

Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas

Polyphenols: antioxidant and toxicological properties

Eréndira Valencia-Avilés¹, Iván Ignacio-Figueroa¹, Erika Sosa-Martínez¹, María Carmen Bartolomé-Camacho¹, Héctor-Eduardo Martínez-Flores¹, Martha-Estrella García-Pérez^{1*}

¹ Facultad de Químico-Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tzinzuntzan 173. Col Matamoros. Morelia, Michoacán, México

*margarc@live.ca

Recibido: 26-12-2016. Aceptado después de revisión: 31-1-2017

Resumen: Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, con diversas funciones fisiológicas. Variadas estructuras químicas caracterizan a este grupo de moléculas. Su amplia distribución, así como su capacidad de captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno asociadas con el padecimiento de enfermedades, perfila a los extractos naturales ricos en compuestos fenólicos como ingredientes que pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos productos en la industria farmacéutica, de alimentos y cosméticos. Sin embargo, para lograr tales propósitos, es necesario asegurar su inocuidad, a través de la realización de pruebas rigurosas de toxicidad. En este artículo se describen los diferentes tipos de compuestos fenólicos desde el punto de vista químico, así como múltiples estudios que avalan sus propiedades antioxidantes. De igual modo, se discuten diferentes métodos toxicológicos y su impacto en la determinación del grado de toxicidad de extractos polifenólicos naturales provenientes de plantas.

Palabras claves: antioxidante, polifenoles, toxicidad.

Abstract:

Phenolic compounds are secondary plant metabolites, with various physiological functions. Several chemical structures characterize to these molecules. They are widely distributed and have a high capacity to capture reactive oxygen and nitrogen species associated to the disease pathogenesis. Taking into account these characteristics, natural extracts rich in polyphenols can be used for the development of new pharmaceutical, alimentary and cosmetic products. However, it is necessary to ensure the safety of these products by performing toxicity tests. This article describes polyphenols from the chemical point of view, as well as multiple studies that support their antioxidant properties. Additionally, different toxicological methods are discussed, as well as their impact in the determination of the toxicity of natural polyphenolic extracts from plants.

Keywords: antioxidant, polyphenols, toxicity.

1. Introducción

Los polifenoles (PF) o compuestos fenólicos (CF) son moléculas naturales del metabolismo secundario de las plantas que derivan de las vías de shiquimato y de los fenilpropanoides [1]. En el reino vegetal se encuentran ampliamente distribuidos, de hecho, las plantas sintetizan miles de CF diferentes [2].

El contenido de PF en las plantas y frutos tiene variaciones que dependen del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento [3]. Además de participar en la función fisiológica de los vegetales [4], también son componentes importantes de la dieta humana, aunque no se consideran como nutrientes [5]. Son objeto frecuente de investigación debido a sus diversas funciones como lo es la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente como la agresión por patógenos e insectos [6]. Además de estas funciones, los PF son reconocidos por su remarcada capacidad antioxidante [7] [8]. Los CF son los antioxidantes más abundantes en frutas, verduras y bebidas derivadas de algunas plantas [9]. Su ingesta es en promedio 1g, lo que es 10 veces mayor que la de vitamina C y 100 veces mayor que la de vitamina E [10]. Más allá de sus propiedades para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de importancia en la patogénesis de enfermedades, los CF pueden actuar en numerosas vías de señalización intracelulares como mediadores, lo que los convierte en moléculas muy interesantes para el desarrollo de nuevos productos.

Investigadores y grandes industrias han mostrado un gran interés en estas moléculas [10], lo que ha llevado a realizar diversos estudios con el fin de encontrar CF con propiedades farmacológicas de interés, dentro de las que se encuentra el carácter antioxidante, importante para combatir enfermedades producidas por el estrés oxidativo [11], [12]. Adicionalmente, a la capacidad antioxidante de estos compuestos, se les atribuyen propiedades antiinflamatorias [13], antialérgica, antitrombóticas, antimicrobianas, antineoplásicas y anticancerígenas [14]–[18], que justifican el número importante de publicaciones que pueden encontrarse en la literatura científica relacionadas con este tipo de compuestos.

2. Clasificación y distribución de los compuestos fenólicos en el reino vegetal.

Los CF presentan una estructura molecular similar, caracterizada por tener de uno a más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo enlazado [19]. Su diversidad estructural implica que existan un amplio grupo de moléculas pertenecientes a este grupo [20] los cuales van desde estructuras simples hasta compuestos complejos, siendo clasificados de diversas maneras [21]. De manera general, los CF han sido clasificados en dos grandes grupos: flavonoides (F) y no-flavonoides. En el grupo de los F, se encuentran los flavonoles (FN), flavonas (FAS), flavan-3-ols, isoflavonas (IF), flavanonas (FNA), dihidroflavonoles (DHF), antocianidinas y chalconas. Mientras que en el grupo de no F están los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, polifenoles volátiles, estilbenos y compuestos diversos (lignanos y cumarinas) [22].

El grado de solubilidad es otro factor tomado en cuenta para su clasificación. Los compuestos solubles en agua son los ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides y quinonas. Por otro lado, se encuentran los compuestos insolubles en agua, tales como los taninos condensados, ligninas y ácidos hidroxicinámicos, los cuales están unidos a la pared celular de las células vegetales [3]. Los PF también se clasifican acorde al número de anillos fenólicos y los elementos estructurales unidos a las unidades básicas, siendo los principales grupos de compuestos fenólicos, los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos hidrolizables, taninos condensados, estilbenos y lignanos [21], [23], [24].

2.1. Flavonoides

Los flavonoides son la clase más abundante de PF, derivados de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina [25]. Estos compuestos de bajo peso molecular son necesarios para el desarrollo de vegetales ya que pueden actuar como señaladores químicos y tiene efectos sobre algunas enzimas ligadas a la fisiología y metabolismo del vegetal [2]. En seres humanos, son compuestos con propiedades asociadas a una disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares [26]. Se encuentran ampliamente distribuidos en reino vegetal, con una menor proporción en hongos y algas. En las plantas se localizan principalmente en las partes aéreas [2].

El esqueleto químico de los F está basado en compuestos de 15 carbonos (C6-C3-C6), con numerosos sustituyentes. Los cuales comparten un esqueleto de carbono tipo difenil 1,3-propano con dos anillos enlazados (anillo A y B) ligados por un tercer anillo de pirano (anillo C). La mayoría aparecen como glucósidos, en menor frecuencia como sulfatos, dímeros, polímeros o en su forma libre (agliconas). Los glucósidos se pueden presentar como C-glucósidos o como O-glucósidos, siendo estos últimos los más frecuentes. La glucosa es el azúcar más común en estos compuestos pero se podrían encontrar en su estructura química la ramnosa, xilosa y galactosa. Las posiciones C3 o C5 del anillo A son los sitios de glicosilación más comunes y menormente en el sitio C7 del esqueleto flavoinode [21].

Dentro del grupo de los F pueden encontrarse diversos subgrupos con una gran variedad de compuestos, diferenciados por el número y posición de grupos hidroxilos, así como por los grupos funcionales que presentan [27]. Los principales subgrupos de flavonoides son: FN, FAS, FNA, dihidroflavonas, IF, antocianidinas, flavan-3-ol y flavanoles monoméricos (catequinas y leucoantocianidinas) así como flavanoles poliméricos (proantocianidinas). De menor importancia son las chalconas, dihidrochalconas, DHF, flavan-3,4-dioles, cumarinas, auronas, biflavonoides y neoflavonoides [21], [28].

El subgrupo de los FN es omnipresente en los alimentos. Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3. Entre los FN más comunes se pueden nombrar el kaempferol, quercetina, isorramnetina y miricetina. Su contenido en frutas, verduras y bebidas puede variar considerablemente debido a diversas condiciones como son los cambios de estación y las condiciones de crecimiento de la especie vegetal donde se encuentran. La cebolla amarilla y roja (*Allium cepa*) es una fuente rica en FN [2], [20][29].

Las FAS son estructuralmente similares a los FN, a diferencia de que las FAS carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3. Aunque se han encontrado en vegetales, tanto en forma de O-glucósidos como C-glucósidos, siendo abundantes en el apio (*Apium graveolens*), perejil (*Petroselinum hortense*) y algunas hierbas, no son compuestos con amplia distribución [20].

Debido a su similitud estructural con los estrógenos y la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos, las IF, se consideran como fitoestrógenos. Estas poseen un anillo bencénico en el carbono C3 con grupos hidroxilos en C7 y C4. Son compuestos que pueden presentarse glicosilados o como agliconas, siendo encontrados con regularidad en plantas leguminosas. Durante su procesamiento tienden a hidrolizarse además de ser termosensibles. Los productos de soya fermentados pueden ser ricos en agliconas como resultado de la hidrólisis de los glicósidos, mientras que los productos cuya fabricación implica calentamiento, tales como leche de soya y tofu, contienen cantidades reducidas de IF [2], [20].

Las antocianidinas son las estructuras básicas de las antocianinas [26]. Conforman un grupo importante de pigmentos vegetales formando conjugados con azúcares y ácidos grasos para formar un grupo diverso en colores responsables de tonalidades azules, color de malva, púrpura, rojo, escarlata y naranjas brillantes. Las más comunes son la pelargonidina, la

cianidina, la delfinidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina. Su principal fuente son las frutas, aunque se les encuentra en cereales, vinos y algunos vegetales[30].

Los FN estructuralmente tienen un anillo C saturado y un hidroxilo en carbono C3. Pueden aparecer como monómeros o polímeros, y las combinaciones heterosídicas son poco habituales. Los flavanoles representativos en alimentos son los flavan-3-ol, que a su vez pueden encontrarse ya sea en forma de monómero (catequina), dímero condensado, oligómero (procianidinas) o polímero (proantocianidinas o taninos condensados). Las catequinas se encuentran principalmente en frutas, vino y chocolate. Mientras que galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato aparecen principalmente en el té [31].

Fuentes como verduras, frutas, té y vino son alimentos con gran contenido de FN. Se distribuyen principalmente en tejido externo y aéreo de la planta; la concentración de FN en frutas de la misma planta pueden variar en función de la exposición solar [32][33].

Una subclase compleja de flavonoides, que pueden ser encontrados desde simples monómeros a proantocianidinas oligoméricas y poliméricas son los taninos condensados o proantocianidinas. La catequina y la epicatequina están ampliamente distribuidas (como dímeros y trímeros) a diferencia de la poca distribución de epiafzelequina. Los taninos son compuestos polifenólicos, solubles en agua con amplia variedad de estructuras cuyo peso molecular tiende a ser alto [21]. Se caracterizan por ser astringentes, amargos y por su capacidad de precipitar proteínas [3]. Se dividen en dos grandes grupos en función de su estructura y propiedades: los taninos condensados y los hidrolizables. Más recientemente, una tercera clase de taninos es agregada; los florotaninos, los que se han aislado en varios géneros de algas [34].

Los taninos condensados son oligómeros o polímeros de flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles, encontrados principalmente en las uvas. Están muy extendidos en todos los helechos, gimnospermas y algunas angiospermas [21]. Las proantocianidinas, cuando están en contacto con las proteínas salivales, son responsables de la astringencia de los frutos [3]. El tipo más abundante de proantocianidinas son las procianidinas compuestas por unidades de epicatequina. Las proantocianidinas pueden ser polímeros de hasta 50 unidades. El tipo menos frecuente son las propelargonidinas y prodelfinidinas [35].

2.2. No flavonoides

El ácido gálico, vinílico y *p*-hidroxibenzoico son los ácidos hidroxibenzoicos más comunes. Estos compuestos orgánicos con un anillo fenólico y un grupo carboxílico asociado forman una estructura de tipo C6-C1 [21]. Se encuentran además muy frecuentemente en las frutas en forma de ésteres [3]. Los ácidos hidroxicinámicos con un esqueleto C6-C3, se encuentran principalmente como ácido cumárico, cafeico y ferúlico conjugados con ácido tartárico o ácido quínico y en raras ocasiones en estado libre [34].

Los hidroxicinamatos C6-C3 producidos como conjugados son denominados ácidos clorogénicos, estos compuestos presentes en un 10% en granos de café (*Coffea canephora*) son la principal ingesta de fenólicos en consumidores regulares. Están presentes en alimentos como uvas y en vinos tintos y blancos procedentes de *Vitis vinífera* [36].

Los taninos hidrolizables como el ácido tánico y los elagitaninos son polímeros cuyo peso molecular varía entre 500 y 5000 Da [37], [38]. Se caracterizan por una parte central que consiste en un poliol (generalmente glucosa) donde las funciones hidroxilo están esterificadas con ácido gálico. Hay dos tipos de taninos hidrolizables: a) los galotaninos cuya hidrólisis libera ácido gálico y sus derivados galloilados así como b) los elagitaninos quienes liberan por hidrólisis al ácido gálico, elágico, hexahidroxidifénico, valónico y cuyos grupos galoil están conectados a través de enlaces C-C [36].

Los estilbenos son compuestos con una estructura C6-C2-C6, sintetizados por la adición de 1 a 3 moléculas de malonil-CoA con ácidos cinámicos, que se derivan de la ruta biosintética de fenilpropano. Pueden actuar como fitoalexinas producidas por las plantas en respuesta a enfermedades, lesiones y estrés; contribuyendo también al sabor y potentes actividades biológicas de las plantas. La síntesis de estilbenos antifúngicos puede ser inducida por organismos apropiados, o por una serie de estímulos abióticos [34]. El resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) principal representante de este grupo se produce en las plantas principalmente en respuesta a una lesión y a una infección por hongos [39]. Estudios recientes indican que el resveratrol tiene propiedades que ayudan a la prevención de cáncer y de enfermedades degenerativas [40]. Las concentraciones en vinos tintos son bajas en comparación con otros PF [20], [21].

Los lignanos y neolignanos son un gran grupo de compuestos con una estructura (C6-C3) producidos por la dimerización oxidativa de dos unidades fenilpropano [41] [34]. Cuando las unidades de fenilpropano están unidas por enlaces C-C en las posiciones 8 y 8', el compuesto se considera un lignano. Si los dímeros fenilpropano están unidos por medio de enlaces distintos de C-C 8-8', se trata de un neolignano [42].

Los lignanos son parte del sistema de defensa química de la planta y tradicionalmente se consideran como metabolitos secundarios del duramen en los árboles [43]. Estos compuestos son reconocidos como fitoestrógenos; en el tracto gastrointestinal tienen propiedades estrogénicas y antiestrogénicas [3]. Se encuentran principalmente en forma libre, aunque también se presentan como derivados glucósidos [26]. Las cumarinas son benzo- α -pironas que se encuentran de forma libre o combinada con azúcares. Se pueden clasificar en hidroxycumarinas simples, furanocumarinas con anillo furano unido a núcleo cumarínico; y las piranocumarinas con un anillo pirano [34].

3. Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la generación y la eliminación de especies reactivas, las que tienen como característica común el tener un electrón incompleto en su último orbital. Este desequilibrio ocasiona que la célula sea abrumada por radicales con gran capacidad oxidante [44]. Estos radicales pueden ser resultado del metabolismo celular y un claro ejemplo de ellos son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) [45], [46], tales como el anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico. Los ROS y NOS causan daño celular grave lo que lleva a una amplia lista de enfermedades como el síndrome metabólico, cáncer, Alzheimer y problemas cardiovasculares [4].

El alto contenido en PF, particularmente de flavonoides, ha correlacionado positivamente con la capacidad de ciertas plantas para eliminar radicales libres e inhibir enzimas prooxidantes [47]. Los CF han sido situados como los antioxidantes más abundantes proporcionados por la dieta humana [48]. Se ha reportado que extractos de PF inhiben las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [49], mientras que estudios epidemiológicos, han sugerido que la ingesta de fitoquímicos y en particular PF está asociada con la disminución de enfermedades incluyendo las cardiovasculares, el cáncer y las neurodegenerativas [50].

Los PF son sustancias caracterizadas por su actividad antioxidante, lo que se ha demostrado *in vitro* considerando su capacidad para eliminar ROS y NOS [9], [47], [51], [52]. Los PF disminuyen los niveles de ROS y NOS mediante un mecanismo donde atrapan y disipan los electrones libres de los radicales a través de la donación de un átomo de hidrógeno, generándose como consecuencia la formación de un radical fenoxilo menos dañino para las células [53]–[55]. Sin embargo, se ha documentado que diversos parámetros pueden ejercer una influencia sobre la actividad antioxidante de los PF. Cambios en la estructura de los PF como la sulfatación o glucuronidación, reducen la actividad antioxidante. Se ha demostrado

que glucuronidos de quercetina conservan su actividad antioxidante pero en menor medida que la quercetina como tal [56], [57]. Los PF son compuestos omnipresentes en el reino vegetal. De hecho, en la Tabla 1 se puede observar la concentración de compuestos polifenólicos en diversas estructuras como frutos, flores, tallos, hojas, raíces, semillas y cortezas.

Tabla 1. Concentración de fenoles totales en frutos, flores, tallos, hojas, raíces, semillas y cortezas de especies vegetales.

Especie	Nombre común	Tejido	Fenoles totales mg EAG/g	Fenoles totales mg EAG/g extracto seco	Ref.
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomillo	Hoja		7.30 ± 1.47	[58]
<i>Salvia officinalis</i> L.	Salvia	Hoja		6.80 ± 1	[58]
<i>Origanum majorana</i> L.	Mejorana	Hoja		4.65 ± 1	[58]
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	Quinoa rosada	Semilla	6.66 ± 0.33		[59]
<i>Baccharis platypoda</i>		Hojas	149.13 ± 3.91		[60]
<i>Polygala sabulosa</i>		Partes aéreas	102.94 ± 1.27		[60]
<i>Cyathea phalerata</i>	Helecho	Madera	305.57 ± 2.98		[60]
<i>Cyathea phalerata</i>	Helecho	Madera	119.00 ± 2.90		[60]
<i>Trichilia catigua</i>		Corteza	486.07 ± 3.90		[60]
<i>Artemisia absinthium</i> L	Ajenjo, hierba santa	Callos		8.53	[61]
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Espino amarillo	Hojas		245.65	[62]
<i>Opuntia ficus indica</i> f. <i>inermis</i>	Nopal	Flor		159.76 ± 0.32	[63]
<i>Vitis vinifera</i>	Uva (merlot)	Semilla		38.45 ± 79.20	[64]
<i>Vitis vinifera</i>	Uva (merlot)	Piel		14.99 ± 75.97	[64]
<i>Vitis rotundifolia</i>	Uva (muscadine)	Semilla		32.1371.63	[64]
<i>Persea americana</i> Mill, Fuerte	Aguacate	Fruto	0.66 ± 0.01		[65]
<i>Persea americana</i> Mill, Hass	Aguacate	Fruto	0.78 ± 0.01		[65]
<i>Vaccinium corymbosum</i>	Arandano azul	Fruto	2.81 ± 0.162 /ml de jugo		[66]
<i>Fragaria x ananassa</i> Duch (Elkat)	Fresa	Fruto	0.29 mg/g		[67]
<i>Betula alleghaniensis</i>	Abedul amarillo	Follaje		70.2 ± 2.5	[68]
<i>Betula alleghaniensis</i>	Abedul amarillo	Ramas tiernas		58.3 ± 1.5	[68]
<i>Betula alleghaniensis</i>	Abedul amarillo	Madera		240.1 ± 6.8	[68]

<i>Betula alleghaniensis</i>	Abedul amarillo	Corteza Exterior		170.2 ± 3.0	[68]
<i>Betula alleghaniensis</i>	Abedul amarillo	Corteza Interior		313.1 ± 18.0	[68]
<i>Picea mariana</i>	Píceca negra	Corteza		193.06 ± 4.21	[51]
<i>Picea mariana</i>	Píceca negra	Corteza		404.29 ± 4.04	[51]
<i>Abies balsamea</i>	Abeto balsámico	Corteza		182.08 ± 7.69	[51]
<i>Abies balsamea</i>	Abeto balsámico	Corteza		44.01 ± 0.34	[51]
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Pino gris, ciprés	Corteza		232.58 ± 2.36	[51]
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Pino gris, ciprés	Corteza		30.75 ± 0.48	[51]
<i>Betula alleganiensis</i> Britton	Abedul amarillo	Corteza		314.98 ± 7.83	[51]
<i>Betula alleganiensis</i> Britton	Abedul amarillo	Corteza		309.07 ± 8.55	[51]
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucalipto	Corteza		385.63 ± 11.02	[69]
<i>Quercus resinosa</i>	Encino	Hojas	6.91 ± 0.02		[70]
<i>Quercus grisea</i>	Encino	Hojas	7.06 ± 0.28		[70]
<i>Quercus laeta</i>	Encino	Hojas	5.75 ± 0.03		[70]
<i>Quercus obtusata</i>	Encino	Hojas	5.72 ± 0.21		[70]
<i>Quercus macranthera subsp. sypirensis</i>	Encino	Corteza	327.101 ± 02		[71]
<i>Quercus aucheri</i>	Encino	Corteza	367.401 ± 0.82		[71]
<i>Quercus aucheri</i>	Encino	Corteza	389 ± 0.84		[71]
<i>Quercus suber</i> L	Encino	Corteza exterior	200 ± 0.04		[72]
<i>Quercus suber</i> L	Encino	Corteza exterior	350 ± 0.01		[72]
<i>Quercus suber</i> L	Encino	Corteza exterior	290 ± 0.02		[72]
<i>Quercus resinosa</i>	Encino	Hojas		561.5±71.06	[73]
<i>Quercus sideroxyla</i>	Encino	Corteza		464.0 ± 11.6	[74]
<i>Quercus sideroxyla</i>	Encino	Corteza		686.7 ± 12.9	[74]
<i>Quercus eduardii</i>	Encino		34.36 ± 0.85		[75]
<i>Quercus durifolia</i>	Encino		20.98 ± 1.03		[75]
<i>Quercus sideroxyla</i>	Encino		36.93 ± 0.76		[75]
<i>Quercus resinosa</i>	Encino		120.74 ± 1.67		[75]

En la tabla se muestra la media ± la desviación estándar, expresada como Equivalentes de Ácido Gálicopor gramo de extracto (EAG/g) o Equivalentes de Ácido Gálicopor gramo de extracto seco (EAG/g extracto seco).

4. Estudios toxicológicos realizados con polifenoles

Los estudios toxicológicos se definen como el conjunto de ensayos realizados a una sustancia o mezcla de sustancias químicas en animales de experimentación o *in vitro*. Dichos estudios son diseñados para obtener la información necesaria que permita conocer el perfil toxicológico de la sustancia en estudio, de manera que, en el caso de desarrollo de moléculas para consumo humano, se puedan justificar más estudios sin exponer a los seres humanos a riesgos injustificados [76]. Durante el desarrollo de nuevos fármacos, alimentos o sustancias para consumo humano es necesario evaluar el potencial tóxico de las moléculas a explorar mediante diversos modelos experimentales. Esto es posible debido a la realización de ensayos toxicológicos en diferentes especies animales [77].

La toxicidad de las sustancias puede observarse a través de: a) el estudio de su exposición accidental; b) el estudio de su impacto *in vitro* utilizando células/líneas celulares; c) el estudio de su impacto *in vivo* en animales de experimentación [78]. En este último tipo de estudios se identifica la dosis inicial que se administrará en un estudio ulterior así como la esquematización de los aumentos posteriores de dosis y la identificación de los órganos diana que permitirán conocer si los efectos adversos que puedan presentarse son reversibles o irreversibles [79]. A continuación se describen las características de los estudios toxicológicos más empleados en el desarrollo de nuevas moléculas como candidatas a alimentos, medicamentos o productos cosméticos.

4.1. Estudio de toxicidad aguda

Este tipo de estudios son los encargados de evaluar la toxicidad producida por un fármaco o compuesto bioactivo como resultado de su administración en altas dosis, ya sea como dosis únicas o repetidas en un lapso no mayor a 24 h. Durante mucho tiempo este tipo de estudios eran utilizados para la búsqueda de la dosis letal media (DL_{50}), definida como la concentración que causa la muerte del 50% de los animales. En la actualidad, este tipo de estudios dejó de ser un requerimiento para el registro de nuevos medicamentos, siendo reemplazados por métodos alternativos como el de la dosis fija y el de las clases de toxicidad, reportados a finales del 2002 [77], [80].

Las dosis administradas en estos estudios han ido variando a raíz de los nuevos cambios que se han introducido en la experimentación animal para disminuir al máximo el sufrimiento de los animales, siendo aceptada hasta el 2001 una dosis máxima de 5000 mg/kg, mientras que 2000 mg/kg es la dosis máxima aceptada en la actualidad [77].

El objetivo es obtener los datos de los efectos ocasionados en los animales al ser expuestos a la sustancia estudiada en el ensayo [76]. Para obtener los resultados correspondientes del estudio agudo es necesario la observación de los animales expuestos durante un periodo de 14 días, concluido este período de observación los animales son sacrificados y analizados anatómico-patológicamente [81], [82].

4.2. Estudios de toxicidad a dosis repetidas

Este tipo de estudios toxicológicos tienen algunas diferencias con los estudios agudos. Además de la diferencia en cuanto a las concentraciones utilizadas, existen generalmente repeticiones de dosis. Estos estudios también se diferencian por la duración llegando a prolongarse hasta por 12 meses [77].

4.3. Estudios subcrónicos

En estos estudios se analizan los efectos adversos que puede producir una sustancia que es administrada en un animal de experimentación o en su defecto alguno de sus metabolitos, todo esto durante un tiempo equivalente a no mayor del 10% de la vida del animal [76]. Esto conlleva a la detección de la dosis máxima en la cual no se presenta toxicidad relacionada con la droga (NOEL). Estos estudios también permiten conocer la dosis máxima tolerada (DTM). Una limitación importante es que estos estudios no permiten conocer los efectos que pueda presentar una sustancia a un tiempo mayor que su periodo de latencia, pero aportan la información necesaria para conocer cuáles son los órganos diana y sirven de base para elegir los niveles de dosificación que se utilizarán en los estudios crónicos [77], [83].

4.4. Estudios crónicos

Estos son los estudios donde se observan los efectos adversos o tóxicos que puede tener una sustancia como consecuencia de una administración diaria durante un periodo prolongado, generalmente más del 50% de la vida del animal de experimentación. Estos estudios varían en el tiempo que se ve expuesto el animal a la sustancia o mezcla de sustancias, y pueden tener una duración mínima de tres meses hasta en algunos casos de 2 años [76].

Estas investigaciones son realizadas con al menos dos especies animales, por ejemplo con algún roedor y otra especie no roedora, siendo los perros los más utilizados. El diseño de estos estudios esta encaminado a detectar efectos tóxicos generales entre ellos neurológicos, fisiológicos, bioquímicos, conductuales y patológicos. La dosis máxima utilizada no debe superar los 1000 mg/kg. Esta dosis puede tener efectos tóxicos pero sin comprometer la supervivencia del animal de experimentación [77].

4.5. Estudios toxicológicos alternativos

En los últimos años los métodos alternativos de experimentación animal han progresado, siendo hoy en día los métodos *in vitro*, *in silico* e *in vivo* muy importantes en la evaluación del perfil toxicológico de nuevos compuestos. Estos métodos son muy utilizados para la evaluación de moléculas y son aceptados por las entidades regulatorias como la OCDE, la FDA y la EPA, debido a que pueden reducir, refinar y/o sustituir la experimentación *in vivo* en animales [84]. Los métodos alternativos se fundamentan en el principio de las 3 R (refinamiento, reducción y reemplazo) [84].

5. Estudios toxicológicos basados en compuestos fenólicos

A pesar de las características beneficiosas para la salud de los compuestos polifenólicos, la ingesta elevada y crónica de estas moléculas consumidas normalmente en la dieta diaria puede resultar en efectos adversos negativos para la salud. Por ejemplo, algunos taninos pueden ocasionar efectos antinutricionales debido a su capacidad como agentes quelantes [85]. Los polifenoles pueden interferir en la absorción del hierro consumido en los alimentos de la dieta diaria y provocar anemia [86].

Se ha reportado que los PF pueden alcanzar concentraciones tóxicas si su ingesta se encuentra entre el 1 y 5% total de la dieta diaria, no obstante en condiciones normales, lo habitual en una persona es ingerir, aproximadamente entre 25 mg y 1 g por día [86].

Debido al interés suscitado por estas moléculas en cuanto a su bioactividad, que las convierte en candidatas para el desarrollo de nuevos productos, en años recientes se han realizados

diversos estudios toxicológicos para determinar su toxicidad con el objetivo de garantizar la seguridad de su consumo humano.

En 2015, Soto y colaboradores [87] evaluaron la toxicidad de la infusión de las hojas de chaya orgánica, obteniendo como resultado de dicha infusión, administrada en larvas de *A. salina* una DL₅₀ de 1070.42 µg/ml. En base a estos resultados se llegó a la conclusión, de que el extracto no es tóxico y es seguro para el consumo como agente terapéutico en el tratamiento de la diabetes *mellitus*. En un ensayo de letalidad en *A. salina* se demostró que los extractos hidroalcohólicos de las hojas de naranjo dulce (*Citrus aurantium* L. var. *sinensis* L.), naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), limón criollo (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle), lima persa (*Citrus latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), todos ricos en polifenoles, presentaron cierta toxicidad dependiendo de la concentración, resultando ser no tóxicos a concentraciones menores de 10 µg/ml. Sin embargo, se presentó toxicidad moderada a concentraciones entre 100 y 1000 µg/ml [88]. En otra investigación se demostró que el extracto metanólico de limón criollo poseía un valor de CL₅₀ de 74,78 µg/ml [88].

Plazas Gonzalez (2015) [90] realizó un ensayo de toxicidad en *A. salina* de los CF presentes en fruto, hojas y flores de *C. bracteata*, *M. rupestris*, *G. erectina*, *B. recinosa*, *T. floribunda* y *D. alaternoides* obteniendo como resultado que los extractos de los frutos de *M. rupestris* y *G. erecta* poseen un CL₅₀ superior a 1000 ppm, mostrando que a la mayor concentración ensayada no se afectó a la mitad de la población de este crustáceo. Los extractos de *G. erecta*, *D. alaternoides* y flores de *T. floribunda* presentaron una CL₅₀ de 229, 173 y 196 ppm respectivamente, mientras que otros extractos estudiados en este ensayo (*C. bracteata*, *M. rupestris*, *G. erecta*, *B. recinosa*) resultaron poseer una toxicidad baja o moderada.

Poma, Requis y Gordillo (2011) [91], reportaron que los compuestos polifenólicos del extracto acuoso de hojas secas de *Annona muricata* L. (Guanábana) no presentó toxicidad, basado en el método de dosis límite establecido por la OCDE en el que se administra 1.5mg/kg a ratas. El extracto no produjo la muerte ni signos de toxicidad posteriores a la administración. La necropsia aplicada a las ratas no mostró alteraciones macroscópicas en los tejidos que se examinaron.

Se valoró la toxicidad aguda que presenta el extracto de hoja de *Psidium guajava*, reportada por poseer un elevado contenido de PF, por el método de las clases de toxicidad aguda y dosis letal media en ratas. En ambos estudios se reportó la ausencia de toxicidad a una dosis límite de 2000 mg/kg [92].

Si se analiza la información presentada anteriormente, es posible constatar que la toxicidad presentada por los extractos polifenólicos en modelos animales es relativamente baja sobre todo en el caso de una ingesta moderada. Esto podría deberse a su baja absorción y a su rápida metabolización [86]. Aunque estos estudios resultan alentadores, análisis más profundos dirigidos a comprender el mecanismo de toxicidad de los polifenoles deben realizarse sobre todo considerando mayores períodos de exposición con el fin de que los resultados puedan ser extrapolables a los seres humanos [86].

6. Conclusiones

Durante los últimos años ha habido un interés notable en el estudio de los PF, en parte atribuible a sus numerosas propiedades biológicas. Su capacidad antioxidante ha sido identificada como una de las más representativas. De hecho, la capacidad para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de numerosas plantas se ha asociado con su contenido en este tipo de moléculas. La distribución de PF no se restringe solamente a las flores o frutos de la planta, en diversos estudios se han demostrado la existencia de CF en hojas, raíces y cortezas.

Como se ha mencionado, y de acuerdo la revisión de la literatura realizada, los estudios utilizando extractos polifenólicos, han demostrado que la toxicidad de estos es de leve a

moderada, llegando incluso a ser aparentemente inocuos. Estos resultados implicarían que la relación beneficio riesgo de estos compuestos podría ser muy prometedora, vislumbrándose como candidatos terapéuticos en el tratamiento de algunas enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Sin embargo, mucho queda aún por estudiar en cuanto a su toxicidad potencial, particularmente en lo relacionado con aparición de efectos tóxicos acumulativos tardíos, los que solo pueden ser detectados con la realización de investigaciones toxicológicas de larga duración ejecutadas sobre la base de lineamientos bioéticos que garanticen el cumplimiento del principio de las tres R. Lo anterior resulta de vital importancia para establecer la utilidad de estas moléculas en el desarrollo de productos de uso humano generados por las industrias farmacéuticas, alimentaria y cosmeceútica donde se vislumbra un futuro promisorio para este tipo de compuestos.

Referencias

- [1] A. Munin and F. Edwards-Lévy, *Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review.*, vol. 3, no. 4. 2011.
- [2] M. Quiñones, M. Miguel, and A. Aleixandre, “Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular,” *Nutr. Hosp.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–89, 2012.
- [3] C. W. I. Haminiuk, G. M. Maciel, M. S. V Plata-Oviedo, and R. M. Peralta, “Phenolic compounds in fruits - an overview,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, no. 10, pp. 2023–2044, 2012.
- [4] J. Shay, H. A. Elbaz, I. Lee, S. P. Zielske, M. H. Malek, and M. Hüttemann, “Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (–)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration,” vol. 2015, 2015.
- [5] D. Procházková, I. Boušová, and N. Wilhelmová, “Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids,” *Fitoterapia*, vol. 82, no. 4, pp. 513–523, 2011.
- [6] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, “Polyphenols: Food sources and bioavailability,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, 2004.
- [7] P. Sunkireddy, S. N. Jha, J. R. Kanwar, and S. C. Yadav, “Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for cataract,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 112, pp. 554–62, Dec. 2013.
- [8] A. L. Gomez, J. A. Lopez, A. Rodriguez, J. Fortiz, L. R. Martinez, A. Apolinar, and L. F. Enriquez, “Produccion de compuestos fenolicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminacion,” *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, vol. 44, no. 1, pp. 137–143, 2016.
- [9] P. Baret, A. Septembre-Malaterre, M. Rigoulet, C. Lefebvre D’Hellencourt, M. Priault, M. P. Gonthier, and A. Devin, “Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 1, pp. 167–174, 2013.
- [10] J. Rodrigo-García, L. A. De la Rosa, B. Herrera-Duenez, A. G. González-Barrios, G. A. González-Aguilar, S. Ruiz-Cruz, and E. Alvarez-Parrilla, “Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México Polyphenol and antioxidant capacity quantification in,” *Tecnociencia*, vol. V, no. May 2011, pp. 67–75, 2016.
- [11] Y. E. Lopera, J. Fantinelli, L. F. González-Arbeláez, B. Rojano, J. L. Ríos, G. Schinella, and M. Susana, “Antioxidant activity and cardioprotective effect of a nonalcoholic extract of *Vaccinium meridionale* Swartz during ischemia-reperfusion in rats,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, pp. 1–10, 2013.
- [12] E. Szliszka and W. Krol, “Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, 2013.
- [13] M. R. Moreno-Jimenez, F. Trujillo-Esquivel, M. a. Gallegos-Corona, R. Reynoso-Camacho, R. F. González-Laredo, J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, and M. Ramos-Gomez, “Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 80, pp. 144–153, 2015.
- [14] F. a Van Dorsten, S. Peters, G. Gross, V. G. Roldan, M. Klinkenberg, R. C. H. De Vos, E. Vaughan, J. P. M. Van, S. Possemiers, T. Van De Wiele, and D. M. Jacobs, “Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine / Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine / Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 45, pp. 11331–11342, 2012.

- [15] K. Zapata, F. B. Cortes, and B. A. Rojano, "Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agría (*Psidium araca*)," *Inf. Tecnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 103–112, 2013.
- [16] I. A. M. Groh, C. Chen, C. Lüske, A. T. Cartus, and M. Esselen, "Plant polyphenols and oxidative metabolites of the herbal alkenylbenzene methyleugenol suppress histone deacetylase activity in human colon carcinoma cells," *J. Nutr. Metab.*, vol. 2013, 2013.
- [17] K. Hintze, E. H. Jeffery, J. W. Finley, A. Kong, K. J. Hintze, E. H. Je, L. L. Ji, and X. G. Lei, "Antioxidants in Foods : State of the Science Important to the Food Industry Antioxidants in Foods : State of the Science Important to the Food Industry," no. November 2015, pp. 6837–6846, 2011.
- [18] I. Palacios, M. Lozano, C. Moro, M. D'Arrigo, M. A. Rostagno, J. A. Martínez, A. García-Lafuente, E. Guillaumon, and A. Villares, "Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms," *Food Chem.*, vol. 128, no. 3, pp. 674–678, 2011.
- [19] N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, 2006.
- [20] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, and A. Crozier, "Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 14, pp. 1818–1892, 2013.
- [21] B. Zhang, J. Cai, C.-Q. Duan, M. Reeves, and F. He, "A Review of Polyphenolics in Oak Woods," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 6978–7014, 2015.
- [22] J. Gonçalves, C. L. Silva, P. C. Castilho, and J. S. Câmara, "An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines," *Microchem. J.*, vol. 106, pp. 129–138, 2013.
- [23] C. G. da Rosa, C. D. Borges, R. C. Zambiazzi, J. K. Rutz, S. R. da Luz, F. D. Krumreich, E. V. Benvenuti, and M. R. Nunes, "Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*)," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 58, no. 2, pp. 527–533, Oct. 2014.
- [24] I. C. W. Arts and P. C. H. Hollman, "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, p. 317S–25S, 2005.
- [25] W. Routray and V. Orsat, "Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, no. 2, pp. 409–424, 2012.
- [26] V. I. P. I. Ignat, I. Volf, "A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables," *Int. J. ChemTech Res.*, vol. 3, no. 3, pp. 1033–1036, 2011.
- [27] E. de Rijke, P. Out, W. M. a Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, and U. a T. Brinkman, "Analytical separation and detection methods for flavonoids.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 31–63, Apr. 2006.
- [28] A. Crozier, D. Del Rio, and M. N. Clifford, "Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds," *Mol. Aspects Med.*, vol. 31, no. 6, pp. 446–467, 2010.
- [29] D. Prakash, G. Upadhyay, P. Pushpangadan, and C. Gupta, "Antioxidant and free radical scavenging activities of some fruits.," *J. Complement. Integr. Med.*, vol. 8, no. January, pp. 1109–1116, 2011.
- [30] J. M. Dimitric Markovic, B. Pejin, D. Milenkovic, D. Amic, N. Begovic, M. Mojovic, and Z. S. Markovic, "Antiradical activity of delphinidin, pelargonidin and malvin towards hydroxyl and nitric oxide radicals: The energy requirements calculations as a prediction of the possible antiradical mechanisms," *Food Chem.*, vol. 218, pp. 440–446, 2017.
- [31] I. D. Silva, J. Gaspar, G. Gomes, A. S. Rodrigues, A. Laires, and J. Rueff, "Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity . Potential implications in their use as therapeutical agents," vol. 124, pp. 29–51, 2000.
- [32] H.-H. Goh, K. Khairudin, N. a Sukiran, M. N. Normah, and S. N. Baharum, "Metabolite profiling reveals temperature effects on the VOCs and flavonoids of different plant populations.," *Plant Biol. (Stuttg.)*, vol. 18, pp. 1–10, 2015.
- [33] F. Chinnici, N. Natali, A. Bellachioma, A. Versari, and C. Riponi, "Changes in phenolic composition of red wines aged in cherry wood," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 60, no. 2, pp. 977–984, 2015.
- [34] S. Philipov and T. Doncheva, "Alkaloids Derived from Ornithine: Tropane Alkaloids," *Nat. Prod.*, no. January 2013, pp. 343–358, 2013.
- [35] C. H. Iii and N. Dakota, "Sources of natural antioxidants : oilseeds , nuts , cereals , legumes , animal products and microbial sources," *North*, pp. 159–209, 2001.
- [36] T. Stevanovic, P. N. Diouf, and M. Garcia-Perez, "Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass," *Curr. Nutr. Food Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 264–295, Nov. 2009.
- [37] P. Liu, *Composition of hawthorn (Crataegus spp.) fruits and leaves and emblic leafflower (Phyllanthus emblica) fruits*. 2012.
- [38] P. Arapitsas, "Hydrolyzable tannin analysis in food.," *Food Chem.*, vol. 135, no. 3, pp. 1708–17, Dec.

- 2012.
- [39] M. Atanacković, A. Petrović, S. Jović, L. G.-Bukarica, M. Bursać, and J. Cvejić, "Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines," *Food Chem.*, vol. 131, no. 2, pp. 513–518, 2012.
- [40] P. Gresele, C. Cerletti, G. Guglielmini, P. Pignatelli, G. de Gaetano, and F. Violi, "Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: An update," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 22, no. 3, pp. 201–211, 2011.
- [41] L. Vincenzo, "Phenolic Compounds: Introduction," in *Natural Products*, no. Julio, K. G. Ramawat and J. M. Mérillon, Eds. 2013, pp. 1543–1580.
- [42] C. D. Stalikas, "Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 18, pp. 3268–3295, 2007.
- [43] E. T. Benković, T. Grohar, D. Žigon, U. Švajger, D. Janeš, S. Kreft, and B. Štrukelj, "Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity," *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 23–28, 2014.
- [44] T. M. T. Avelar, A. S. Storch, L. A. Castro, G. V. M. M. Azevedo, L. Ferraz, and P. F. Lopes, "Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome : which mechanisms are involved?," no. August, pp. 231–239, 2015.
- [45] C. López-Alarcón and A. Denicola, "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays," *Anal. Chim. Acta*, vol. 763, pp. 1–10, 2013.
- [46] L. C. Corrales and M. M. Muñoz-Ariza, "Estrés oxidativo : origen , evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno," *Nov. - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, vol. 10, no. 18, pp. 213–225, 2012.
- [47] N. Auberval, S. Dal, W. Bietiger, E. Seyfritz, J. Peluso, C. Muller, M. Zhao, E. Marchioni, M. Pinget, N. Jeandidier, E. Maillard, V. Schini-Kerth, and S. Sigrist, "Oxidative Stress Type Influences the Properties of Antioxidants Containing Polyphenols in RINm5F Beta Cells.," *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2015, pp. 1–11, 2015.
- [48] A. Septembre-Malaterre, G. Stanislas, E. Douraguia, and M.-P. Gonthier, "Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island," *Food Chem.*, vol. 212, pp. 225–233, 2016.
- [49] D. Pradal, P. Vauchel, S. Decossin, P. Dhulster, and K. Dimitrov, "Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 32, pp. 137–146, 2016.
- [50] C. Angeloni, T. Maraldi, D. Milenkovic, and D. Vauzour, "Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology 2014," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2015, pp. 2–4, 2015.
- [51] M.-E. García-Pérez, M. Royer, A. Duque-fernandez, P. N. Diouf, T. Stevanovic, and R. Pouliot, "Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes," *J. Ethnopharmacol.*, 2010.
- [52] M. Da Silva Morrone, C. E. Schnorr, G. A. Behr, J. Gasparotto, R. C. Bortolin, K. S. Moresco, L. Bittencourt, A. Zanotto-Filho, D. P. Gelain, and J. C. F. Moreira, "Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of ovariectomized Wistar rats," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 32, pp. 181–188, 2016.
- [53] S. Rajamanikandan, T. Sindhu, D. Durgapriya, D. Sophia, P. Ragavendran, and V. K. Gopalakrishnan, "Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Mollugo nudicaulis* by Invitro Assays," *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 310–316, 2011.
- [54] S. H. Choi, J. B. Ahn, N. Kozukue, C. E. Levin, and M. Friedman, "Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of jujube (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in Korea," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 12, pp. 6594–6604, 2011.
- [55] H. Willeman, P. Hance, A. Fertin, N. Voedts, N. Duhai, J. F. Goossens, and J. L. Hilbert, "A method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and sesquiterpene lactone content in industrial chicory root foodstuffs," *Sci. World J.*, vol. 2014, pp. 1–11, 2014.
- [56] a. Piazzon, U. Vrhovsek, D. Masuero, F. Mattivi, F. Mandoj, and M. Nardini, "Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: Synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 50, pp. 12312–12323, 2012.
- [57] F. B. Lotito SB, Zhang WJ, Yang CS, Crozier A, "Metabolic Conversion of Dietary Flavonoids Alterstheir Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 2, pp. 454–463, 2012.
- [58] M. H. H. Roby, M. A. Sarhan, K. A.-H. Selim, and K. I. Khalel, "Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts," *Ind. Crops Prod.*, vol. 43, pp. 827–831, May 2013.

- [59] F. Abderrahim, E. Huanatico, R. Segura, S. Arribas, M. C. Gonzalez, and L. Condezo-Hoyos, "Physical features, phenolic compounds, betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Peruvian Altiplano," *Food Chem.*, vol. 183, pp. 83–90, 2015.
- [60] I. M. C. Brighente, M. Dias, L. G. Verdi, and M. G. Pizzolatti, "Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species," *Pharm. Biol.*, vol. 45, no. 2, pp. 156–161, 2007.
- [61] M. Ali and B. H. Abbasi, "Thidiazuron-induced changes in biomass parameters, total phenolic content, and antioxidant activity in callus cultures of *Artemisia absinthium* L.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 172, no. 5, pp. 2363–2376, 2014.
- [62] M. S. Yogendra Kumar, R. J. Tirpude, D. T. Maheshwari, A. Bansal, and K. Misra, "Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves in vitro.," *Food Chem.*, vol. 141, no. 4, pp. 3443–50, Dec. 2013.
- [63] H. Alimi, N. Hfaiedh, Z. Bouoni, M. Sakly, and K. Ben Rhouma, "Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract in rats.," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 32, no. 3, pp. 406–16, Nov. 2011.
- [64] Y. Yilmaz and R. T. Toledo, "Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 19, no. 1, pp. 41–48, 2006.
- [65] P. S. Sellamuthu, M. Mafune, D. Sivakumar, and P. Soundy, "Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado.," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 12, pp. 3024–31, Sep. 2013.
- [66] V. Kraujalytė, P. R. Venskutonis, A. Pukalskas, L. Česonienė, and R. Daubaras, "Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes," *Food Chem.*, vol. 188, pp. 583–590, 2015.
- [67] J. Oszmiański and A. Wojdyło, "Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 228, no. 4, pp. 623–631, 2009.
- [68] P. N. Diouf, T. Stevanovic, and Y. Boutin, "The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts," *Ind. Crops Prod.*, vol. 30, no. 2, pp. 297–303, Sep. 2009.
- [69] S. a. O. Santos, J. J. Villaverde, C. S. R. Freire, M. R. M. Domingues, C. P. Neto, and A. J. D. Silvestre, "Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis* × *E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts," *Ind. Crops Prod.*, vol. 39, pp. 120–127, Sep. 2012.
- [70] J. Sanchez-Burgos, "Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species," *Ind. Crop. ...*, 2013.
- [71] D. Söhretoğlu, S. Sabuncuoğlu, and U. Ş. Harput, "Evaluation of antioxidative, protective effect against H₂O₂ induced cytotoxicity, and cytotoxic activities of three different *Quercus* species.," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 2, pp. 141–6, Feb. 2012.
- [72] S. A. O. Santos, P. C. R. O. Pinto, A. J. D. Silvestre, and C. P. Neto, "Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L.," *Ind. Crops Prod.*, vol. 31, no. 3, pp. 521–526, May 2010.
- [73] J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, R. F. González-Laredo, L. Medina-Torres, C. A. Gomez-Aldapa, L. A. Ochoa-Martínez, C. E. Martínez-Sánchez, B. Hernández-Santos, and J. Rodríguez-Ramírez, "Physicochemical properties and antioxidant capacity of oak (*Quercus resinosa*) leaf infusions encapsulated by spray-drying," *Food Biosci.*, vol. 2, pp. 31–38, Jun. 2013.
- [74] M. Rosales-Castro, R. F. González-Laredo, N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante, M. J. Rivas-Arreola, and J. J. Karchesy, "Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxylla* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS," *Holzforschung*, vol. 66, no. 5, pp. 577–584, Jan. 2012.
- [75] N. E. Rocha-Guzmán, J. R. Medina-medrano, A. Gallegos-infante, M. Ramos-g, and S. M. Gonz, "Chemical Evaluation , Antioxidant Capacity , and Consumer Acceptance of Several Oak Infusions," vol. 77, no. 2, 2012.
- [76] R. Ramírez Herrera and N. E. Soto Ruíz, "Estudios Pre-clínicos y Clínicos," *Cofepris*, pp. 1–20, 2013.
- [77] R. Gámez and R. Más, "Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados.," *Rev. CENIC Ciencias Biol.*, vol. 38, no. 3, pp. 204–208, 2007.
- [78] S. Parasuraman, "Toxicological screening," *J. Pharmacol. Pharmacother.*, vol. 2, no. 2, pp. 74–79, 2011.
- [79] T. I. Ramos, "Contexto actual de los estudios preclínicos," *Dep. ciencias la vida y la Agric.*, vol. 1, no. 3, pp. 103–105, 2015.
- [80] OECD/OCDE, "Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method," *Oecd Guidel. Test. Chem.*, no.

- December, pp. 1–14, 2001.
- [81] OECD/OCDE, “Neurotoxicity Study in Rodents,” no. July, pp. 1–15, 1997.
- [82] D. F. Arencibia-Arrebola, L. A. Rosario-Fernández, Y. López-Feria, M. Fariñas-Medina, J. F. Infante-Bourzac, D. Díaz-Rivero, and J. L. Prieto-Díaz, “Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda,” *Rev. Toxicol. en Línea*, pp. 1–15, 2003.
- [83] OCDE, “Preliminary Draft Updated Test Guideline 407 : Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents ; Updated With,” *OCDE Guidel. Test. Chem.*, pp. 1–11, 2006.
- [84] H. Kandárová and S. Letašiová, “Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods.,” *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 4, no. 3, pp. 107–13, 2011.
- [85] L. Bravo, “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.,” *Nutr. Rev.*, vol. 56, no. 11, pp. 317–333, 1998.
- [86] E. V. A. G. Creus, “Compuestos fenólicos,” vol. 23, pp. 80–84, 2004.
- [87] R. V. Soto, M. Eufemia, M. Rubio, M. J. Verde Star, A. O. Cárdenas, P. Preciado-Rangel, J. A. González, and J. R. Esparza-Rivera, “Cnidoscopus chayamansa hidropónica orgánica y su capacidad hipoglucémica, calidad nutraceutica y toxicidad* Cnidoscopus chayamansa organic hydroponic and its hypoglycemic capacity, nutraceutical quality and toxicity,” *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas Nezahualcóyotl Núm. Palacio Munic.*, vol. 6, no. 110, pp. 815–825, 2015.
- [88] K. O. Ramos, Y. H. Sánchez, N. V. Pérez, and O. P. Villafaña, “Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae),” *Rev. Cuba. Plantas Med.*, vol. 17, no. 4, pp. 368–379, 2012.
- [89] E. A. Plazas Gonzalez, “Tamizaje fitoquímico preliminar , evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas,” *Rev. Cuba. Plantas Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 182–199, 2015.
- [90] E. Plazas-González, “Tamizaje fitoquímico preliminar , evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas Preliminary phytochemical screening , antioxidant , and toxic activity evaluation of six species of colombian Ericaceas,” *Rev. Cuba. Plantas Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 182–199, 2015.
- [91] E. M. Poma, E. R. Requis, and G. C. Gordillo, “Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L . (Guanábana) de Cuzco,” *Cienc. Invest.*, vol. 14, no. 2, pp. 29–33, 2011.
- [92] R. Rodríguez Amado, A. Lafourcade Prada, and L. Pérez Rondón, “Hojas de *Psidium guajava* L.,” *Rev. Cuba. Farm.*, vol. 47, no. 1, pp. 127–135, 2013.