son compuestos que no sólo poseen un elevado peso molecular, sino presentan suficientes grupos hidroxilo unidos a estructuras fenólicas que les confieren la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Reed, 2010). Se clasifican estructuralmente en dos grupos: taninos condensados y taninos hidrolizables. Los taninos hidrolizables son ésteres del ácido gálico o de su dímero el ácido elágico. Tienen en su estructura una molécula de azúcar, normalmente glucosa, a la que se unen varias moléculas de uno de los ácidos fenólicos. La misma propiedad que propicia su uso en el curtido enlazar moléculas de proteínas haciéndola más resistente al ataque microbiano,

está relacionada con su aparente función en las plantas como protector contra el ataque de herbívoros e insectos. La lesión en los tejidos libera los taninos de las vacuolas, que se unen a las proteínas impidiendo su degradación. El sabor astringente de algunos frutos es debido al elevado contenido en taninos, que se reduce durante la maduración. Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, son precursores de compuestos polifenólicos no flavonoides, como el ácido gálico o elágico, respectivamente. Otros estudios subrayan la importancia de llevar a cabo constantes investigaciones para la identificación de las estructuras de los taninos en vegetales, ya que su estructura química condiciona su actividad biológica (Gonçalves *et al.*, 2011) y su afinidad por ciertas moléculas del organismo (Cala *et al.*, 2010). Por su parte, los taninos condensados o proantocianidinas provienen de la esterificación de compuestos polifenólicos flavonoides, como las catequinas o flavan-3-oles. Estudios recientes señalan que algunas proantocianidinas presentes en semillas de uvas pueden unirse también a porciones monoméricas de taninos hidrolizables, como el ácido gálico (Finn, 2001).

Elagitaninos y ácido elágico

Los elagitaninos son taninos hidrolizables presentes en una rica variedad de plantas, en el té, el vino tinto, las frutas, bebidas y diversas plantas medicinales (Olivas-Aguirre *et al.*, 2014). Se puede encontrar en forma libre, glicosilado o formando complejos. Los elagitaninos constituyen una clase de polifenoles caracterizados por uno o más unidades de ácido hexahidroxidifénico conocido por las siglas HHDP, estas unidades se encuentran esterificadas a un azúcar, principalmente glucosa y existen diferentes posibilidades para este acoplamiento, lo cual genera una gran variabilidad estructural de los elagitaninos (Niemetz & Gross, 2005). Estos compuestos se hidrolizan fácilmente *in vitro* por la acción de ácidos y/o enzimas, liberando unidades de HHDP y glucosa (Olivas-Aguirre *et al.*, 2014), para su posterior lactonización espontánea, formando moléculas de ácido elágico (Clifford & Scalbert, 2000). La importancia de este metabolito radica en que su molécula tiene gran similitud con la de compuestos de naturaleza estrogénica presentes en mamíferos. Esto le ha valido ser ampliamente estudiado por sus propiedades como: antimutagénico, antiviral, acción contra el cáncer, antitumoral y antioxidante, además de blanqueamiento de la piel (Stoner & Gupta, 2001). El grado de madurez del fruto influye en la cantidad de elagitaninos que contiene, sin embargo, no existe relación entre el tipo de fruto y el estado de madurez, ya que la cantidad cambia según el fruto del que se trate. En los frutos maduros e inmaduros,

el mayor contenido de ácido elágico se encontró en la piel (Lee & Talcott, 2004). En fresas ocurre una disminución de ácido elágico conforme la fruta va madurando (Williner *et al.*, 2003). Los elagitaninos y el ácido elágico se consumen constantemente en frutas y en los alimentos o bebidas que se generan a partir de ellas (Clifford & Scalbert, 2000). Las frutillas de la familia de *Rosaceae* (zarzamora, frambuesa, fresa), contienen altos niveles (Kähkönen *et al.*, 2001; Kaponen *et al.*, 2007; Määttä-Riihinen *et al.*, 2004; Wada & Ou, 2002). Kähkönen *et al.*, 2001 demostró que dentro de la familia de *Rosaceae* en el género *Rubus* la zarzamora y la frambuesa, los principales fenoles encontrados fueron los elagitaninos, así como también en el género *Fragaria* con la fresa, los elagitaninos fueron el segundo grupo más grande después de las antocianinas.

El ácido elágico es una molécula muy estable que tiene un punto de fusión de 362°C (Bala *et al.*, 2006) y por su naturaleza fenólica tiende a reaccionar formando complejos con otras moléculas como proteínas, alcaloides y polisacáridos. En vista de estas propiedades del ácido elágico, se han realizado distintos trabajos de investigación sobre su producción por procesos biotecnológicos (Vattem & Shetty 2003; Huang *et al.*, 2005). Se ha encontrado que el ácido elágico posee actividad contra agentes nocivos para la salud, como los radicales libres, que son los responsables de procesos como la oxidación que promueve el envejecimiento de las células del organismo. La presencia de radicales libres también representa un riesgo en la formación de distintas formas de cáncer, el ácido elágico se ha reportado como un producto efectivo en contra de estos agentes (Martens-Talcott *et al.*, 2003). Las propiedades del ácido elágico también son aprovechadas en la industria de los alimentos, elaborando bebidas nutracéuticas y suplementos alimenticios. Sin embargo, la aplicación para la conservación de alimentos es de gran impacto para la industria de alimentos perecederos empleándolo como un agente inhibidor de microorganismos (Saucedo-Pompa *et al.*, 2009), algunas veces asociadas a la actividad antioxidante que incrementa la vida útil del alimento.

Biosíntesis de elagitaninos

Los elagitaninos son componentes típicos de muchas familias de plantas. Estos compuestos muestran una enorme variabilidad estructural que resulta de los posibles sitios múltiples para la vinculación de residuos de HHDP con el resto de glucosa (que, a su vez, puede adoptar varias conformaciones que controlan el rango de posibles disposiciones espaciales de los ligandos reactivos) y en particular por su fuerte tendencia a formar una multitud de derivados diméricos y oligoméricos que

están interconectados por enlaces C-C y C-O-C (Haslam, 1998). Esta diversidad estructural de elagitaninos, junto con su recientemente reconocido papel como agentes quimioterapéuticos prometedores (Chao *et al.*, 2009), han atraído el interés durante décadas, culminando en otros recientes medios químicos para sintetizar elagitaninos (Feldman *et al.*, 1999). Los residuos HHDP de elagitaninos pueden proceder de la deshidrogenación de grupos vecinos galoi de 1, 2, 3, 4, 6 pentagaloilglucosa (Haslam, 1998). Se pensó que dos grupos galoi en el C-4 y C-6 están interconectados por un grupo HHDP, para producir tellimagrandin II como un metabolito elagitanino primario que puede ser sometido a otras reacciones de oxidación o hidrólisis de HHDP (ácido hexahidroxi-difénico) ya que posee una fuerte tendencia a someterse a lactonización de forma espontánea para dar ácido elágico. Muchos intentos de desentrañar el mecanismo de la biosíntesis de elagitaninos se han llevado a cabo por los experimentos con oxidantes químicos (por ejemplo, O₂, Fe³⁺), o por estudios con enzimas como la lacasa y peroxidasa, usando ácido gálico, galato de metilo, β-glucogalin, 3,6-digaloilglucosa o pentagaloilglucosa como sustratos (Gross, 1983). Sin embargo, sólo detectaron ácido elágico libre, mientras que la formación de elagitaninos no se observó.

Biosíntesis de ácido elágico

El ácido elágico es un compuesto fenólico, derivado dimérico del ácido gálico, que en los frutos que lo contienen se puede encontrar en forma libre, glicosilado o como simple o complejos elagitaninos (ésteres de ácido hexahidroxi-difénico). La hidrólisis ácida de estos últimos produce ácido elágico libre la subsecuente liberación de unidades hexahidroxi-difenol (HHDP) y de un grupo éster (Olivas-Aguirre *et al.*, 2014). Diferentes microorganismos pueden degradan los elagitaninos, debido a que secretan enzimas inducidas específicamente para romper los enlaces éster de los elagitaninos, liberando de este modo glucosa y el grupo HHDP que de acuerdo con lo reportado por Aguilera-Carbó *et al* (2008), este grupo sufre una lactonización espontánea para formar el ácido elágico, un compuesto mucho más estable. El ácido elágico es producido por las plantas como un metabolito secundario, que se acumula en las vacuolas de las células de dos formas: hidrolizado o en forma de elagitanino, su precursor. Agrimoniin y sanguin H-6 son los dos tipos de elagitaninos más abundantes en la fresa (Vrhovsek *et al.*, 2012; Lipińska *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015; Selva *et al.*, 2017). Los elagitaninos son más solubles en agua que el ácido elágico (Landete, 2011). Los fenoles de las plantas, incluidos el ácido elágico y los elagitaninos, se han asociado con funciones biológicas diversas en las plantas,

como la defensa contra bacterias, hongos, virus y herbívoros animales, así como la protección contra la radiación solar, que puede beneficiar el rendimiento y el manejo integrado de plagas al aumentar la resistencia de las plantas a algunas enfermedades (Treutter, 2010; Amil-Ruiz *et al.*, 2011; Schulenburg *et al.*, 2016).

Extracción de compuestos fotoquímicos

La extracción de compuestos fotoquímicos a partir de productos frescos se lleva a cabo, principalmente, por extracción con solventes polares como es etanol, metanol, acetona, propanol y acetato de etilo, a diferentes concentraciones en agua (Antolovich *et al.*, 2000; Luthria & Mukhopadhyay, 2006), convirtiéndose en un paso fundamental previo para la cuantificación precisa de capacidad antioxidante. Aunado al método de extracción empleado, la naturaleza de los compuestos fenólicos y el método de ensayo, son los tres factores que influyen en la cuantificación de compuestos fenólicos en fuentes vegetales (Alothman *et al.*, 2009). La recuperación de los polifenoles a partir de materiales vegetales es influida por la solubilidad de los compuestos fenólicos en el disolvente utilizado para el proceso de extracción. Además, la polaridad del disolvente jugará un papel clave en el aumento de la solubilidad del compuesto fenólico (Naczki & Shahidi, 2006). Por lo tanto, es difícil desarrollar un procedimiento de extracción de fenoles adecuado para la extracción de toda la planta. Mezcla de etanol y agua se utilizan comúnmente para la extracción de fenoles a partir de fuentes vegetales (Bahorun *et al.*, 2004; Durling *et al.*, 2007). Esto es debido a la amplia gama de fenoles que las mezclas acuosas de etanol pueden disolver. Por otro lado, las mezclas de acetona-agua son buenos sistemas de disolventes para la extracción de antioxidantes polares (Sun *et al.*, 2002; Bahorun *et al.*, 2004).

Actividades biológicas del ácido elágico

Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar, inhibir o prevenir la oxidación de compuestos oxidables, atrapando radicales libres y disminuyendo el estrés oxidativo (Ani *et al.*, 2006). El mecanismo del ácido elágico, en particular, es muy complicado ya que interactúa en diversos mecanismos como: 1) oxidación por radicales libres reactivos; 2) reacciones que involucran grupos hidroxilo nucleófilos; y 3) sustitución aromática electrofílica de sus anillos aromáticos ricos en electrones (Ahmed *et al.*, 2016, Selva *et al.*, 2017). El ácido elágico también puede enlazar o

interactuar con importantes macromoléculas biológicas como el ADN, enzimas y otras proteínas, así como sustancias más pequeñas incluyendo minerales (Selva *et al.*, 2017). Se demostró que el ácido elágico se une covalentemente al ADN en estudios *in vitro* y esto se ha sugerido como un mecanismo para sus actividades antimutagénicas y anticancerígenas (Zhang *et al.*, 2014; Selva *et al.*, 2017). Del mismo modo, la interacción del ácido elágico con ciertas enzimas, como VEGFR-2 quinasa, y β -glucosidasa, puede dar efectos beneficiosos para prevenir y controlar el cáncer de mama, hiperglucemia e hipertensión (da Silva Pinto *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014; Selva *et al.*, 2017). Los estudios *in vitro* también mostraron que el ácido elágico muestra una actividad quelante efectiva de los iones ferrosos (Fe^{2+}), que contribuye a sus propiedades antioxidantes (Kilic *et al.*, 2014) y se une al suero humano albúmina, la principal proteína transportadora en el suero sanguíneo (Pattanayak *et al.*, 2017).

Actividad anti-lipoxidación o disminución de LDL

La propiedad antioxidante previene la formación de colesterolemias. Se han realizado estudios sobre esta propiedad y se evaluaron los polifenoles totales de nuez (*Juglans regia*), se demostró que el ácido elágico, en sinergismo con otros polifenoles, reduce los niveles de LDL (Anderson *et al.*, 2001), previniendo riesgos de problemas cardíacos y obstrucción de venas.

Actividad anti-mutagénica y anti-carcinogénica

La reacción coordinada entre el ácido elágico y un típico carcinogénico benzo[α]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE), prueba al ácido elágico como un agente quimioprotector contra tipos de cáncer causados por aromáticos policíclicos (PAHs) (Huetz *et al.*, 2005), inhibiendo la mutación de células sanas. El ácido elágico es conocido por su acción de modular la activación de carcinogénesis por medio de la inhibición de las enzimas de la fase 1 del citocromo P450 e induce las enzimas de la fase 2 que están involucradas en la detoxificación carcinogénica. El ácido elágico a concentraciones entre 1-100 μ m/L, mostró una fuerte actividad anti-proliferativa contra células cancerígenas de colon, pulmón y próstata (Losso *et al.*, 2004). Se han reportado investigaciones sobre la inhibición de la proliferación de células malignas de cáncer de piel (melanoma), cáncer de mama, de estómago, esófago, hígado y otros (Clifford & Scalbert 2000; Seeram *et al.*, 2005). Ahire & Mishra, en el 2017 reportaron que el consumo de ácido elágico reduce los efectos secundarios que se presentan en el cuerpo después de ser sometido a un proceso de radiación, como la reducción de células con aberraciones y fragmentación en los

cromosomas, así como las peroxidaciones lipídicas, inhibe la formación de eritrocitos policromáticos y el rompimiento de la cadena de ADN durante el proceso de radiación.

Actividad anti-microbiana

El ácido elágico ha probado ser un potente antimicrobiano, se han realizado trabajos experimentales contra patógenos como *Staphylococcus aureus* en donde no permitió la coagulación del plasma en un tiempo de incubación de 24 h a 37°C, inhibiendo el crecimiento del microorganismo (Akiyama *et al.*, 2001). En otro estudio los precursores del ácido elágico (Punicalagina), obtenidos de cáscara de granada (*Punica granatum L.*), mostraron actividad antibacterial contra 18 cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina (por sus siglas en inglés MRSA), con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 61.5 µg/mL (Machado *et al.*, 2002).

Actividad antiviral

El ácido elágico y los elagitaninos son estudiados ampliamente por su capacidad de inhibir la replicación del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH). De la planta *Phyllanthus amarus* fueron extraídos y purificados dos elagitaninos, la geranina y la corilagina, ambos capaces de bloquear la interacción de la glucoproteína 120 del VIH-1, en concentraciones inhibitorias de 2.65 a 0.48 µg/mL (extracto agua/alcohol) receptor celular primario CD4 al 50%. La inhibición fue más evidente para la enzima integrasa del VIH-1 (0.48-0.16 µg/mL), la transcriptasa reversa (8.17- 2.53 µg/mL) y proteasa (21.80-6.28 µg/mL) valores para geranina y corilagina respectivamente (Notka *et al.*, 2004). Esta investigación fue llevada a cabo con voluntarios, la administración fue oral y la potente actividad anti-VIH en sangre fue demostrado, obteniendo una reducción del 5% al 30% de la replicación del VIH. Este estudio soporta la conclusión de que los elagitaninos tienen un efecto inhibitorio sobre el VIH no sólo *in vitro* sino *in vivo*. También la concentración de ácido elágico disminuye la propagación del virus VIH en el cuerpo de personas infectadas (Ruibal *et al.*, 2003).

Actividad gastroprotectiva

La activación de células pancreáticas es el primer paso en el desarrollo de la fibrosis pancreática, el AE ha demostrado inhibir esta activación (Masamune *et al.*, 2005). El efecto gastroprotectivo de los extractos de *Quercus suber* y *Quercus coccifera* y algunos taninos, como pedunculagina, castalagina, filliraeoidina A y acutissimina B,

purificados de los extractos, fueron probados en ratones usando el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol. Ambos extractos inhibieron la formación de las úlceras, lo mismo sucede con los taninos purificados utilizados, dentro de los cuales destaca el elagitanino castalgin como el más potente (Khenouf *et al.*, 2003).

Reducción de los niveles de glucosa

Algunos precursores del ácido elágico (lagerstroemina, flosina B y reginina A) fueron aislados de una planta del sur de Asia (*Lagerstroemia speciosa*), empleada por los nativos para controlar la diabetes mellitus. Los compuestos aislados incrementaron el transporte de glucosa en adipocitos de rata pudiendo reducir los niveles de glucosa en la sangre. Sin embargo, es necesario el estudio detallado de este fenómeno debido a que no está dilucidado el mecanismo de estimulación del transporte de glucosa por estas moléculas (Hayashi *et al.*, 2002). Otra aplicación del ácido elágico es su capacidad de formar quelatos con metales (Przewloka & Shearer, 2002). Aún más, el AE en forma de elagitanino tiene gran aplicación en la industria cosmética para la elaboración de cremas, agua de tocador, perfumes, maquillaje, corrector y otros productos, los cuales tienen un efecto aclarador de la piel.

Discusión: tendencias actuales

En base al potencial preventivo y terapéutico que presenta en el ácido elágico, se comenzó a buscar alternativas para su obtención a nivel biorreactor, utilizando como fuentes de elagitaninos frutillas, como es del caso de la fresa y la zarzamora, con base en estudios en donde se ha demostrado que contienen un alto contenido de los precursores del ácido elágico, con base en esto se llevó a cabo el estudio de nuevas fuentes de enzimas para realizar la hidrólisis de las moléculas de elagitaninos, proponiendo el uso de hongos levaduriformes no-convencionales, para lo cual la investigación presenta tres vertientes: 1) conocer la cantidad de elagitaninos presentes en fresa y zarzamora; 2) determinar las cepas de levaduras productoras de enzimas tanasa, β -glucosidasa y elagitanasa, eligiendo las cepas que presenten mayor actividad, 3) cinéticas a nivel biorreactor utilizando tres cepas de levaduras no-convencionales.

Levaduras no-convencionales

Las levaduras no-convencionales son aquellas que no pertenecen al género *Saccharomyces* (González-Hernández *et al.*, 2015). En estas levaduras se han centrado las investigaciones llevadas en el grupo de investigación, ya que tienen importantes aplicaciones dentro de los procesos de fermentación. Desde la producción de etanol, hasta la obtención de metabolitos secundarios de interés médico. Estos microorganismos han ganado terreno, llegando a someterlas a distintos procesos con la finalidad de poder utilizarlas como fuentes productoras de nuevas enzimas degradativas para el caso de nuestra investigación, con la finalidad de obtener enzimas que puedan degradar los elagitaninos en medios de fermentación a nivel biorreactor.

Enzimas degradativas de elagitaninos

En la literatura se citan tres enzimas involucradas en la degradación de elagitaninos. La β -glucosidasa reportada por Vatten & Shetty (2003), para la producción de ácido elágico a partir de pomaza de arándano en cultivo en medio sólido, Mingshu *et al.* (2006), atribuyen a la enzima tanasa la degradación de elagitaninos. A su vez, Aguilera-Carbó *et al.* (2009) atribuye principalmente la degradación de los elagitaninos a la enzima elagitanino acil hidrolasa.

Elagitanino acil hidrolasa (elagitanasa)

La elagitanino acil hidrolasa o también conocida como elagitanasa es una enzima hidrolítica capaz de degradar elagitaninos en unidades de HHDP y glucosa. Esta enzima cuenta con un peso equivalente a 200 Da (Hernández-Rivera, 2008).

Aguilera-Carbó *et al.*, (2009) desarrolló la purificación y caracterización de esta enzima de *Aspergillus niger* GH1 en cultivo en medio sólido, utilizando espuma de poliuretano con extracto acuoso de cáscara de granada, aprovechando los elagitaninos presentes en el medio como inductores. De esta investigación se reportó que la expresión de la enzima fue extracelular, en un tiempo de 48 horas, con un intervalo de pH de 4 a 6, con una temperatura óptima de 60°C. Es la única caracterización reportada hasta el momento, se desconoce el sistema enzimático asociado a la hidrólisis de los polifenoles.

Tanino Acil Hidrolasa (Tanasa, TAH)

La tanasa (EC. 3.1.1.20) es una enzima hidrolítica de enlaces ésteres que actúa sobre los galotaninos, elagitaninos y taninos complejos y, dado que no actúa sobre las uniones carbono-carbono, no es posible catalizar reacciones sobre los taninos condensados (Haslam & Stangroom, 1966). A su vez la tanasa puede ser una enzima inducible o constitutiva dependiendo del organismo productor, así como de las condiciones de cultivo confiriéndole propiedades fisicoquímicas diversas. La TAH cataliza la hidrólisis del ácido tánico dando como productos nueve moléculas de ácido gálico y una de glucosa por cada molécula de sustrato. La tanasa es una glicoproteína con actividad esterasa y depsidasa. Se han encontrado tanasas con peso molecular desde 59 hasta 300 Da (Hatamoto *et al.*, 1996) dependiendo de la fuente. Se han reportado tanasas formadas por dos o más sub-unidades.

La mayoría de las tanasas caracterizadas tienen su temperatura óptima de actividad entre 30 y 40°C, pero se han reportado tanasas con temperatura óptima desde 20 hasta 70°C (Ramírez-Coronel *et al.*, 2003; Battestin & Macedo, 2007; Kasieczka-Burnecka *et al.*, 2007). Todas las tanasas estudiadas tienen su máxima actividad a valores de pH ácidos (4.3 - 6.5), y son estables a pH igualmente ácido (3.0 - 7.0), con un punto isoelectrico que va de 4.3 a 5.1 en la mayoría de los casos (Ramírez-Coronel *et al.*, 2003).

Dependiendo de la cepa y las condiciones de fermentación, la producción de la enzima tanasa se puede dar de forma constitutiva o inducida. Knudson (1913) reportó que la producción de tanasa sólo ocurre en presencia de ácido tánico, dando como productos finales de la hidrólisis, el ácido gálico y la glucosa. Posteriormente Seiji *et al.* (1973) observaron la producción de tanasa cuando el microorganismo crece solamente sobre glucosa. Por otra parte, Siegenthaler *et al.* (1997) demostraron que *Aspergillus japonicus* produce tanasa de manera constitutiva cuando crece en un medio con azúcares simples o complejos, pero que la producción de la enzima se duplicó cuando creció con ácido tánico como única fuente de carbono.

La TAH puede ser extraída de fuentes animales y vegetales, pero para su producción comercial se prefiere utilizar fuentes microbianas, ya que las enzimas producidas por microorganismos suelen ser más estables que sus análogas de origen vegetal o animal (Rodríguez-Durán *et al.*, 2010). Esta enzima ha sido determinada en microorganismos como: *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*,

Verticillium sp., *Penicillium chrysogenum* y *Paecilomyces variotii*, (Kasieczka-Burnecka *et al.*, 2007; Battestín & Macedo, 2007).

En levaduras no-convencionales se han reportado cepas de *Candida* sp. (Aoki *et al.*, 1976; Belmares *et al.*, 2004), *Pichia* sp. (Deschamps & Lebeault, 1984), *Debaryomyces hansenii*, (Deschamps & Lebeault, 1984), *Mycotorula japonica* (Belmares *et al.*, 2004).

β -glucosidasa

Las β -glucosidasas (β -D-glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los enlaces glucosídicos β (1-4) de oligosacáridos, originando como producto final monómeros de glucosa. La afinidad de esta enzima disminuye al aumentar el grado de polimerización de los oligosacáridos, siendo inactivos sobre los polímeros. Las β -glucosidasas también disponen de actividad transferasa o transglucosidasas por lo que pueden generar productos de mayor tamaño que los oligosacáridos iniciales, lo cual determina su utilización en la biosíntesis de estos (Casablanca *et al.*, 2011).

El origen de la enzima está reportado principalmente en hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae* (Riou *et al.*, 1998), *Achatina áulica*, *Periconia* sp., *Botryodiplodia theobromae* y en bacterias aerobias como *Phanerochaete chrysosporium* (Li *et al.*, 1998), *Streptomyces* sp., sin embargo, se han realizado algunos estudios para encontrar nuevas fuentes de esta enzima. Se ha demostrado que algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* poseen actividad β -glucosidasa (Hernández *et al.*, 2003). Este estudio se ha extendido hacia levaduras no-convencionales de los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* y *Pichia*, son productoras de β -glucosidasa, las cuales han sido reportadas con actividad intracelular y extracelular (Cordero-Otero *et al.*, 2003).

La enzima β -glucosidasa, forma parte del sistema de celulasas que está conformado por endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, las cuales hidrolizan sinérgicamente la celulosa cristalina. La celulosa, tiene una compleja estructura y gran cantidad de enlaces β -1-4, representando un reto para los procesos de hidrólisis, debido a que estará determinada por el área de contacto entre la enzima y la molécula, las dimensiones de los poros de las fibras, así como por la cristalinidad de la molécula (Buschle-Diller, *et al.*, 1994).

La cristalinidad de una molécula de celulosa está determinada por los enlaces de hidrógeno intermoleculares formando una estructura fibrilar terciaria de alta cristalinidad, zona en la que las endoglucanasas hidrolizan la molécula para formar zonas amorfas, obteniendo cadenas con menor grado de polimerización. La enzima exoglucanasa β -1,4, continúa la acción de la endoglucanasa sobre la misma cadena, liberando como producto el dímero de la glucosa, que es la celobiosa. Dentro de este proceso la β -1,4 glucosidasa completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos (Lynd *et al.*, 2005).

Conclusiones

Existe una ferviente necesidad de encontrar nuevos compuestos de origen natural que puedan ser utilizados para aportar nutrientes y propiedades para complementar tratamientos médicos. Esto ha suscitado el interés por productos cuyo proceso de obtención sea en base a un proceso biotecnológico, implicando el uso de microorganismos, llegando a descubrir nuevos géneros, nuevas especies, pero, además, nos ha llevado a encontrar características de estos microorganismos que resultan ser fascinantes. En base a lo antes mencionado, podemos concluir que las mejoras en el proceso de obtención de ácido elágico, así como la resolución de sus mecanismos de acción seguirán en constante actualización ya que se representa un avance en el área médica muy importante, esperando que las fuentes vegetales para su obtención sean cada vez más y que el proceso de obtención sea mejorado y que se logre una difusión de los resultados obtenidos de las investigaciones realizadas, para que cada vez más personas puedan conocer los beneficios que implica el consumo del ácido elágico.

Agradecimientos

Se agradecen los donativos parciales del proyecto de la Convocatoria Investigación del Tecnológico Nacional de México 2017-2 (No. 6268.17-P).

Referencias

- Aguilera-Carbo A., Augur C., Prado-Barragan LA, Favela-Torres E., Aguilar CN. 2008. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78: 189–199.

- Ahire V., Mishra KP. 2017. Ellagic acid as a potential anti-cancer drug. *International Journal of Radiology & Radiation Therapy*, 3: 00063.
- Ahmed T., Setzer WN, Nabavi SF, Orhan IE, Braidy N, Sobarzo-Sanchez E, Nabavi SM. 2016. Insights into effects of ellagic acid on the nervous system: a mini review. *Current Pharmaceutical Design*, 22: 1–11.
- Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48:487-491.
- Allothman M., Bhat R., Karim AA. 2009. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 115: 785–788.
- Amil-Ruiz F., Blanco-Portales R., Muñoz-Blanco J., Caballero JL. 2011. The strawberry plant defence mechanism: a molecular review. *Plant and Cell Physiology*, 52: 1873–1903.
- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Whaterhouse AL, Steinberg, FM. 2001. Walnut polyphenols inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *Journal of Nutrition*. 131: 2837-2842.
- Ani V., Varadaraj MC, Naidu KA. 2006. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cummin (*Cuminum nigrum L.*). *European Food Research and Technology*, 224: 109–115.
- Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125: 989-1009.
- Aoki K., Shinke R., Nishira H. 1976. Purification and some properties of yeast tannase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40: 79-85.
- Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., Aruoma OI. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1553–1561.
- Bala I., Bhardwaj V., Hariharan S., & Kumar MNVR. 2006. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40: 206–210.
- Battestin V., Macedo GA. 2007. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10: 191-199.
- Battestin V., Macedo GA. 2007. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10: 191-199.

- Beecher GR. 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition*, 133: 3248S–3254S.
- Beekwilder J., Jonker H., Meesters P., Hall RD, Van Der Meer I, De Vos RCH. 2005. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3313–3320.
- Belmares R., Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R., Ramírez-Coronel A., Aguilar CN. 2004. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37: 857 - 864.
- Buschle-Diller G., Zeronian SH. 1994. Enzymatic and acid hydrolysis of cotton cellulose after slack and tension mercerization. *Textile Chemist and Colorist*, 26: 17-24.
- Cala O., Pinaud N., Simon C., Fouquet E., Laguerre M., Dufourc E., Pianet I. 2010. NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *FASEB Journal*, 11:4281-4290.
- Casablanca-Alarcón E., Ríos-Manríquez N., Terrazas-Siles E., Álvarez Aliaga, MT. 2011. β -glucoside production by thermophilic bacteria indigenous to the bolivian altiplano culture. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13 (1).
- Chao PC, Hsu CC, Yin MC. 2009. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutrition & metabolism*, 6:33.
- Clifford MN, Scalbert A. 2000. Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1118–1125.
- Cordero Otero RR, Ubeda Iranzo JF, Briones-Pérez AI, Potgieter N, Villena MA, Pretorius IS, & Rensburg P. 2003. Characterization of the β -Glucosidase activity produced by enological strains of Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Journal of Food Science*, 68: 2564–2569.
- Da Silva Pinto MS, de Carvalho JE, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. 2010. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) using in vitro models. *Journal of Medicinal Food*, 13: 1027–1035.
- De Ancos B., González EM, Cano MP. 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4565–4570.

- Deschamps AM, & Lebeault JM. 1984. Production of gallic acid from tannin by bacterial strains. *Biotechnology Letters*, 6: 237–242.
- Durling N., Catchpole O., Grey J., Webby R., Mitchell K., Foo L., Perry N. 2007. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, 101: 1417–1424.
- Feldman KS, Sahahrabudhe K., Simith RS, Sheuchenzuber. 1999. Immunostimulation by plant polyphenols: A relationship between tumor necrosis factor- production and tannin structure. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 9: 985-990.
- Finn CE, Kempler C, More PP, Strik BC, Yorgey BM, Martin RR, Galletta GJ. 2001. Sweet Bliss Strawberry. *Hort Science*, 46: 1701-1705.
- Gonçalves R., Mateus N., Pianet I., Laguerre M., De Freitas V. 2011. Mechanisms of tannin-induced trypsin inhibition: a molecular approach. *Langmuir*, 21: 13122-13129.
- González-Hernández JC, Alcántar-Covarrubias MA, Cortés-Rojo C. 2015. Producción de trehalosa a partir de levaduras no-convencionales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14: 11–23.
- Gross GG. 1983. Partial purification and properties of UDP-glucose: vanillate 1-O-glucosyl transferase from oak leaves. *Phytochemistry*, 22: 2179-2182.
- Haces ML, Hernández-Fonseca K., Medina-Campos ON, Montiel T., Pedraza-Chaverri J., Massieu L. 2008. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Experimental Neurology*, 211: 85–96.
- Haslam E., Stangroom J. 1966. The esterase and depsidase activities of tannase. *Biochemistry*, 99: 28-31.
- Haslam E. 1988. Practical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action. *Cambridge: Cambridge University Press*.
- Hatamoto O., Watarai T., Kikuchi M., Mizusawa K., Sekine H. 1996. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 175: 215–221.
- Hayashi T., Maruyana H., Kasai R., Hattori K., Takasuga S., Hazeki O., Yamasaky K., Tanaka T. 2002. Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells. *Letters Plant Medicinal*, 68: 173-175.
- Hernández LF, Espinosa JC, Fernández-González M., Briones A. 2003. β -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 171-176.

- Hernández-Rivera JS. 2008. Producción, purificación y caracterización de la enzima de *Aspergillus niger* GH1 responsable de la hidrólisis del grupo HHDP de los elagitaninos. *Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.*
- Huang W., Ni J., Borthwick AGL. 2005. Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus niger* SHL 6. *Process Biochemistry*, 40: 1245-1249.
- Huang W., Niu H., Li Z., He Y., Gong W., Gong G. 2008. Optimization of ellagic acid production from ellagitannins by co-culture and correlation between its yield and activities of relevant enzymes. *Bioresource Technology*, 99: 769-775.
- Huetz P, Mavaddat N, Mavri J. 2005. Reaction between ellagic acid and an ultimate carcinogen. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45:1564-1570.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4076-4082.
- Kaponen JM, Happonen A. 2007. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1612-1619.
- Kasieczka-Burnecka M., Kuc K., Kalinowska H., Knap M., & Turkiewicz M. 2007. Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an Antarctic strain *Verticillium* sp. P9. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 77-89.
- Khennouf S., Hassiba Behabdallah, Kamel Ghar Zoudi, Smain Amira, Hideyuki Ito, Tae-Hoon Kim, Takashi, Yoshida y Akila Gharzoul. 2003. Effect of tannins from *Quercus saber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:1469-1473.
- Kilic I., Yeşiloğlu Y., Bayrak Y. 2014. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130: 447-452.
- Knudson L. 1913. Tannic acid fermentation I. *The Journal of Biological Chemistry*, 14: 159-184.
- Landete JM. 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44: 1150-1160.
- Le Donne M., Lentini M., Alibrandi A., Salimbeni V., Giuffre G., Mazzeo F., Triolo O, D'Anna R. 2017. Antiviral activity of ellagic acid and *Annona muricata* in cervical HPV related pre-neoplastic lesions: A randomized trial. *Journal of Functional Foods*, 35:549-554.

- Lee JE, Talcott TS. 2004. Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 361-366.
- Li B., Renganathan V. 1998. Gene cloning and characterization of a novel cellulose-binding β -glucosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, 64: 2748- 2754.
- Lipińska L., Klewicka E., Sójka M. 2014. The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13: 289–299.
- Losso JN, Bansode RR, Bawadi HA, Truax R. 2004. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 672-67.
- Luthria DL, Mukhopadhyay S. 2006. Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 41–47.
- Lynd L., Zyl W., McBride J., Laser M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 577–583.
- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A., Törrönen AR. 2004. Identification and quantification of phenolics compounds of *Fragaria* and *Rubus* species (Family *Rosaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry Society*, 13: 6178-6187.
- Machado TB, Leal ICR, Amaral ACF, dos Santos KRN, da Silva MG, Kuster RM. 2002. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *Journal Brazilian of Chemistry Society*, 13: 606-610.
- Martens-Talcott SU, Talcott ST, Percival SS. 2003. Low Concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human Leukemia Cells1-3. *Journal of Nutrition*, 133: 2669-2674.
- Masamune A., Satoh, Kazuhiro Kicata, Noriaki Suzuki, Kennichi Satoh, Tooru Shimosegawa. 2008. Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. *Biochemical Pharmacology*, 70: 869-878.
- Middleton E. Jr, Kandaswami C., Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology revisions*, 52 (4): 673-751.
- Mingshu L., Kai Y., Qiang H, Dongying J. 2006. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *Journal of Basic Microbiology*, 46: 68–84.
- Mullen W., McGinn J., Lean JME, Maclean RM, Gardner P., Duthie GG, Yokota T., Crozier A. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and others phenolics in red

- raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5191-5196.
- Naczki M., Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- Niemetz R., Gross GG. 2005. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*, 66: 2001-2011.
- Notka F., Meiel G., Wagner R. 2004. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Research*, 64: 93-102.
- Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A., González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez-Parilla E., de la Rosa LA, Ramos-Jiménez A. 2014. Taninos Hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición hospitalaria*. 31: 55-66.
- Pattanayak R., Basak P., Sen S., Bhattacharyya M. 2017. An insight to the binding of ellagic acid with human serum albumin using spectroscopic and isothermal calorimetry studies. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10: 88-93.
- Przewloka SR, Shearer BJ. 2002. The further chemistry of ellagic acid and water-soluble ellagitanins as metal precipitants. *Holzforschung*, 56:13-19.
- Ramírez-Coronel MA. 2003. A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity. *Microbiology*, 149: 2941-2946.
- Reed JD. 2010. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73: 1516-1528.
- Riou C., Salmon J., Vallier M., Gunata Z., Barrei P. 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3607-3614.
- Rodríguez-Durán LV, Valdivia-Urdiales B., Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R., Aguilar CN. 2010. Química y biotecnología de la Tanasa. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2:1-4.
- Ruibal BIJ, Marta Dubed EM, Martínez FL, Noa RE, Vargas GLM, Santana RJL. 2003. Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea moret*. *Revista Cubana de Farmacia*, 37: 1-8.
- Saucedo-Pompa S., Rojas-Molina R., Aguilera-Carbó AF, Saens-Galindo A., Garza de la H., Jasso-Cantú D., Aguilar CN. 2009. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*, 42: 511-515.

- Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130: 2073S–2085S.
- Schulenburg K., Feller A., Hoffmann T., Schecker JH, Martens S., Schwab W. 2016. Formation of β -glucogallin, the precursor of ellagic acid in strawberry and raspberry. *Journal of Experimental Botany*, 67: 2299–2308.
- Seeram N., Lee R. 2005. Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and purification technology*, 41: 49-55.
- Seiji D., Atsuhiko S., Toshio E., Gyoza T. 1973. Growth-associated production of tannase by a strain of *Aspergillus oryzae*. *Fermentation Engineering Magazine*, 51: 768-774.
- Selva M., Carole T., John S., Xingqian Y., Sophia Jun Xue. 2017. Ellagic acid in strawberry (*Fragaria spp.*): Biological, technological, stability, and human health aspects. *Food Quality and Safety*, 1: 227–252.
- Shi N., Qiang H, Kai Y., Huang W., Quin L. 2015. Strawberry phytochemicals inhibit azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colorectal carcinogenesis in Crj: CD-1 mice. *Nutrients*, 7: 1696–1715.
- Siegenthaler P., Neuenschwander M., Bradoo S., Gupta R., Saxena RK. 1997. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry*, 32: 135-139.
- Stoner GD, Gupta A. 2001. Ethology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 22: 1737–1746.
- Sun J., Chu Y., Wu X. & Liu RH. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7449-7454.
- Treutter D. 2010. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding visions and constraints. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 807–857.
- Umesalma S., Sudhandiran G. 2010. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-KB, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 107: 650-655.
- Vasco C., Ruales J., Kamal-Eldin A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111: 816-823.
- Vattem DA, Shetty K. 2003. Ellagic acid production and phenolic antioxidants activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpo*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*, 39:367-379.

- Vázquez-Flores A., Álvarez-Parrilla E., López-Díaz J., Wall-Medrano A. 2012. Hydrolysable and condensed tannins: chemistry, advantages and disadvantages of their intake. *Tecnociencia Chihuahua*, 5: 84-94.
- Vrhovsek U., Guella G., Gasperotti M., Pojer E., Zancato M., Mattivi F. 2012. Clarifying the identity of the main ellagitannin in the fruit of the strawberry, *Fragaria vesca* and *Fragaria ananassa* Duch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2507–2516.
- Wada L., Ou B. 2002. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3495-3500.
- Wang N., Wang Qi, Hailin Tang, Zhang F., Zheng Y., Wang S., Zhang J., Wang Z., Xie X. 2017. Direct inhibition of ACTN4 by ellagic acid limits breast cancer metastasis via regulation of β -catenin stabilization in cancer stem cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36:172.
- Williner RM, Pirovani EM, Guemes RD. 2003. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 842-845.
- Zhang HM, Zhao L., Li H., Xu H., Chen WW, Tao L. 2014. Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid. *Cancer Biology and Medicine*, 11: 92–100.