

# Mexican oaks as a potential non-timber resource for Kombucha beverages

Encinos mexicanos, un recurso no maderable con potencial para elaborar bebidas tipo Kombucha

Blanca D. Vázquez-Cabral; Martha R. Moreno-Jiménez; Nuria E. Rocha-Guzmán; José A. Gallegos-Infante; Silvia M. González-Herrera; Claudia I. Gamboa-Gómez; Rubén F. González-Laredo\*.

Instituto Tecnológico de Durango. Felipe Pescador núm. 1830 Ote., col. Nueva Vizcaya. C. P. 34080.

Durango, Dgo., México. Correo-e: gonzalezlaredo@gmail.com Tel.: +52 18 8185402 ext. 113

(\*Autor para correspondencia).

## Abstract

Oaks (*Quercus* spp.) are some of the world's most important and abundant trees in nearly all temperate forests of the northern hemisphere. There are two diversity centers for this genus: one is in Southeast Asia, and the other is in Mexico. Studies on the use of oak have mainly highlighted its timber applications. However, its non-timber value is still unappreciated. Ethnobotanical tradition shows infusions from *Quercus* leaves, alone or in combination with other plants, which have anticarcinogenic effects in gastric cancer patients. Sensorial studies on oak herbal infusions have shown that a higher phenolic content decreases their acceptability. Therefore, a significant alternative for encouraging use of herbal teas is fermentation with the Kombucha culture (black tea fungus). Kombucha drink is reported as a potential health promoter. It is a slightly acidic beverage from fermentation of sweetened black tea with Kombucha consortium, which consists mainly of acetic acid bacteria and yeasts. The phenolic composition and content gradually changes over fermentation time, producing a beverage rich in antioxidants. Metabolic conversion of polyphenols may be due to glucuronidation of original flavonoid compounds. This process enhances the bioavailability of phytochemicals, which include a wide range of bioactive ellagitannins and flavonoids, in oaks.

**Keywords:** Nutraceutical, herbal infusion, functional drinks, polyphenols, *Quercus*.

## Resumen

Los encinos (*Quercus* spp.) son algunos de los árboles más importantes y abundantes en casi todos los bosques templados del hemisferio norte. El sudeste asiático y México destacan como centros de diversidad del género. La investigación sobre el encino se ha enfocado principalmente en sus aplicaciones maderables, siendo poco reconocido su valor como recurso no maderable. La tradición etnobotánica muestra que las infusiones de hojas de encino, solas o combinadas con otras plantas, presentan efectos contra el cáncer gástrico; sin embargo, el análisis sensorial de las infusiones ha mostrado relación inversa entre su aceptabilidad y su contenido fenólico. Por lo anterior, el hongo del té (Kombucha) es una alternativa para fermentar infusiones de encino, mejorando su aceptabilidad y carácter profiláctico. La bebida Kombucha es ligeramente ácida debido a que se prepara a partir de té negro endulzado que es fermentado por el consorcio microbiano Kombucha. El consorcio se forma por bacterias ácido acéticas y levaduras que cambian gradualmente la composición fenólica del sustrato, produciendo una bebida rica en antioxidantes. La conversión metabólica de los polifenoles puede deberse a su glucuronidación, que es un proceso que libera y realza la biodisponibilidad de los fitoquímicos presentes en el encino, incluyendo elagitaninos y flavonoides bioactivos.

**Palabras clave:** Bebidas nutracéuticas, bebidas funcionales, infusión herbal, polifenoles, *Quercus*.

## Introduction

Oaks are trees that belong to the Fagaceae family and one of the world's most important genera: *Quercus*. This genus is found in nearly all temperate forests of the northern hemisphere, as well as in some tropical and subtropical regions; some species are even found in drier habitats in Southeast Asia and Northeast Africa. In the Americas, oaks are found from Canada to Colombia, including Cuba. Two centers of diversity for the genus are recognized. One is Southeast Asia with over 125 species (Valencia, 2004), while the other is Mexico, particularly in rocky regions, where oaks are an important part of the temperate forests, where they stand out amongst plant communities. Most oaks (~95 %) are distributed between 1,200 and 2,800 m above sea level throughout Mexico, except in Peninsula de Yucatan.

### Oaks as a natural resource in Mexico

The number of oak species in Mexico is not well known; some authors studying their distribution estimate around 253 species, while others calculate between only 135 and 150 species. The forest resource is important in the ecology and economy of Mexico, especially the state of Durango, where about 44 % (5,402,825 ha) of the total area is covered by temperate coniferous forests, namely pine-oak (*Pinus-Quercus*), oak-pine or oak forests (Luna-José, Montalvo-Espinoza, & Rendón-Aguilar, 2003). The oak family includes six to nine genera and about 600-900 species. In Mexico three variants of these genera have been recognized: red oak; also known as *Erythrobalanus*, *Lobatae* (white oaks or *Leucobalanus* and *Protobalanus* (intermediate oak) (Vázquez, Valencia, & Nixon, 2004). The white oaks are better distributed in mountainous areas, where they show greater ecological tolerance. The oak forests are located in protected canyons, where there are better humidity conditions. The proportion of red oaks increases towards damp places such as canyons or high slopes and edges of creeks. All oaks share a number of common biological characteristics: woody stems, leathery leaves (leathery or hard) and presence of acorns. Their growth form is like a common tree (with a height of 3-40 m) and some as shrubs (heights of 10-60 cm), but never as grass. The leaves are characterized by different types of apex (tip of the leaf), leaf base, number of ribs, margin (or edge of the leaf), texture, sizes and colors, morphological properties that are used in taxonomy for their botanical classification (González-Elizondo, López-Enríquez, González-Elizondo, & Tena-Flores, 2002).

Scientific studies that have addressed the use of oak in Mexico mainly highlight its timber use due to its significant physical, mechanical and anatomical properties. Although this use is widely acknowledged,

## Introducción

Los encinos son árboles que pertenecen a la familia Fagaceae y a uno de los géneros más importantes del mundo: *Quercus*. Este género se encuentra en casi todos los bosques templados del hemisferio norte, así como en algunas regiones tropicales y subtropicales; algunas especies se encuentran incluso en hábitats más secos en el sudeste de Asia y el noreste de África. En América, los encinos se encuentran desde Canadá hasta Colombia, incluyendo Cuba. Se conocen dos centros de diversidad del género; uno de ellos es el sudeste asiático con más de 125 especies (Valencia, 2004), y el otro es México, en particular las regiones rocosas, donde los encinos son una parte importante de los bosques templados y se destacan entre las comunidades de plantas. La mayoría de los encinos (~95 %) están distribuidos entre los 1,200 y 2,800 m de altitud a lo largo de México, excepto en la península de Yucatán.

### Los encinos como un recurso natural en México

El número de especies de encino en México no se sabe con exactitud; algunos autores que estudian su distribución estiman alrededor de 253 especies, mientras que otros calculan entre 135 y 150 especies. El recurso forestal es importante en la ecología y economía de México, especialmente en el estado de Durango, donde alrededor de 44 % (5,402,825 ha) de la superficie total está cubierta por bosques templados de coníferas: es decir, pino-encino (*Pinus-Quercus*), encino-pino o bosques de encino (Luna-José, Montalvo-Espinoza, & Rendón-Aguilar, 2003). La familia de encinos incluye de seis a nueve géneros y cerca de 600 a 900 especies. En México, tres variantes de estos géneros han sido reconocidas: *Quercus* (encino rojo, también conocido como *Erythrobalanus*), *Lobatae* (encino blanco o *Leucobalanus*) y *Protobalanus* (encino intermedio) (Vázquez, Valencia, & Nixon, 2004). Los encinos blancos están mejor distribuidos en zonas montañosas, donde muestran mayor tolerancia ecológica. Los bosques de encino se encuentran en cañones protegidos donde hay mejores condiciones de humedad. La proporción de encino rojo aumenta hacia lugares húmedos, tales como cañones o laderas altas y límites de arroyos. Todos los encinos comparten una serie de características biológicas comunes: tallos leñosos, hojas coriáceas (duras) y presencia de bellotas. La forma de crecimiento de los encinos es como un árbol común (con altura de 3 a 40 m) y algunos como arbustos (alturas de 10 a 60 cm), pero jamás como en el caso del pasto. Las hojas se caracterizan por diferentes tipos de ápice, base, número de costillas, margen, textura, tamaño y color, y propiedades morfológicas que se utilizan en la taxonomía para su clasificación botánica (González-Elizondo, López-Enríquez, González-Elizondo, & Tena-Flores, 2002).

its non-timber use has been undervalued, even though different ethnic and rural communities nationwide collect and process oak medicinal and food products as part of their culture (Luna-José et al., 2003). The study of the oaks has been given a low priority due to a lack of biological information and their complicated taxonomy. In Mexico there are many *Quercus* species that are used for non-timber purposes, highlighted by: *Q. eduardii* Trel., *Q. sideroxyla* Bonpl., *Q. durifolia* Seemen ex Loes, *Q. resinosa* Liebm, *Q. laeta* Liebm, *Q. obtusata* Boonpl. and *Q. grisea* Liebm. In Table 1 there are some oak species with reported non-timber uses.

Algunos estudios científicos que han abordado el uso del encino en México destacan principalmente el uso maderable debido a sus importantes propiedades físicas, mecánicas y anatómicas. Aunque este uso es reconocido ampliamente, el uso no maderable ha sido infravalorado, a pesar de que diferentes comunidades étnicas y rurales en todo el país, como parte de su cultura, recolectan y procesan alimentos y medicamentos de encinos (Luna-José et al., 2003). El estudio de los encinos ha recibido poca prioridad, debido a la falta de información biológica y taxonomía compleja. En México existen muchas especies de

**Table 1. Oak species with non-timber use in Mexico (Adapted from Arizaga, Martínez-Cruz, Salcedo-Cabrales, & Bello-González, 2009).**

Oak species	Common Names	Uses	Geographical Distribution
<i>Quercus resinosa</i> Liebm.	Yellow oak vermilion Oak white oak Red oak Dark oak Oak White oak	Food and livestock feed	Endemic to Mexico (Durango)
<i>Quercus grisea</i> Liebm.	Chinese oak	Medicinal and livestock feed	Present in Mexico and adjacent areas of the USA
<i>Quercus obtusata</i> Boonpl.	Charari White oak chinese oak Dark oak Oak Dark oak Red oak Tocuz Urikua	Medicinal, food and livestock feed	Endemic to Mexico (Durango)
<i>Quercus laeta</i> Liebm.	White oak Chinese oak red oak Charari Chinese Pole	Medicinal and livestock feed	Endemic to Mexico

**Cuadro 1. Especies de encino con uso no maderable en México (adaptación de Arizaga, Martínez-Cruz, Salcedo-Cabrales, & Bello-González, 2009).**

Especies de encino	Nombre común	Usos	Distribución geográfica
<i>Quercus resinosa</i> Liebm.	Encino amarillo Encino bermejo, Encino blanco, Encino colorado, Encino prieto, Roble, Roble blanco	Comida y alimentos para ganado	Endémica de México (Durango)
<i>Quercus grisea</i> Liebm.	Encino chino	Medicinal y alimento para ganado	Presente en México y áreas adyacentes de los EE.UU.
<i>Quercus obtusata</i> Boonpl.	Charari Encino blanco, Encino chino, Encino prieto, Roble, Roble prieto, Roble rojo Tocuz Urikua	Medicinal, comida y alimento para ganado	Endémica de México (Durango)
<i>Quercus laeta</i> Liebm.	Encino blanco, Encino chino, Encino colorado, Charari, Palo chino	Medicinal y alimento para ganado	Endémica de México

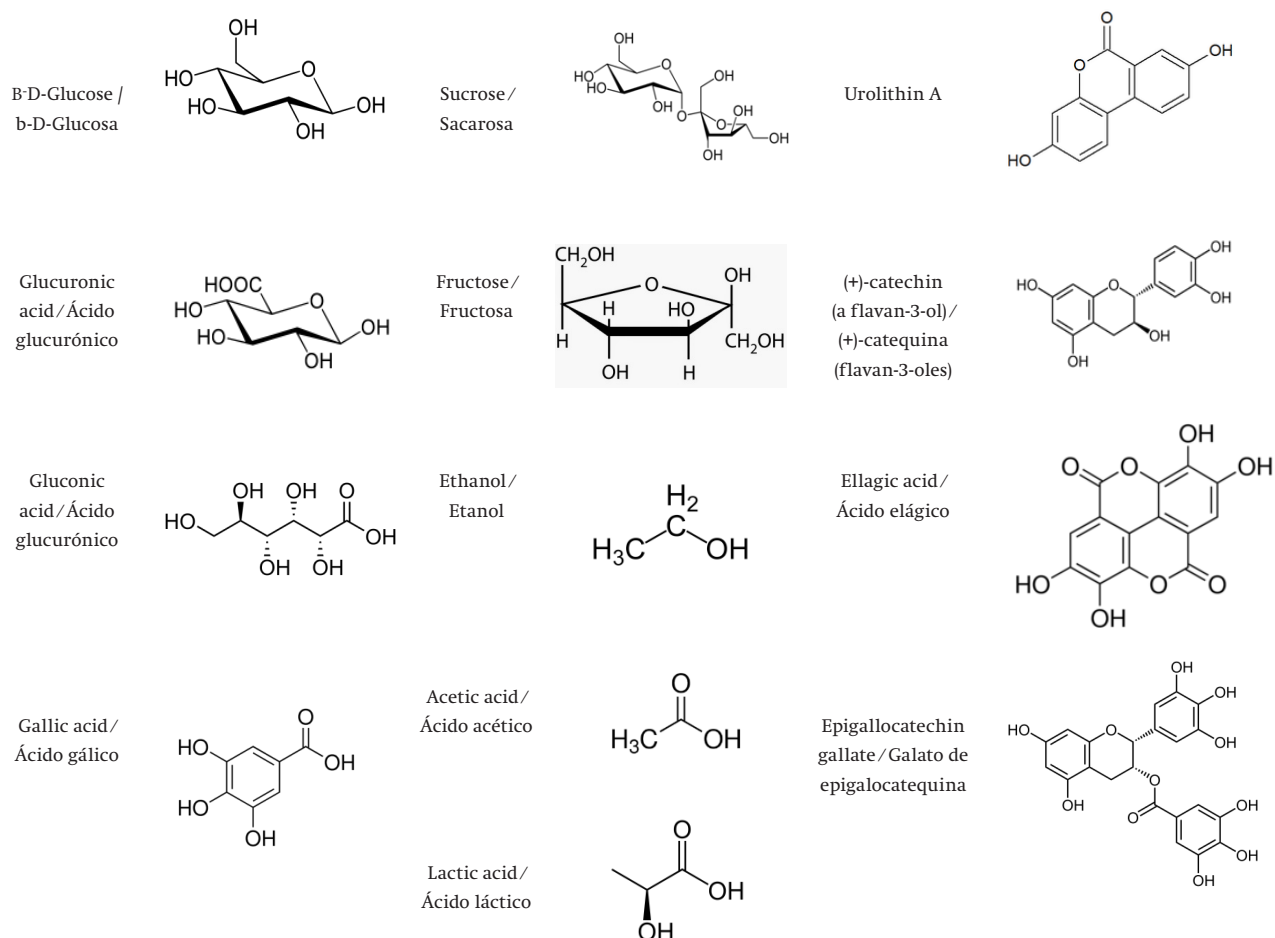
## Nutraceuticals from oak

Plants have been widely used for medicinal purposes since ancient times. Most herbs have multiple physiological effects, because they produce a diversity of specialized bioactive phytochemicals, which correspond to the particular needs of the plant secondary metabolism. They should include essential and non-essential chemicals such as vitamins and polyphenols, which may be considered as part of the human food chain, and which also provide beneficial health effects (Biesalski, 2009). In medicinal plants, active phytochemicals are always biologically balanced. This balance is based on the presence of additional substances that potentiate each other, do not accumulate in the body and show limited undesirable effects (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Quite recently, these nutraceuticals have been recommended to treat the symptoms of common diseases or nutrition deficiencies. They are usually consumed by drinking an herbal infusion, defined as the drink produced from dried plant parts submerged in hot or boiling water for a few minutes. The use of herbal teas is popular due to their aroma, antioxidant properties and therapeutic applications (Manteiga, Park, & Ali, 1997). Ethnobotanical reports mention that infusions of some species of *Quercus*, in combination with other plants like yellow flowers from *Solanum rostratum* Dunal show anticarcinogenic effects in patients with gastric cancer, when they consumed them regularly (Alonso-Castro et al., 2011). More specific investigations in relation to anti-inflammatory studies of aqueous extracts from oaks were performed by Gharzouli, Khennouf, Amira, and Gharzouli (1999). They demonstrated the cytoprotective properties of aqueous extracts from *Q. ilex* Liebm. root bark compared to aqueous extracts from *Punica granatum* Linneo and *Artemisia herba-alba* Asso. leaves against damage caused by ethanol in the stomach, having tannic acid as a positive control. It has been documented that tannic acid together with other polyphenols such as quercetin and ellagic acid can inhibit the proton pump present in the parietal cells and thereby participate in protecting the stomach against harmful agents (Gharzouli et al., 1999). In this study, high oligomeric phenolic contents were obtained in the aqueous extracts of *Q. ilex* and *P. granatum* (2.33 to 4.41 mg·mL<sup>-1</sup>), while in the *A. herba-alba* leaves only monomeric flavonoids were found (0.33 to 0.51 mg·mL<sup>-1</sup>). Studies on the chemical composition of *Quercus infectoria* G. Oliver, traditionally used to treat wounds or burns associated with bacterial infections, have reported gallotannins and ellagic acid (Figure 1) in a 60 to 70 % proportion (Shariatifar, Fathabad, Khaniki, & Nasrabadi, 2014). These compounds have been reported to have astringent, antidiabetic, local anesthetic, antibacterial, antiviral and anti-inflammatory activities, as well as acting as good

*Quercus* que se utilizan para fines no maderables, entre las que destacan: *Q. eduardii* Trel., *Q. sideroxylla* Bonpl., *Q. durifolia* Seemen ex Loes, *Q. resinosa* Liebm, *Q. laeta* Liebm, *Q. obtusata* Boonpl. y *Q. grisea* Liebm. En el Cuadro 1 se muestran algunas especies de encino con usos no maderables.

## Nutracéuticos provenientes del encino

Desde la antigüedad, las plantas se han utilizado ampliamente con fines medicinales. La mayoría de las hierbas tienen múltiples efectos fisiológicos, debido a que producen una diversidad de fitoquímicos bioactivos especializados que corresponden a las necesidades particulares del metabolismo secundario de la planta. Estos incluyen productos químicos esenciales y no esenciales, como vitaminas y polifenoles que pueden considerarse parte de la cadena alimenticia humana y que también proporcionan efectos benéficos para la salud (Biesalski, 2009). En el caso de las plantas medicinales, los fitoquímicos activos están siempre equilibrados biológicamente. Este balance se basa en la presencia de sustancias adicionales que se potencian entre sí, no se acumulan en el cuerpo y muestran efectos indeseables limitados (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Recientemente, estos nutraceuticos han sido recomendados para tratar los síntomas de enfermedades comunes o deficiencias nutricionales; por lo general, dichas sustancias son consumidas al beber una infusión de hierbas, que se define como la bebida producida a partir de partes de plantas secas sumergidas en agua caliente o hirviendo durante unos minutos. El uso de infusiones de hierbas es muy popular debido a su aroma, propiedades antioxidantes y aplicaciones terapéuticas (Manteiga, Park, & Ali, 1997). Los informes etnobotánicos mencionan que las infusiones de algunas especies de *Quercus* en combinación con otras plantas, como flores amarillas de *Solanum rostratum* Dunal, muestran efectos anticancerígenos en pacientes con cáncer gástrico, cuando las consumen regularmente (Alonso-Castro et al., 2011). Investigaciones más específicas en relación con estudios antiinflamatorios de extractos acuosos de encino se llevaron a cabo por Gharzouli, Khennouf, Amira, y Gharzouli (1999). Ellos demostraron las propiedades citoprotectoras de extractos acuosos de la corteza de raíz de *Q. ilex* Liebm. en comparación con los extractos acuosos de hojas de *Punica granatum* Linneo y *Artemisia herba-alba* Asso. contra daños causados por etanol en el estómago, teniendo el ácido tánico como control positivo. También documentaron que el ácido tánico junto con otros polifenoles, tales como quercetina y ácido elágico, pueden inhibir la bomba de protones presente en las células parietales y así participar en la protección del estómago contra agentes nocivos. En el mismo estudio, Gharzouli et al. (1999) obtuvieron contenidos de fenólicos oligoméricos



**Figure 1. Relevant chemical compounds cited in the text and their structures.**

**Figura 1. Compuestos químicos relevantes que intervienen en la producción de té Kombucha.**

protection agents against oxidative damage of lipids and proteins (Charrier, Marques, & Haluk, 1992).

In additional studies our research team elucidated the potential of oak as a sustainable source of high value-added products, as a result of their nutraceutical properties. Antioxidant and anticarcinogenic activities of phytochemicals present in oak leaf infusions, the mechanisms of cancer prevention with oak phytochemicals having therapeutic potential in *in vitro* human cell models (Rocha-Guzman et al., 2009) and in *in vivo* models using Sprague-Dawley rats, have been reported (Moreno-Jiménez et al., 2014; Rocha-Guzmán et al., 2012). We have also identified anti-topoisomerase activity in *in vitro* models using mutated yeast and antimicrobial activities against enteric pathogens (Sanchez-Burgos et al., 2013). Some alternatives have been explored for the preparation of foodstuffs containing phenolic compounds from oaks that have

altos de extractos acuosos de *Q. ilex* y *P. granatum* (2.33 a 4.41 mg·mL<sup>-1</sup>), mientras que en las hojas de *A. herba-alba* solo encontraron flavonoides monoméricos (0.33 a 0.51 mg·mL<sup>-1</sup>). Estudios sobre la composición química de *Quercus infectoria* G. Oliver, tradicionalmente utilizada para el tratamiento de heridas o quemaduras asociadas con infecciones bacterianas, han reportado galotaninos y ácido elágico (Figura 1) en una proporción de 60 a 70 % (Shariatifar, Fathabad, Khaniki, & Nasrabadi, 2014). Se ha reportado que estos compuestos tienen actividad astringente, antidiabética, anestésica local, antibacteriana, antiviral y antiinflamatoria, y que actúan como buenos agentes de protección contra el daño oxidativo de los lípidos y proteínas (Charrier, Marques, & Haluk, 1992).

En estudios adicionales hemos dilucidado el potencial de encino como fuente sostenible de productos de alto valor añadido, como resultado de sus propiedades



demonstrated a high cardioprotective potential, particularly with *Q. resinosa* species (Rivas-Arreola et al., 2010). Recently, a significant gastroprotective effect against damage induced by food chemicals and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) in human intestinal cell models was shown (Sanchez-Burgos et al., 2013). The age or maturity degree of leaves determines the content of total extractable phenolics; Makkar, Dawra, and Singh (1991) conducted studies in several *Quercus* species noting that younger leaves showed grossly two to threefold higher phenolic contents (20 to 284 mg·g<sup>-1</sup>) than mature ones (8 to 125 mg·g<sup>-1</sup>). Apparently, the polymerization degree increases with age, as well as the protein and phenolics contents; at the same time their biological activities change as leaves become mature. Thus, the degree of polymerization of polyphenols determines the antioxidant capacity and various features of the plant material that will be reflected in their biological response.

### Oak as an herbal infusion for the production of Kombucha

Our research team studied the acceptability of herbal infusions from different *Quercus* species, finding that oak leaves with higher phenolic content (3 to 13 mg·g<sup>-1</sup>) have lower acceptability (Rocha-Guzman et al., 2012). Such is the case of *Q. resinosa* herbal tea, which despite its proven healthy phenolic content, it is not totally accepted by general public. This is due to the astringency phenomenon, where polyphenols present bind the proline-rich proteins from saliva in the mouth, giving rise to an insoluble precipitate. This stimulus also affects saliva rheological properties, possibly leading to friction and reduced lubricity. Vázquez-Cabral et al. (2014) used the microbiome Kombucha (Chinese fungus tea) to ferment oak leaf infusions, increasing their sensory acceptability without detriment to their nutraceutical properties. Results from this study showed increased antioxidant capacity and sensory acceptability, by reducing the distinctive astringency flavor of this herbal tea. Kombucha is a slightly acidic beverage that is produced by fermentation of black tea and sugar through a symbiotic association of bacteria and yeast that form the “tea fungus.” The drink dates back to about 220 BC in China, where it was recognized by the Tsin dynasty for its energizing and detoxifying properties (Dufresne & Farnworth, 2000), and it has been consumed worldwide for its prophylactic and therapeutic properties. This fermentation product is known throughout the world by different names: in Russia, where it has been prepared for two centuries, it is called “Tea Kvass,” whereas in Japan it is known as “kōcha kinoko.” Traditionally, for a product to be considered Kombucha, it has to be made only from sweetened black or green tea because they possess the nitrogen source needed by microorganisms, which are

nutracéuticas. Se han reportado actividades antioxidantes y anticancerígenas de fitoquímicos presentes en infusiones de hojas de encino, y mecanismos de prevención del cáncer con fitoquímicos de encino que tienen potencial terapéutico en modelos *in vitro* de células humanas (Rocha-Guzmán et al., 2009) y modelos *in vivo* utilizando ratas Sprague-Dawley (Moreno-Jiménez et al., 2014; Rocha-Guzmán et al., 2012). También se han identificado la actividad antitopoisomerasa en modelos *in vitro* utilizando levadura mutada, y actividades antimicrobianas contra patógenos entéricos (Sánchez-Burgos et al., 2013). Algunas alternativas para la preparación de productos alimenticios que contienen compuestos fenólicos provenientes de encinos que han mostrado un alto potencial cardioprotector han sido investigadas, especialmente en especies de *Q. resinosa* (Rivas-Arreola et al., 2010). Recientemente se demostró un efecto gastroprotector importante contra el daño inducido por productos químicos en alimentos y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID por sus siglas en inglés) en modelos de células intestinales humanas (Sánchez-Burgos et al., 2013). La edad o grado de madurez de las hojas de encino determina el contenido de fenoles totales extraíbles; Makkar, Dawra, y Singh (1991) realizaron estudios en varias especies de *Quercus* y observaron que las hojas más jóvenes mostraron dos o tres veces más contenidos fenólicos (20 a 284 mg·g<sup>-1</sup>) en comparación con las hoja maduras (8 a 125 mg·g<sup>-1</sup>). Al parecer, el grado de polimerización aumenta con la edad, así como el contenido de proteína y fenólicos; al mismo tiempo, las actividades biológicas cambian a medida que se convierten en hojas maduras. Por lo tanto, el grado de polimerización de los polifenoles determina la capacidad antioxidante y diversas características de la materia vegetal que se reflejarán en su respuesta biológica.

### El encino como infusión de hierbas para la producción de té Kombucha

Se ha estudiado la aceptabilidad de infusiones de hierbas de diferentes especies de *Quercus*, encontrando que las hojas de encino con mayor contenido fenólico (3 a 13 mg·g<sup>-1</sup>) tienen menor aceptabilidad (Rocha-Guzmán et al., 2012), tal es el caso del té de hierbas de *Q. resinosa*, que a pesar de su contenido fenólico saludable comprobado, no es aceptado totalmente por toda la gente. Esto se debe al fenómeno de astringencia, donde los polifenoles presentes unen las proteínas ricas en prolina de la saliva en la boca, dando lugar a un precipitado insoluble. Este estímulo también afecta las propiedades reológicas de la saliva, dando lugar a la fricción y la reducción de la lubricidad. Vázquez-Cabral et al. (2014) utilizaron el microbioma Kombucha (té de hongo chino) para fermentar las infusiones de hojas de encino, lo que aumentó su aceptabilidad sensorial

released during tea decoction as purines and xanthine derivatives, such as caffeine, theophylline and stimulating alkaloids of the central nervous system (CNS) (Frank, 1995). The extensive research on black/green tea and their effects on health is a good reference to understand the complex mechanisms involved in the physiological activity of tea and Kombucha (Dufresne & Farnworth, 2000). Yeast cells hydrolyze sucrose to glucose and fructose, producing ethanol as a metabolite (Figure 1) (Reiss, 1994; Sievers, Lanini, Weber, Schuler-Schmid, & Teuber, 1995). Whereas acetic acid bacteria convert glucose to gluconic acid and fructose to acetic acid, there are other metabolites produced such as lactic acid, glucuronic acid and glycerol. The oxidation of tea polyphenols during fermentation leads to the formation of catechins, theaflavins, teaflavinic acid and proanthocyanidin polymers as well as the synthesis of B vitamins and folic acid (Dufresne & Farnworth, 2000). Phenolic compounds are involved in various functions, such as nutrient uptake, protein synthesis, enzyme activity, photosynthesis, formation of structural components and defense against adverse environmental factors. Diet polyphenols present a significant antioxidant/radical scavenging property and the mechanisms by which they express their beneficial effects against various common chronic diseases, such as cardiovascular disease, diabetes, and cancer are not totally clear, but appear to involve their interaction with molecular signaling pathways and related machinery that regulate cellular processes such as inflammation (Gonzalez et al., 2011).

Bacteria and fungi in Kombucha form a powerful symbiosis, which is able to inhibit the growth of potential contaminating bacteria (Balentine, Wiseman, & Bouwens, 1997; Liu, Hsu, Lee, & Liao, 1996). The main bacteria found in tea fungus are: *Acetobacter xylinum* Brown (Balentine et al., 1997), *Bacterium gluconicum* Hermann (Reiss, 1994), *Acetobacter aceti* Pasteur and *Acetobacter pasteurianus* Kozulis & Parsons (Liu et al., 1996). Common yeasts identified in tea fungus are: *Schizosaccharomyces pombe* Lindner, *Saccharomyces ludwigii* Hansen, *Kloeckera apiculata* Reess, *Saccharomyces cerevisiae* Meyer, *Zygosaccharomyces bailii* Barnett, *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath & Von Laer, *B. lambicus* Koff & Van Laer, *B. custersii* Florenz and *Candida* and *Pichia* species (Balentine et al., 1997; Liu et al., 1996; Mayser, Fromme, Leitzmann, & Gruender, 1995). Consequently, Kombucha drink has shown antimicrobial activity, as have other fermented beverages produced from other herbal infusions such as *Thymus vulgaris* L., *Lippia citriodora* Palau, *Rosmarinus officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Mill. and *Mentha piperita* L. (Battikh, Bakhrouf, & Ammar, 2012). These Kombucha analogues have shown strong antimicrobial potential, particularly against *Candida* strains, which make them promising health beverages. Interestingly, the antimicrobial potential of Kombucha drinks is not only due to the acidity or their

sin detrimento de sus propiedades nutraceuticas. Los resultados de este estudio mostraron mayor capacidad antioxidante y aceptabilidad sensorial, al reducir el sabor astringente distintivo del té de hierbas. Kombucha es una bebida ligeramente ácida que se produce por la fermentación de té negro y azúcar a través de una asociación simbiótica de bacterias y levaduras que forman el “hongo del té”. La bebida se remonta a alrededor del 220 a. C. en China, donde fue reconocida por la dinastía Tsin debido a las propiedades energizantes y desintoxicantes de la infusión (Dufresne & Farnworth, 2000), y se ha consumido por sus propiedades profilácticas y terapéuticas en todo el mundo. Este producto de fermentación es conocido por diferentes nombres: en Rusia, donde se ha preparado durante dos siglos, se le llama “Tea Kvass”, mientras que en Japón se conoce como “kōcha kinoko”. Tradicionalmente, para que un producto sea considerado Kombucha tiene que estar hecho solo de té negro o té verde endulzado, ya que poseen la fuente de nitrógeno que necesitan los microorganismos que se liberan durante la decocción de té como purinas y derivados de xantina, tales como la cafeína, la teofilina y los alcaloides estimulantes del sistema nervioso central (Frank, 1995). La amplia investigación sobre el té negro/verde y sus efectos en la salud es una buena referencia para comprender los mecanismos complejos que intervienen en la actividad fisiológica del té y la Kombucha (Dufresne & Farnworth, 2000). Las células de levadura hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa produciendo etanol como metabolito (Figura 1) (Reiss, 1994; Sievers, Lanini, Weber, Schuler-Schmid, & Teuber, 1995). Mientras que las bacterias del ácido acético convierten la glucosa en ácido glucónico y la fructosa en ácido acético, existen otros metabolitos producidos tales como el ácido láctico, ácido glucurónico y glicerol. La oxidación de los polifenoles del té durante la fermentación conduce a la formación de catequinas, teaflavinas, ácido teaflavias y polímeros de proantocianidina, así como la síntesis de vitaminas B y ácido fólico (Dufresne & Farnworth, 2000). Los compuestos fenólicos están involucrados en diversas funciones, tales como absorción de nutrientes, síntesis de proteínas, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales y defensa contra factores ambientales adversos. Los polifenoles dietéticos muestran un efecto antioxidante significativo/propiedad de eliminación de radicales; sin embargo, los mecanismos por los que expresan sus efectos benéficos contra varias enfermedades crónicas comunes, tales como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer, no están totalmente claros, pero al parecer implican la interacción con vías de señalización molecular y maquinaria relacionada que regulan los procesos celulares como la inflamación (González et al., 2011).

Las bacterias y los hongos en Kombucha forman una simbiosis poderosa que es capaz de inhibir el

organic acids (gluconic, glucuronic, lactic, and acetic acids), but also to other biologically-active metabolites (polyphenols, vitamins, aminoacids, antibiotics, micronutrients), which are biosynthesized during the fermentation process, improving the beverage nutraceutical profile.

The fermentation process involves as a first step the action of yeasts fermenting glucose and fructose to ethanol, which continues oxidation to acetic acid by the action of acetic acid bacteria. The main source of carbon in this process is sucrose. This sugar is hydrolyzed by the enzyme invertase from yeast in the Kombucha consortium, leaving fructose and glucose available. Yeasts metabolize sugar with initial preference for fructose to produce ethanol. Glucose not initially metabolized by yeast is used by bacteria in the consortium and via the action of catalase, it is converted to glucono delta lactone acid, which transforms spontaneously to gluconic acid (Figure 1). Another way of metabolizing glucose is by its oxidation to glucuronic acid. The physiological significance of this organic acid is based on its ability to be conjugated to various endogenous and exogenous substances (*i. e.*, xenobiotics), forming glucuronides, which are produced through a reaction catalyzed by the enzyme UDP-glucuronyl transferase. Small hydrophobic molecules containing oxygen, nitrogen, sulfur or carboxyl functional groups may be chemically conjugated with glucuronic acid to produce more polar and acidic glucuronides that are more water-soluble at physiological pH than the precursors, altering their own metabolism, transport or excretion properties.

Some of the positive effects attributed to Kombucha consumption, based mostly on testimonials and personal observations, are: antibiotic properties, intestinal and gastric regulation, glandular activity, relief from rheumatic ailments, gout control, hemorrhoids treatment, cholesterol level and atherosclerosis regulation, blood toxin cleansing, and as a control for diabetes, nervousness, and aging problems. However, few properties have been demonstrated by scientific and experimental studies. In 1995, the FDA (Food and Drug Administration) reported two cases of severe illness in which the consumption of Kombucha was involved. One individual died of intestinal tract perforations caused by severe acidosis, and the other person, who survived, mentioned that she had increased the fermentation time from 7 to 14 days. These cases were investigated, and it was concluded that consumption of Kombucha is not harmful at low doses of 100 mL·day<sup>-1</sup>. The FDA recommends that the fermentation period does not exceed 10 days, because the increasing acidity may lead to potentially harmful levels for consumers (Nummer, 2013).

crecimiento de bacterias contaminantes potenciales (Balentine, Wiseman, & Bouwens, 1997; Liu, Hsu, Lee, & Liao, 1996). Las principales bacterias que se encuentran en el hongo del té son: *Acetobacter xylinum* Brown (Balentine et al., 1997), *Bacterium gluconicum* Hermann (Reiss, 1994), *Acetobacter aceti* Pasteur y *Acetobacter pasteurianus* Kozulis & Parsons (Liu et al., 1996). Las levaduras comunes identificadas en el hongo del té son: *Schizosaccharomyces pombe* Lindner, *Saccharomyces ludwigii* Hansen, *Kloeckera apiculata* Reess, *Saccharomyces cerevisiae* Meyer, *Zygosaccharomyces bailii* Barnett, *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath & Von Laer, *B. lambicus* Koff & Van Laer, *B. custersii* Florenz, *Candida* y *Pichia* (Balentine et al., 1997; Liu et al., 1996; Mayser, Fromme, Leitzmann, & Gruender, 1995). En consecuencia, la bebida de Kombucha ha mostrado actividad antimicrobiana al igual que las bebidas fermentadas producidas a partir de otras infusiones de hierbas como *Thymus vulgaris* L., *Lippia citriodora* Palau, *Rosmarinus officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Mill. y *Mentha piperita* L. (Battikh, Bakhrouf, & Ammar, 2012). Estos análogos de Kombucha han mostrado gran potencial antimicrobiano, en particular contra cepas de *Candida*, que los convierte en bebidas de salud prometedoras. Curiosamente, el potencial antimicrobiano de las bebidas de Kombucha no solo se debe a la acidez o a sus ácidos orgánicos (glucónico, glucurónico, láctico, y acético), sino también a otros metabolitos biológicamente activos (polifenoles, vitaminas, aminoácidos, antibióticos y micronutrientes) que se biosintetizan durante el proceso de fermentación, mejorando el perfil nutracéutico de la bebida.

El proceso de fermentación del té Kombucha implica como primera etapa, la acción de la levadura que fermenta la glucosa y fructosa en etanol, que continúa la oxidación a ácido acético mediante la acción de las bacterias de ácido acético. La principal fuente de carbono en este proceso es la sacarosa. Esta azúcar se hidroliza mediante la enzima invertasa proveniente de la levadura en el consorcio de Kombucha, dejando disponible la fructosa y glucosa. Las levaduras metabolizan el azúcar con preferencia inicial por la fructosa para producir etanol. La glucosa no metabolizada inicialmente por la levadura se utiliza por las bacterias en el consorcio y mediante la acción de la catalasa se convierte en ácido glucono delta lactona, que se transforma espontáneamente en ácido glucónico (Figura 1). Otra forma de metabolizar la glucosa es mediante la oxidación a ácido glucurónico. La importancia fisiológica de este ácido orgánico se basa en su capacidad para conjugarse con diversas sustancias endógenas y exógenas (es decir, xenobióticos) que forman glucuronidos, los cuales se producen mediante una reacción catalizada por la enzima udp-glucuronyl transferasa. Las moléculas hidrófobas pequeñas que contienen oxígeno, nitrógeno, azufre



Jayabalan, Subathradevi, Marimuthu, Sathishkumar, and Swaminathan (2008) found that total phenolic content in black tea gradually increased (from 80 to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) over fermentation time (0 to 18 days), obtaining a high level of antioxidants with the ability to capture free radicals and reactive oxygen species. A similar case was observed by Vázquez-Cabral et al. (2014), who observed that phenolic content ( $\sim 1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) was related to fermentation time, although sensory acceptance was impaired. The latter was attributed to the reduction in sensory acceptability from the sucrose biotransformation metabolites that interfere with taste as well as the presence of flavan-3-ols such as catechin and epicatechin. It is possible that the metabolic conversion of phenolic compounds in oak infusions by the Kombucha microbiome is due to glucuronidation of flavonoid compounds. This may increase their bioavailability, being oak leaves a rich source of ellagitannins and flavonoids, which have shown important biological activities in both *in vitro* and *in vivo* assays.

### Conjugation of polyphenols and their bioavailability

Bioavailability can be understood as the integration of various processes by which a fraction of a nutrient or drug ingested is available for digestion, absorption, transport, use and disposal (Hurrell & Egli, 2010). An important aspect concerning the bioavailability of polyphenols is their chemical stability during gastric digestion and intestinal course. The total intake of polyphenols involves a complex interaction that includes the biochemistry of polyphenol glycosides, their aglycone metabolism and the transport rate of each form. Most flavonoids entering the systemic circulation in conjugated form are either sulfated or glucuronidated.

Most biological activities *in vitro* are performed using the aglycone forms of polyphenol glycosides. Particularly, most of the flavonoids, except catechins, are present in plants and foods as  $\beta$ -glycosides. It is recognized that glycosylation influences the chemical, physical and biological properties of polyphenols. Once ingested and before entering general circulation, these glycosides can undergo hydrolysis (Berrin, McLauchlan, Needs, & Williamson, 2002; Németh, Plumb, Berrin, & Juge, 2003). Flavonoids once hydrolyzed may undergo conjugation by methylation, sulfation or glucuronidation reactions, because they show high conjugation capacity at their generally very low plasma concentrations (Manach, Scalbert, Morand, & Remesy, 2004). Catechins undergo a wide biotransformation, including glucuronidation, which increases their bioavailability. Bioconversion of flavan-3-ols such as methylation or other conversion reactions may occur at the enterocytes or later in liver cells (Tapiero, Tew, Nguyen Ba, & Mathé, 2002). Within the enterocytes, the aglycones become glucuronides

o grupos funcionales de carboxilo pueden conjugarse químicamente con ácido glucurónico para producir glucurónidos más polares y ácidos que son más solubles en agua a pH fisiológico en comparación con los precursores, alterando sus propiedades de metabolismo, transporte o excreción.

Algunos de los efectos positivos atribuidos al consumo de Kombucha, basados principalmente en testimonios y observaciones personales, son: propiedades antibióticas, regulación intestinal y gástrica, actividad glandular, alivio de dolencias reumáticas, control de gota, tratamiento contra hemorroides, nivel de colesterol y regulación de aterosclerosis, limpieza de toxina en la sangre, y como control para la diabetes, nerviosismo y problemas de envejecimiento; algunas propiedades han sido probadas mediante estudios científicos y experimentales. En 1995, la *Food and Drug Administration* (FDA) reportó dos casos de enfermedad graves donde se involucró el consumo de Kombucha. Una persona murió debido a perforaciones en el tracto intestinal causadas por acidosis grave, y la otra persona que sobrevivió mencionó que había aumentado el tiempo de fermentación de 7 a 14 días. Estos casos se investigaron y se concluyó que el consumo de Kombucha no es perjudicial a bajas dosis de 100 mL·día<sup>-1</sup>. La FDA recomienda que el periodo de fermentación no exceda los 10 días, debido a que el aumento de la acidez puede conducir a niveles potencialmente dañinos para los consumidores (Nummer, 2013).

Jayabalan, Subathradevi, Marimuthu, Sathishkumar, y Swaminathan (2008) encontraron que el contenido fenólico total en el té negro aumentó gradualmente (de 80 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) con el tiempo de fermentación (0 a 18 días), obteniendo un nivel alto de antioxidantes con la capacidad de capturar radicales libres y especies reactivas de oxígeno. Un caso similar fue reportado por Vázquez-Cabral et al. (2014), quienes observaron que el contenido fenólico ( $\sim 1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) se relaciona con el tiempo de fermentación, aunque la aceptación sensorial se ve afectada. Esto último se atribuyó a la reducción de aceptabilidad sensorial de los metabolitos de biotransformación de sacarosa que interfieren con el sabor, así como la presencia de flavan-3-oles tales como la catequina y epicatequina. Es posible que la conversión metabólica de los compuestos fenólicos en infusiones de encino mediante el microbioma Kombucha se deba a la glucuronidación de compuestos flavonoides. Esto puede aumentar su biodisponibilidad, siendo las hojas del encino una rica fuente de elagitaninos y flavonoides, que han mostrado actividades biológicas importantes en pruebas *in vitro* e *in vivo*.

### Conjugación de polifenoles y su biodisponibilidad

La biodisponibilidad puede entenderse como la integración de varios procesos por los cuales una

that can pass through their basolateral membranes, travel from there to the vascular system and then to the systemic circulation; or they may also be transferred back to the luminal compartment by P-glycoprotein or multidrug resistance proteins.

Glucuronidation is one of the most common reactions used by the liver to produce polar (hydrophilic) metabolites. Glucuronidation involves the transfer of glucuronic acid components from UDP-glucuronic acid to a substrate by means of any UDP-glucuronosyltransferase. It is known that UDP-glucuronic acid is an intermediate in the process and is formed in the liver. The resulting substances from glucuronidation are identified as glucuronides and are more soluble in water. Therefore, this system is used by the human body to allow subsequent removal through urine or feces. Hormones may also be glucuronidated to allow easier transportation throughout the body. The conjugation of xenobiotic molecules with hydrophilic molecular species such as glucuronic acid is known as Phase II Metabolism.

*In vitro* experiments using flavonoid aglycones or glycosylated conjugates (Lolito, Zhang, Yang, Crozier, & Grei, 2011) have demonstrated that quercetin glucuronidation or quercetin sulfation affects their inhibitory outcome on the expression of adhesion molecules, whereas methylation retains its anti-inflammatory activity. The highly documented unconjugated epigallocatechin gallate (EGCG) is the most abundant form detected in plasma, with a ratio ranging from 77 to 90 % of intake. On the other hand, other catechins appear highly conjugated with glucuronic acid and/or sulfate groups (Rahman, Biswas, & Kirkham, 2006).

Glycosylation influences the chemical, physical and biological properties of polyphenols. Sugar removal from glycosylated flavonoids by the action of glycosidases and consequent hydrophilic action induces passive diffusion of the aglycone through intestinal microvilli. Dietary polyphenols are substrates of beta-glucosidases, UDP-glucuronosyltransferases or catechol-O-methyl transferases in the small intestine, and also of various phase I and II enzymes in the liver (Rechner et al., 2002). As for the bioconversion of flavan-3-ols and flavonols, two important flavonoid subclasses associated with human health, conjugation reactions (methylation, sulfation and glucuronidation) can occur both in enterocytes and in hepatic cells. Flavanols such as (-)-epicatechin are often acylated especially by gallic acid. The resulting galloyl substitutions apparently do not affect the partition coefficients of compounds and their bioavailability as dramatically as glycosidation does (Tapiero et al., 2002). The flavan-3-ols apparently pass through biological

fracción de un nutriente o medicamento ingerido está disponible para la digestión, absorción, transporte, uso y eliminación (Hurrell & Egli, 2010). Un aspecto importante en relación con la biodisponibilidad de los polifenoles es su estabilidad química durante la digestión gástrica y curso intestinal. El consumo total de polifenoles implica una interacción compleja que incluye la bioquímica de glucósidos de polifenol, su metabolismo de aglicón y la tasa de transporte de cada forma. La mayoría de los flavonoides que entran en la circulación sistémica en forma conjugada son sulfatados o glucuronizados.

La mayoría de las actividades biológicas *in vitro* se realizan utilizando las formas de aglicona de los glicósidos de polifenol. En particular, la mayoría de los flavonoides, excepto las catequinas, están presentes en plantas y alimentos como B-glucósidos. Se reconoce que la glicosilación influye en las propiedades químicas, físicas y biológicas de los polifenoles. Una vez ingeridos, y antes de entrar en la circulación general, estos glucósidos pueden sufrir hidrólisis (Berrin, McLauchlan, Needs, & Williamson, 2002; Németh, Plumb, Berrin, & Juge, 2003). Después que los flavonoides se hidrolizan pueden someterse a la conjugación mediante reacciones de metilación, sulfatación o glucuronidación, ya que muestran en general una capacidad alta de conjugación en sus concentraciones plasmáticas muy bajas (Manach, Scalbert, Morand, & Remesy, 2004). Las catequinas se someten a una biotransformación amplia, incluyendo glucuronidación, lo que aumenta su biodisponibilidad. La bioconversión de flavan-3-oles como la metilación u otras reacciones de conversión puede ocurrir en los enterocitos o más tarde en las células hepáticas (Tapiero, Tew, Nguyen Ba, & Mathé, 2002). Dentro de los enterocitos, las agliconas se convierten en glucurónidos que pueden pasar a través de sus membranas basolaterales, viajando hasta el sistema vascular y posteriormente a la circulación sistémica; también pueden ser transferidos de regreso al compartimiento luminal por P-glicoproteína o proteínas resistentes a múltiples fármacos.

La glucuronidación es una de las reacciones más comunes utilizadas por el hígado para producir metabolitos polares (hidrófilos). La glucuronidación implica la transferencia de componentes de ácido glucurónico a partir de ácido udp-glucurónico a un sustrato mediante cualquier udp-glucuronosil transferasa. Se sabe que el ácido udp-glucurónico es un intermediario en el proceso y se forma en el hígado. Las sustancias resultantes de la glucuronidación se identifican como glucurónidos y son más solubles en agua. Por lo tanto, este sistema se utiliza por el cuerpo humano para permitir la eliminación posterior a través de la orina o heces. Las hormonas también pueden someterse a glucuronidación para permitir

membranes and are absorbed without deconjugation or hydrolysis. Thus, when consuming (+)-catechin, at 2 g doses, its plasma fraction varies from 0.2 to 2 % of the total consumed, detecting it still after 30 min as unconjugated catechin and after 120 min as methylated catechin. After 8 h, 40 % of the catechin was detected in urine as methylated, sulfated and glucuronidated derivatives. The flavan-3-ols do not alter the levels of endogenous antioxidants and bioconversion products in the presence of phenolic acids such as vanillic, 4-hydroxybenzoic, 3,4-dihydroxybenzoic, and 3-methoxy-4-hydroxyhippuric (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011).

Other model compounds like ellagic acid and ellagitannins have shown antitumor activity in *in vitro* and *in vivo* assays. They have been proposed as pro-phytoestrogens because the bioavailability of metabolites derived from ellagitannins of the colonic microflora, known as urolithins (hydroxydibenzopyran-6-one derivatives), have shown anti-estrogen activity in *in vitro* models (Larrosa, González-Sarrías, García-Conesa, Tomás-Barberán, & Espín, 2006). Azorín-Ortuño et al. (2008) evaluated *in vivo* the safety of an oak-flavored milk powder, but it was not possible to detect ellagitannins and derived metabolites in liver, kidney and uterus of rats due to the low amount of administered ellagitannins (0.094 mg·day<sup>-1</sup>). Nevertheless, it was possible to identify urolithin A glucuronide in urine and urolithin A in feces, confirming that their production as metabolites derived from the microflora is independent of the structure or concentration of the ellagitannins. Espín et al. (2007) evaluated the bioavailability and metabolism of ellagitannins in Iberian pigs, and their distribution in different tissues in order to provide information on bioavailability in humans. They showed that ellagitannins release ellagic acid under physiological conditions *in vivo*, which is gradually metabolized in the intestine to produce urolithin D and C, ending with urolithin A and B. When the metabolites are absorbed, the first glucuronidation may occur in the intestinal cells, finding their way to the aorta; once in the liver, they are metabolized to yield glucuronides and sulfates, which may be secreted in bile. The presence of ellagic acid in bile and urine, and its absence in intestinal tissues, suggested that it may be absorbed in the first part of the gastrointestinal tract.

Using other analogue herbs such as rosemary (*R. officinalis*) has aroused great scientific interest, due to its major diterpene constituents: carnosic acid and carnosol. They confer biological significance to the plant, including anti-inflammatory, antiobesogenic, antiangiogenic and anticancer activities. Romo-Vaquero et al. (2013) conducted a study on the metabolic profile of intestinal lumen, liver, plasma and brain in female Zucker rats treated with an

la transportación más fácil por todo el cuerpo. La conjugación de las moléculas xenobióticas con especies moleculares de hidrófilos tal como el ácido glucurónico se conoce como Metabolismo Fase II.

Los experimentos *in vitro* que utilizan agliconas flavonoides o conjugados glicosilados (Lolito, Zhang, Yang, Crozier, & Grei, 2011) han demostrado que la glucuronidación quercetina o sulfatación quercetina afectan su resultado inhibitorio sobre la expresión de moléculas de adhesión, mientras que la metilación conserva su actividad antiinflamatoria. El galato de epigallocatequina no conjugado altamente documentado (EGCG) es la forma más abundante detectada en el plasma, con una relación que va desde 77 a 90 % de la ingesta. Por otro lado, otras catequinas parecen altamente conjugadas con grupos de ácido glucurónico y/o sulfato (Rahman, Biswas, & Kirkham, 2006).

La glicosilación afecta las propiedades químicas, físicas y biológicas de los polifenoles. La extracción de azúcar proveniente de flavonoides glicosilados, mediante la acción de glicosidasas y por consiguiente la acción hidrófila, induce una difusión pasiva de la aglicona a través de las microvellosidades intestinales. Los polifenoles dietéticos son sustratos de  $\beta$ glucosidasas, udp-glucuronosil transferasa o catecol-O-metilo transferasa en el intestino delgado, y también de diversas enzimas fase I y II en el hígado (Rechner et al., 2002). En cuanto a la bioconversión de flavan-3-oles y flavonoles, dos importantes subclases de flavonoides asociados con la salud humana, pueden ocurrir reacciones de conjugación (metilación, sulfatación y glucuronidación) tanto en los enterocitos como en las células hepáticas. Los flavanoles, tales como (-)-epicatequina están a menudo acilados, especialmente por el ácido gálico. Las sustituciones galoilas resultantes no afectan aparentemente los coeficientes de partición de compuestos y su biodisponibilidad tan dramáticamente como lo hace la glicosidación (Tapiero et al., 2002). Los flavan-3-oles aparentemente pasan a través de membranas biológicas y son absorbidos sin desconjugación o hidrólisis. Por lo tanto, cuando se consume (+)-catequina, a dosis de 2 g, su fracción de plasma varía de 0.2 a 2 % del total consumido, detectándolo después de 30 min como catequina sin conjugación y después de 120 min como catequina metilada. Después de 8 h, 40 % de la catequina se detecta en la orina como derivado metilado, sulfatado y glucuronizado. Los flavan-3-oles no alteran los niveles de antioxidantes endógenos y productos de bioconversión en presencia de ácidos fenólicos tales como vanílico, 4-hidroxibenzoico, 3,4-dihidroxibenzoico, y 3-metoxi-4-hidroxihipurico (Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011).

Otros compuestos modelo como el ácido elágico y los elagitaninos han mostrado actividad antitumoral



oral extract, noting that conjugation of carnosic acid and carnosol is mainly due to glucuronidation. The presence of carnosic acid glucuronide in liver and plasma was confirmed, although the incidence of methylated carnosic acid was more abundant in plasma than in intestine and liver.

## Conclusions

Non-timber resources such as oak leaves are waiting for sustainable use to the benefit of human health. However, it is still necessary to clarify the bioconversion of polyphenols in fermentation systems using the Kombucha fungus, particularly in oak infusions, which would provide valuable information on the mechanisms of substrate consumption. In this way, an open panorama can be displayed to a wide source of forest herbal materials to be used as analogues of Kombucha such as oak leaf infusions with presumed high bioavailability and bioactivity.

### End of English version

## References / Referencias

- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gómez-Sánchez, M., Domínguez, F., & García-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 945–972. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.055
- Arizaga, S., Martínez-Cruz, J., Salcedo-Cabrales, M., & Bello-González, M. A. (2009). *Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos*. México: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Azorín-Ortuño, M., Urbán, C., Cerón, J. J., Tecles, F., Gil-Izquierdo, A., Pallarés, F. J., ... Espín, J. C. (2008). Safety evaluation of an oak-flavored milk powder containing ellagitannins upon oral administration in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2857–2865. doi: 10.1021/jf8000857
- Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 37, 693–704. doi: 10.1080/10408399709527797
- Battikh, H., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT-Food Science and Technology*, 47(1), 71–77. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.033
- Berrin, J. G., McLauchlan, W. R., Needs, P., & Williamson, G. (2002). Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in *Pichia pastoris*. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. *European Journal of Biochemistry*, 269, 249–258. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02641.x
- en pruebas *in vitro* e *in vivo*. Tales compuestos se han propuesto como profitoestrógenos debido a que la biodisponibilidad de los metabolitos derivados de elagitaninos de la microflora del colon, conocidos como urolitinas (derivados de hidróxido benzopirano-6-ona), han mostrado actividad antiestrógena en modelos *in vitro* (Larrosa, González-Sarriás, García-Conesa, Tomás-Barberán, & Espín, 2006). Azorín-Ortuño et al. (2008) evaluaron *in vivo* la seguridad de un encino con sabor a leche en polvo, pero no fue posible detectar elagitaninos y metabolitos derivados en el hígado, riñón y útero de ratas, debido a la baja cantidad de elagitaninos administrados (0.094 mg·día<sup>-1</sup>). Sin embargo, fue posible identificar urolithin A glucurónido en la orina y urolithin A en las heces, confirmando que la producción como metabolitos derivados de la microflora es independiente de la estructura o concentración de los elagitaninos. Espín et al. (2007) evaluaron la biodisponibilidad y metabolismo de elagitaninos de cerdo ibérico y la distribución en diferentes tejidos con el fin de proporcionar información sobre la biodisponibilidad en humanos. Los autores mostraron que los elagitaninos liberan ácido eláxico en condiciones fisiológicas *in vivo*, que se metaboliza gradualmente en el intestino para producir urolithin D y C, finalizando con urolithin A y B. Cuando se absorben los metabolitos, la primera glucuronidación puede ocurrir en las células intestinales, encontrando su camino a la aorta; una vez que los compuestos están en el hígado, se metabolizan para producir glucurónidos y sulfatos que pueden secretarse en la bilis. La presencia de ácido eláxico en la bilis y la orina, y la ausencia en tejidos intestinales, sugiere que dicho ácido se puede absorber en la primera parte del tracto gastrointestinal.
- El uso de otras hierbas analógicas como el romero (*R. officinalis*) ha despertado gran interés científico, debido a sus principales componentes diterpénicos: ácido carnósico y carnosol, que confieren significado biológico de la planta, incluyendo actividades antiinflamatorias, antiobesogénicas, antiangiogénicas y anticancerígenas. Romo-Vaquero et al. (2013) llevaron a cabo un estudio sobre el perfil metabólico del lumen intestinal, hígado, plasma y cerebro en ratas hembras Zucker tratadas con extracto oral de romero, señalando que la conjugación de ácido carnósico y carnosol se debe principalmente a la glucuronidación. La presencia del glucurónido de ácido carnósico en el hígado y el plasma se confirmó, aunque la incidencia de ácido carnósico metilado fue más abundante en el plasma que en el intestino y el hígado.

## Conclusiones

Se espera que los recursos no maderables, tales como las hojas de encino, sean de uso sostenible para beneficio de la salud humana. Sin embargo, todavía es necesario aclarar la bioconversión de polifenoles



- Biesalski, H. K. (2009). Vitamin E requirements in parenteral nutrition. *Gastroenterology*, 137(5), S92–S104. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.073
- Charrier, B., Marques, M., & Haluk, J. P. (1992). HPLC analysis of gallic and ellagic acids in European Oakwood (*Quercus robur* L.) and Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*). *Holzforchung*, 46(1), 87–89. doi: 10.1515/hfsg.1992.46.1.87
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International*, 33, 409–421. doi:10.1016/S0963-9969(00)00067-3
- Espín, J. C., González-Barrio, R., Cerdá, B., López-Bote, C., Rey, A. I., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10476–10485. doi: 10.1021/jf0723864
- Frank, G. W. (1995). *Kombucha-Healthy beverage and natural remedy from the far East*. Austria: Ennsthaler.
- Gharzouli, K., Khennouf, S., Amira, S., & Gharzouli, A. (1999). Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytotherapy Research*, 13, 42–45. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199902)13:1
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., & Sánchez de Medina, F. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 51, 331–362. doi: 10.1080/10408390903584094
- González-Elizondo, M., López-Enríquez, I. L., González-Elizondo, M. S., & Tena-Flores, J. A. (2002). *Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas*. México: CIIDIR-IPN.
- Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1461S–1467S. doi: 10.3945/ajcn.2010.28674F
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., & Swaminathan, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109, 227–234. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.037
- Larrosa, M., González-Sarrías, A., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F., & Espín, J. C. (2006). Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1611–1620. doi: 10.1021/jf0527403
- Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., & Liao, C. C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*, 13, 407–415. doi:10.1006/fmic.1996.0047
- en sistemas de fermentación que utilizan al hongo de Kombucha, sobre todo en infusiones de encino, lo cual proporcionaría información valiosa sobre los mecanismos de consumo del sustrato. De esta manera, se puede mostrar un panorama abierto a una gran fuente de materiales a base de plantas forestales, para ser utilizados como análogos de Kombucha tal como las infusiones de hojas de encino con presunta biodisponibilidad y bioactividad altas.

### Fin de la versión en español

- Lolito, S. B., Zhang, W.-J., Yang, C. S., Crozier, A., & Grei, B. (2011). Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 454–463. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.032
- Luna-José, A. L., Montalvo-Espinoza, L., & Rendón-Aguilar, B. (2003). Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 72, 107–117. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57707204>
- Makkar, H. P. S., Dawra, R. K., & Singh, B. (1991). Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4), 513–519. doi: 10.1002/jsfa.2740540403
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., & Remesy, C. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747. Obtenido de <http://ajcn.nutrition.org/content/79/5/727.full.pdf+html>
- Manteiga, R., Park, D. L., & Ali, S. S. (1997). Risks associated with consumption of herbal teas. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 150, 1–30. doi 10.1007/978-1-4612-2278-1\_1
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., & Gruender, K. (1995). The yeast spectrum of the "tea fungus kombucha". *Mycoses*, 38, 289–295. doi: 10.1111/j.1439-0507.1995.tb00410.x
- Moreno-Jiménez, M. R., Trujillo-Esquível, Gallegos-Corona, M. A., Reynoso-Camacho, R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., ... Ramos-Gómez, M. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 144–153. doi: 10.1016/j.foodres.2014.12.003
- Németh, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., & Juge, N. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*, 42, 29–42. doi: 10.1007/s00394-003-0397-3

- Nummer, B. A. (2013). Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: Risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health*, 76, 8–11.
- Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1432–1452. doi: 10.1016/j.bcp.2006.07.004
- Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 220–235. doi:10.1016/S0891-5849(02)00877-8
- Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 198, 258–261. doi: 10.1007/BF01192606
- Rivas-Arreola, M. J., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Rosales-Castro, M., Bacon, J. R., ...Intriago-Ortega, P. (2010). Antioxidant activity of oak (*Quercus*) leaves infusions against free radicals and their cardioprotective potential. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(11), 537–545. doi: 10.3923/pjbs.2010.537.545
- Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., García-Gasca, T., ... Lujan-García, B. A. (2009). Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chemistry*, 115, 1320–1325. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.050
- Rocha-Guzmán, N. E., Medina-Medrano, J. R., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R.,...González-Herrera, S. M. (2012). Chemical evaluation, antioxidant capacity and consumer acceptance of several oak infusions. *Journal of Food Science*, 77(2), C162-C166. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02524.x
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412, 410–424. doi:10.1016/j.cca.2010.11.034
- Romo-Vaquero, M. R., García-Villalba, R., Larrosa, M., Yañez-Gascón, M. J., Fromentin, E., Flanagan, J., ... García-Conesa, M. T. (2013). Bioavailability of the major bioactive diterpenoids in a rosemary extract: Metabolic profile in the intestine, liver, plasma, and brain of Zucker rats. *Molecular Nutrition Food Research*, 57(10), 1834–1846. doi: 10.1002/mnfr.201300052
- Sánchez-Burgos, J. A., Ramírez-Mares, M. V., Larrosa, M. M., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Medina-Torres, L., & Rocha-Guzmán, N. E. (2013). Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*, 42, 57–62. doi:10.1016/j.indcrop.2012.05.017
- Shariatifar, N., Fathabad, A. E., Khaniki, G. J., & Nasrabadi, H. G. (2014). Evaluation of the antibacterial activity of essential oil and aqueous and ethanolic extracts of *Quercus infectoria* leaves on food-borne pathogenic bacteria. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 5(10),709–713. Obtenido de <http://www.ijpsr.info/docs/IJPSR14-05-10-015.pdf>
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., & Teuber, M. (1995). Microbiology and fermentation balance in a Kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 590–594. doi:10.1016/S0723-2020(11)80420-0
- Tapiero, H., Tew, K. D., Nguyen Ba, G., & Mathé, G. (2002). Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(4), 200–207. doi:10.1016/S0753-3322(02)00178-6
- Valencia, S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75, 33–53. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57707503>
- Vázquez, M. L., Valencia, S., & Nixon, K. C. (2004). Notes on red oaks (*Quercus* sect. Lobatae) in eastern México, with description of a new species, *Quercus hirtifolia*. *Brittonia*, 56, 136–142. doi: 10.1663/0007-196X(2004)056[0136:NOROQS]2.0.CO;2
- Vázquez-Cabral, B. D., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Herrera, S. M., González-Laredo, R. F., Moreno-Jiménez, M. R., & Córdova-Moreno, I. T. S. (2014). Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with the Kombucha consortium under different processing conditions. *Nutrafoods*, 13, 169–178. doi: 10.1007/s13749-014-0035-0
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2), 97–110. doi:10.1016/j.phymed.2008.12.018