

2020 Evaluación de la toxicidad aguda y subaguda en la administración de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) in vivo

Zurisadai Soto Herrera.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Evaluación de la toxicidad aguda y subaguda en la administración de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) in vivo

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

Zurisadai Soto Herrera.

Dirigido por

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Nutrición Humana

Evaluación de la toxicidad aguda y subaguda en la administración de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) *in vivo*.

### TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

**Presenta:**

Zurisadai Soto Herrera.

**Dirigido por:**

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez.

### SINODALES

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez.  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Jorge Luis Chávez Servín.  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez.  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Aarón Kuri García.  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez.  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Juana Elizabeth Elton Puente  
Directora de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Octubre 2020  
México

## Resumen

El pasto joven de cebada (PJC) (*Hordeum vulgare*), familia Poaceae, ha llamado la atención en la actualidad por contener polifenoles, proantocianidinas y flavonoides. Los efectos benéficos que desempeñan los polifenoles, se encuentran descritos en la literatura, principalmente en pruebas *in vitro*. Sin embargo, poco se habla del abuso de estos componentes, que podrían provocar efectos adversos, como la acción prooxidativa ocasionada por una dosis elevada de los componentes concentrados del PJC. El objetivo de este trabajo fue realizar pruebas de toxicidad aguda y subaguda y así mostrar la seguridad en la administración oral de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (EHPC) en un modelo murino. El extracto seco de PJC se resuspendió en agua destilada y se administró por vía oral, utilizando cánula intragástrica en las dosis respectivas de acuerdo con la OCDE, para los estudios de toxicidad aguda (directriz 425) y toxicidad subaguda (directriz 407). La dosis letal 50 oral (DL 50) del EHPC *Hordeum vulgare*, se estimó en  $\geq 5000$  mg/kg. Sin embargo, tomando en cuenta los posibles efectos acumulativos después de una administración oral repetida, las dosis seleccionadas en la prueba subaguda fueron (250 y 500 mg/kg/día). Los parámetros para evaluar posibles efectos tóxicos fueron el peso corporal, peso relativo de los órganos (hígado, riñones, corazón, páncreas bazo, timo), análisis de biometría hemática y química sanguínea, ninguno de ellos mostró evidencias de toxicidad, a excepción del análisis histopatológico de hígado, riñón y corazón, que revelaron lesiones de leves a moderadas, incluso en los animales tratados con las dosis más bajas realizadas en las pruebas aguda y subaguda. Sin embargo, el análisis histológico fue de utilidad para observar lesiones tempranas, causadas por los compuestos fenólicos presentes en el EHPC, aunque no representativo para observar disfunción hepática, renal o cardiovascular a nivel bioquímico. Los datos toxicológicos obtenidos de este estudio ayudarán a seleccionar las mejores dosis para futuros estudios.

**Palabras clave:** Pasto joven de cebada, Flavonoides, Dosis letal 50, NOAEL, ratas Sprague-Dawley.

## Summary

Young barley grass (YBG) (*Hordeum vulgare*), family Poaceae, has attracted attention nowadays for containing polyphenols, proanthocyanidins and flavonoids. The beneficial effects of polyphenols, mainly in *in vitro* tests, are described in the literature. However, little is said about the abuse of these components which could cause adverse effects, such as the pro-oxidative activity as a result of a high dose of the concentrated components of YBG. The objective of this work was to perform acute and subacute toxicity tests and thus show the safety in the oral administration of a hydroalcoholic extract of barley grass (HEBG) in a murine model. The YBG dry extract was resuspended in distilled water and administered orally, using an intragastric cannula at the respective doses according to the acute toxicity (guideline 425) and subacute toxicity (guideline 407) OECD studies. The oral lethal dose 50 (LD 50) of HEBG *Hordeum vulgare* was estimated at  $\geq 5000$  mg / kg. However, taking into account the possible cumulative effects after repeated oral administration, the doses selected in the subacute test were (250 and 500 mg / kg / day). The parameters to evaluate possible toxic effects were body weight, relative weight of the organs (liver, kidneys, heart, pancreas, spleen, thymus), hematic biometric and blood chemistry analyses, none of them showed evidence of toxicity, except for the histopathologic liver, kidney and heart analyses, which revealed mild to moderate lesions, even in animals treated with the lowest doses performed in the acute and subacute tests. However, the histological analysis was useful to observe early lesions, caused by the phenolic compounds present in HEBG, although it was not representative for observing liver, kidney or cardiovascular dysfunction at a biochemical level. The toxicological data obtained in the present study will help to select suitable doses for future studies.

**Key words:** Young barley grass, Flavonoids, Lethal Dose 50, NOAEL, Sprague-Dawley rats

## Dedicatorias

*Primero que nada quiero dedicar estas palabras a Dios, por darme la oportunidad de nuevos aprendizajes, tanto académicos como personales. Se que la conclusión de este posgrado se lo debo a Él, que siempre me recuerdo y seguira poniendo en mi mente “Esfuerzate y se valiente” fue esta frase la que rondo por mis pensamientos, en los momentos más difíciles, cuando sentía que continuar era imposible para mi.*

*A mi familia por su apoyo incondicional, por creer en mi y por sus consejos que fueron parte de nuevos aprendizajes.*

*A Ale por escuchar mis alegrías y tristezas, por darme una palabra de aliento cuando más lo necesitaba.*

## Agradecimientos

A la beca de formación académica, otorgada por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Al Dr. Roberto Augusto Ferriz, por permitirme ser parte del grupo de investigación y confiar en mi desde el primer día.

A la Dra. Ana Angélica Feregrino, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y proporcionar material para la realización de diferentes pruebas.

Al Dr. Aarón Kuri, por sus enseñanzas en la búsqueda de información y sus consejos en el laboratorio.

Al los Doctores Jorge Luis Chávez y Carlos Saldaña, por su valiosa colaboración en las revisiones de este trabajo y darle una mejor estructura.

Dr. Mauro Refugio Zamora Díaz quien proporcionó el material vegetal.

A la Dra. Paola Jazmín Aranda, por el apoyo en la realización del método de tinción con hematoxilina y eosina (HE). Su amor al arte y sus enseñanzas.

A la M en C. Maria de Jesús Guerrero Carillo, por el apoyo brindado en la interpretación de los análisis histopatológicos.

A MCNH. Francisco Josué López, por sus enseñanzas en el manejo de los animales de laboratorio.

A la MVZ, Verónica Patricia Andrade, por su apoyo en la parte experimental en el bioterio, por sus consejos y su disponibilidad para escuchar mis inquietudes.

A la Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola y M. en C. Mariela Camacho Barrón, por el apoyo en la realización de las pruebas bioquímicas en el Laboratorio de Nutrición Humana de la Facultad de Ciencias Naturales.

A todas las personas que de una u otra manera fueron parte de este proyecto, Gracias.

## Índice

Resumen .....	1
Summary .....	2
Dedicatorias .....	3
Agradecimientos.....	4
Índice.....	5
Índice de tablas .....	9
Índice de figuras.....	10
Índice de gráficas .....	11
I. INTRODUCCIÓN .....	12
II. ANTECEDENTES .....	14
2.1. Alimentos funcionales.....	14
2.2. Antioxidantes .....	15
2.2.1. Acción que ejercen los antioxidantes frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) .....	16
2.2.2. Efecto prooxidativos dependiente de la dosis de los antioxidantes exógenos.....	20
2.2.3. Estudios in vitro del papel doble de los antioxidantes exógenos .....	22
2.3. Fitoalexinas.....	22
2.4. Respuesta hormética.....	23
2.5. Efectos toxicológicos de las hiervas .....	26
2.6. Consumo y usos de la cebada .....	28
2.7. Composición química y propiedades biológicas del pasto de cebada .....	29
2.8. Efectos antinutricios o de toxicidad en el grano y hoja joven de cebada ....	32

2.9. Estudios pruebas <i>in vitro</i> de la hoja joven de cebada .....	32
2.10. Estudios pruebas <i>in vivo</i> del grano y pasto de cebada .....	34
2.11. Estudios clínicos en humanos .....	34
2.12. Modelo animal para pruebas de experimentación.....	35
2.12.1. Rata Sprague-Dawley .....	36
2.13. Toxicidad oral aguda .....	36
2.14. Toxicidad subaguda.....	37
2.15. Toxicocinética de los glúcidos flavonoides .....	37
III. JUSTIFICACIÓN .....	42
IV. HIPÓTESIS .....	43
V. OBJETIVOS .....	44
5.1. Objetivo general.....	44
5.2. Objetivos específicos.....	44
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
6.1. Aprobación bioética .....	45
6.2. Material vegetal .....	45
6.3. Obtención del extracto hidroalcohólico de pasto de cebada .....	45
6.4. Tipo de estudio y modelo animal .....	47
6.4.1. Estudio de toxicidad oral aguda .....	47
6.4.2. Estudio de toxicidad oral subaguda .....	50
6.5. Estudio de signos clínicos .....	52
6.6. Químicas sanguíneas y biometrías hemáticas.....	52
6.7. Análisis Histopatológicos .....	52



6.8. Análisis estadísticos .....	53
VII. RESULTADOS .....	54
7.1. Prueba de toxicidad aguda .....	54
7.1.1. Cambios en el peso corporal prueba aguda .....	54
7.1.2. Cambios en el consumo de alimentos y agua prueba aguda .....	55
7.1.3. Efecto sobre el peso relativo de los órganos en la prueba aguda .....	57
7.1.4. Efecto sobre parámetros de biometría hemática en la prueba aguda ..	58
7.1.5. Efectos sobre parámetros de química sanguínea en la prueba aguda.	59
7.1.6. Efecto sobre parámetros bioquímicos de función y lesión hepática en la prueba aguda .....	60
7.1.7. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre el hígado en la prueba aguda .....	61
7.1.8. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre el riñón en la prueba aguda .....	62
7.1.9. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre el corazón en la prueba aguda.....	63
7.2. Prueba de toxicidad subaguda .....	64
7.2.1. Cambios en el peso corporal prueba subaguda .....	64
7.2.2. Cambios en el consumo de alimento y agua prueba subaguda .....	65
7.2.4. Efecto sobre parámetros de biometría hemática en la prueba subaguda .....	69
7.2.5. Efectos sobre parámetros de química sanguínea en la prueba subaguda .....	71
7.2.6. Efecto sobre parámetros bioquímicos de función y lesión hepática en la prueba asubguda .....	73
7.2.7. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre el hígado en la prueba subaguda.....	75

7.2.8. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre el riñón .....	76
7.2.9. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre el corazón.....	77
VIII. DISCUSIÓN.....	78
IX. CONCLUSIONES.....	86
X. ANEXOS .....	87
10.1. Registro del peso prueba de toxicidad aguda .....	87
10.2. Registro de peso prueba de toxicidad subaguda .....	88
10.3. Estudio observacional /test de irwin en ratas modifica .....	89
10.4. Registro peso de órganos.....	90
XI. LITERATURA CITADA .....	91

## Índice de tablas

Tabla 1. Estudios <i>in vivo</i> sobre la bioactividad de distintas fitoalexinas .....	25
Tabla 2: Estudios <i>in vivo</i> sobre efectos toxicológicos de diferentes plantas.....	27
Tabla 3. Composición nutrimental de la hoja de pasto de cebada seca .....	31
Tabla 4. Estudios realizados del pasto de cebada <i>in vivo</i> .....	35
Tabla 5. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre el peso relativo de los órganos en la prueba de toxicidad aguda. ....	57
Tabla 6. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre parámetros de Biometría Hemática en la prueba de toxicidad aguda .....	58
Tabla 7. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre parámetros de química sanguínea en la prueba de toxicidad aguda .....	59
Tabla 8. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre parámetros de función y lesión hepática en la prueba de toxicidad aguda .....	60
Tabla 9. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre el peso relativo de los órganos en la prueba de toxicidad subaguda. ....	68
Tabla 10. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre parámetros de biometría hemática en la prueba de toxicidad subaguda.....	70
Tabla 11. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre parámetros de química sanguínea en la prueba de toxicidad subaguda.....	72
Tabla 12. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sobre parámetros de función y lesión hepática en la prueba subaguda.....	74

## Índice de figuras

Figura 1. Reacción antioxidante de compuestos endógenos y exógenos frente a especies reactivas de oxígeno. ....	18
Figura 2. Toxicocinética de los glucósidos flavonoides.....	39
Figura 3. Corte de hígado de ratas machos y hembras del grupo control y tratamiento dosis límite única de 5000 mg/kg del EHPC <i>Hordeum vulgare</i> . H&E, 40X. ....	61
Figura 4. Corte de riñones de ratas macho y hembra del grupo control y tratamiento dosis límite única de 5000 mg/kg del EHPC <i>Hordeum vulgare</i> . H&E, 40X. ....	62
Figura 5. Corte de corazón de ratas macho y hembra del grupo control y tratamiento dosis límite única de 5000 mg/kg del EHPC <i>Hordeum vulgare</i> . H&E, 40X. ....	63
Figura 6. Cortes de hígado de ratas machos y hembras del grupo control y tratamiento en dosis (250 y 500 mg/kg) repetidas por 28 días del EHPC de <i>Hordeum vulgare</i> . H&E, 40X. ....	75
Figura 7. Corte de riñones de ratas macho y hembra del grupo control y tratamiento en dosis (250 y 500 mg/kg) repetidas por 28 días del EHPC de <i>Hordeum vulgare</i> . H&E, 40X. ....	76
Figura 8. Corte del corazón de ratas macho y hembra del grupo control y tratamiento en dosis (250 y 500 mg/kg) repetidas por 28 días del EHPC de <i>Hordeum vulgare</i> . H&E, 40X. ....	77

## Índice de gráficas

Gráfica 1. Diagrama de decisiones prueba de toxicidad aguda.....	49
Gráfica 2. Diagrama de decisiones prueba de toxicidad subaguda .....	51
Gráfica 3. Peso en gramos (g) de ratas machos y hembras en la prueba de toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....	54
Gráfica 4. Efectos del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) en el consumo de alimento en la prueba de toxicidad aguda .	55
Gráfica 5. Efectos del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) en el consumo de agua en la prueba de toxicidad aguda.....	56
Gráfica 6. Peso en gramos (g) de ratas machos y hembras en la prueba de toxicidad subaguda del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ). .....	64
Gráfica 7. Efectos del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC ( <i>Hordeum vulgare</i> ) en el consumo de alimento en la prueba de toxicidad subaguda .....	65
Gráfica 8. Efectos del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> ) en el consumo de agua en la prueba de toxicidad subaguda .....	66

## I. INTRODUCCIÓN

Las hierbas medicinales (HM), como componente de la medicina tradicional, a ganado terreno en el mantenimiento de la salud, como prevención o tratamiento frente al aumento de diversas enfermedades crónicas, en todo el mundo como la diabetes mellitus, obesidad y sus comorbilidades asociadas, enfermedades cardiovasculares y cáncer (OMS, 2018), aunado a ello la escasez de fármacos eficaz para combatir enfermedades crónicas como el cáncer o infecciones resistentes a los medicamentos, la ciencia ha vuelto a centrar la atención en las hierbas medicinales, y las compañías farmacéuticas recurren cada vez más a las fuentes naturales como una posible fuente de nuevos tratamientos (Zahn et al., 2019).

En la actualidad el pasto joven de cebada (PJC) (*Hordeum vulgare* L.), familia Poaceae ha llamado la atención por contener polifenoles derivados del ácido fenólico, proantocianidinas y flavonoides (Ferrerres et al., 2009). Los efectos benéficos que desempeñan los polifenoles, se encuentran descritos en la literatura, principalmente en pruebas *in vitro*, sin embargo, se habla poco de los efectos adversos muchas veces tóxicos que también juega un papel importante en la salud, el efecto toxico muchas veces puede ser ocasionado por una dosis elevada de sus componentes y probablemente debido a sus propiedades pro-oxidativas (Murakami, 2014; Guldiken et al., 2018). Actualmente se venden productos elaborados a partir del PJC en diferentes presentaciones como tabletas y polvos, hasta el momento, son pocos los estudios que hablan sobre una posible toxicidad del pasto de cebada, ya que la mayoría se ha enfocado en sus efectos benéficos para la salud (Kubatka et al., 2016).

La teoría que se plantea en el presente trabajo con base en los reportes sobre las plantas medicinales y sus efectos benéficos vs. tóxicos, es que el pasto de cebada, cuando se consume en dosis adecuadas, puede considerarse seguro y proporcionar beneficios para la salud. Sin embargo, cuando existe un abuso en la dosis administrada, su seguridad no debe asumirse (Kapetanovic, 2013).

Para normatizar el consumo de este tipo de compuestos, es necesario realizar estudios que aprueben la seguridad para el consumo humano, Por ello el objetivo de este trabajo es realizar pruebas de toxicidad aguda y subaguda y así mostrar posibles efectos adversos, del consumo de pasto de cebada en un modelo *in vivo* de ratas Sprague-Dawley de ambos sexos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Alimentos funcionales

El término “alimentos funcionales” surge en Japón en la década de los años 80’s, cuando se iniciaron una serie de investigaciones, cuyo propósito fue conocer otras funciones de los alimentos, además de su principal función nutrimental (Durán C and Valenzuela B, 2010).

Existe una definición adoptada por la European Commission Concerted Action, menciona que un alimento funcional puede considerarse “funcional” si se demuestra satisfactoriamente que es benéfica a una o más funciones específicas en el cuerpo humano, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que sea relevante para mejorar el estado de salud y el bienestar y/o reducción del riesgo de enfermedades. Los alimentos funcionales deben ser alimentos y demostrar sus efectos en cantidades que se pueden consumir en la dieta, no son pastillas ni cápsulas, sino que forman parte de un patrón alimentario normal” (E. Action, 1999).

En base al incremento del consumo de alimentos funcionales, ha sido necesario tratar de regularlos, en Estados Unidos, la Food and Drug Administración se ha encargado de la regulación de alimentos funcionales, sin embargo, no están bien definidos por la ley (Ye et al., 2018). Japón regula y supervisa los alimentos funcionales, llamados "Alimentos con declaraciones de propiedades saludables" (Ye et al., 2018). En el caso de México las instituciones encargadas de regular los alimentos funcionales son La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la Federación Nacional de la Industria Herbolaria, Medicina Alternativa Tradicional y Naturista A.C. (FNIHMATN), las cuales firmaron un convenio en junio del 2018 de colaboración que tiene como objetivo principal establecer las acciones necesarias para contar con la regulación sanitaria que norme a los productos y plantas utilizadas por este sector, así como mejorar y actualizar los procesos técnicos y de capacitación continua (COFEPRIS, 2018).



La población japonesa sugieren que los alimentos funcionales se consuman como parte de la dieta y no en forma de suplementos (Goldberg, 1994). Según el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón, se han considerado doce amplias categorías de ingredientes para promover la salud humana: fibra dietética; oligosacáridos; alcoholes de azúcar; aminoácidos, péptidos y proteínas; glucósidos; alcoholes; isoprenos y vitaminas; colina; bacterias lácticas; minerales; ácidos grasos insaturados; y otros, por ejemplo, fitoquímicos y antioxidantes (Goldberg, 2012).

En la actualidad la demanda de alimentos funcionales con propiedades bioactivas es un desafío para la industria alimentaria. Se conoce que los alimentos de origen vegetal proporcionan beneficios a la salud humana, aun así son poco consumidos (Singh et al., 2018). El uso de productos naturales como los herbolarios se han planteado como una alternativa preventiva a medida que los productos naturales han ganado terreno como medicina de bajo costo y fácil acceso, para mejorar y mantener la salud de la población.

La comunidad médica y científica continúan trabajando y aportando la información necesaria y con bases en la evidencia científica de dichos productos (Yamaura et al., 2012).

## 2.2. Antioxidantes

Nuestros sistemas de defensa antioxidantes producidos fisiológicamente incluyen antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos (Bouayed and Bohn, 2010).

Los antioxidantes endógenos (enzimáticos) incluyen: Superóxido dismutasa (SOD): Es una enzima que promueve la desintoxicación del radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ); Catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx): enzimas que participan en la destoxificación de peróxidos (CAT contra  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y GPx contra ambos  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ROOH); Glutatión reductasa: enzima involucrada en la regeneración del glutatión; Tiorredoxina reductasa: enzima involucrada en la

protección contra la oxidación de proteínas y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: enzima involucrada en la regeneración de NADPH (Bouayed and Bohn, 2010).

Los Antioxidantes endógenos (no enzimáticos), actúan como agentes reductores intracelulares, ejemplo: Glutación (GSH), ácido úrico, ácido lipoico, NADPH, coenzima Q, albúmina, bilirrubina (Bouayed and Bohn, 2010).

Antioxidantes exógenos obtenidos principalmente por la dieta, incluyen Vitaminas: C y E; Elementos traza: zinc y selenio; Carotenoides ( $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína); Ácidos fenólicos (ácidos clorogénicos, ácido gálico, ácido cafeico); Flavonoides (quercetina, proantocianidinas, catequinas, genisteina, daidzeina, naringenina, luteolina y apigenina) (Bouayed and Bohn, 2010).

#### 2.2.1. Acción que ejercen los antioxidantes frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS)

En condiciones fisiológicas el organismo busca mantener un equilibrio entre la oxidación y la antioxidación para mantener condiciones homeostáticas en los organismos vivos, mediante antioxidantes endógenos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutación peroxidasa (GPx), glutación (GSH) y exógenos como la vitamina C, la vitamina E, carotenoides y polifenoles, siendo la dieta la fuente principal (Bouayed and Bohn, 2010).

La exposición de un organismo a múltiples factores estresantes, ambientales o biológicos, como a radiación UV, patógenos como los virus, alérgenos, alimentación inadecuada y diversos contaminantes como el humo del cigarro entre otros, pueden promover la generación de ROS, son productos biológicos secundarios en el metabolismo mitocondrial de la cadena transportadora de electrones (Opie, 2014). Estas especies reactivas pertenecen a dos tipos de moléculas: especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), tales como aniones superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), radicales alcoxilo ( $\bullet\text{RO}$ ) y peroxirradicales ( $\bullet\text{ROO}$ ) y anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), su

característica general es que poseen uno o más electrones no apareados muy reactivos (Bouayed and Bohn, 2010; Lü et al., 2010).

Los ROS se generan fisiológicamente y en la mayoría de los casos para la defensa de los organismos frente a patógenos por medio de los glóbulos blancos, además actúan en las cascadas de señalización intracelular, activando factores de transcripción antioxidantes y antiinflamatorios (Vazquez-Medina, 2018). En otros estudio se ha visto que el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno actúan como mitógenos, promoviendo la velocidad de replicación del ADN y la proliferación celular (Valko et al., 2007). Sin embargo, el desequilibrio, es decir un aumento o la disminución de ROS provoca la oxidación de estructuras biológicas que desencadenan la aparición o la progresión de diversas enfermedades donde el estrés oxidativo juega un papel importante, como es el caso del cáncer (Galadari et al., 2017).

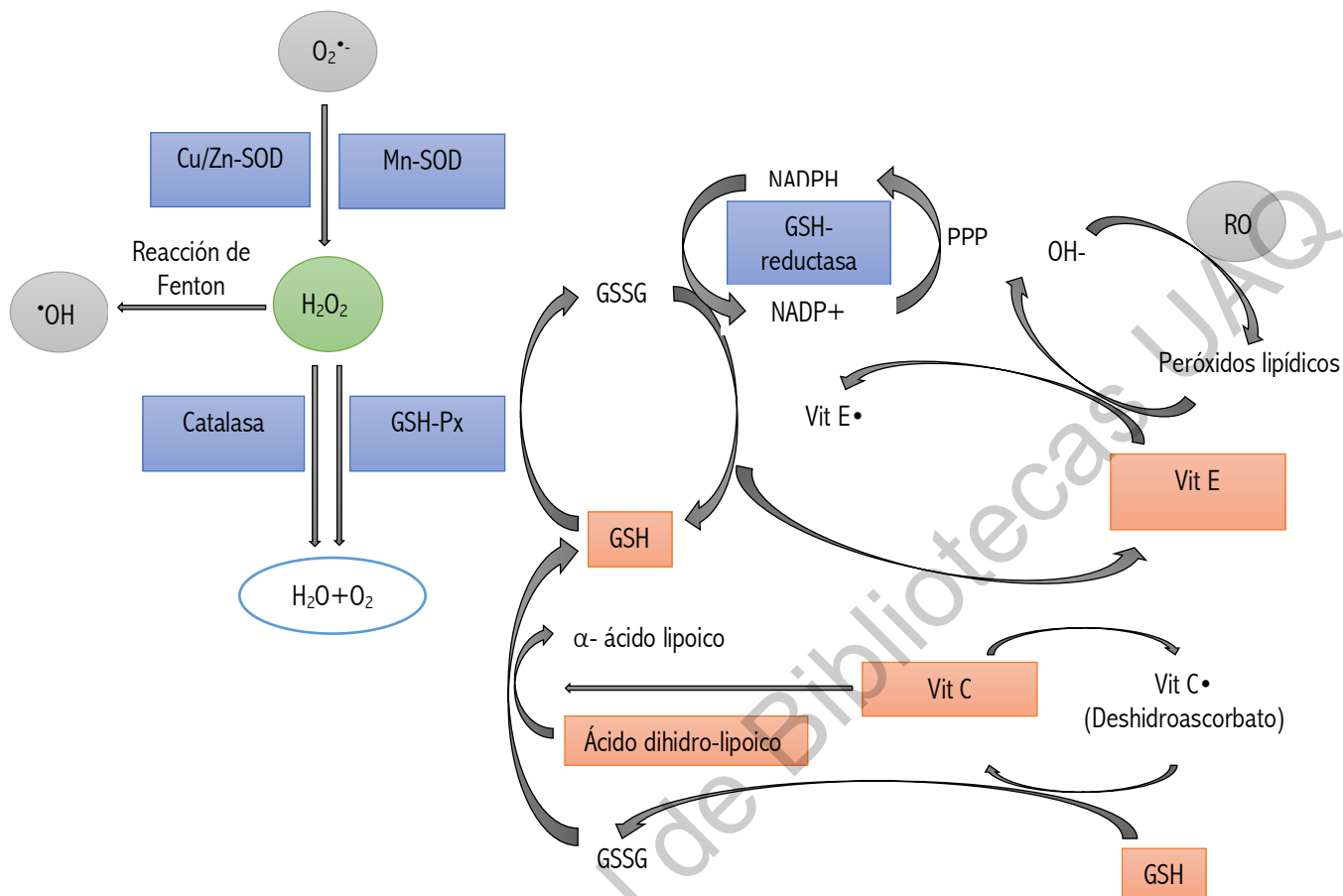


Figura 1. Reacción antioxidante de compuestos endógenos y exógenos frente a especies reactivas de oxígeno.

Modificado de (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013)  
 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/51788gr1gr1>

El agente oxidante (figura 1), radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), se genera a partir de la vía de producción de energía mitocondrial (Ighodaro and Akinloye, 2018). El ( $O_2^{\bullet-}$ ), se encuentra formado por un electrón de oxígeno reducido, que tendrá que eliminarse. El radical superóxido, se une a un electrón, lo que conduce a la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), El cual es tóxico para los tejidos y células del cuerpo (Ighodaro and Akinloye, 2018). Entre las enzimas que catalizan esta reacción se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la SOD mitocondrial y bacteriana contiene manganeso (Mn-SOD), mientras que SOD citosólica es un dímero que contiene Cobre y Zinc (Cu/Zn-SOD). (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013).

El  $H_2O_2$  en presencia de  $Fe^{2+}$  puede ser catalizado por metales de transición, y transformarse en un radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), Reacción de Fenton ( $H_2O_2 + e^- \rightarrow \bullet OH$ ), que participa en reacciones de la cadena de radicales libres. Por lo cual, las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), actúan en una reacción adicional, que convierte el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno ( $H_2O+O_2$ ) (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013).

El glutatión peroxidasa (GSH-Px), que se encuentra en la mitocondria, se oxida a disulfuro de glutatión (GSSG), causando daños al oxidar los tioles de las proteínas (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

El glutatión disulfuro se reduce por la glutatión reductasa (GSH-reductasa) utilizando hidrógeno de NADPH, que se oxida a  $NADP^+$ . El glutatión reducido (GSH), debido a la presencia del grupo tiol de la cisteína, ahora reacciona con los radicales libres de proteínas y otras macromoléculas, restaurándolas a la forma reducida (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013).

El NADPH se genera en la primera fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (PPP). En esta fase, la glucosa-6-fosfato se deshidrogena por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa a ribulosa 5-fosfato, y al mismo tiempo dos moléculas de  $NADP^+$  se reducen a NADPH (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

La catalasa, se encuentra principalmente en los peroxisomas, regenerando el  $H_2O_2$ , que se difunde desde la mitocondria al citosol, convirtiéndolo en ( $H_2O+O_2$ ) (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013).

También intervienen los antioxidantes no enzimáticos, dietéticos como la vitamina C y el ácido  $\alpha$ -lipoico que apoyan la regeneración de GSSG de nuevo en GSH, por medio de la donación de un hidrógeno. La vitamina E por otro lado elimina los peróxidos lipídicos y termina las reacciones de cadena oxidativa como donante

de hidrógeno. La forma no oxidada de la vitamina E puede ser reciclada por la vitamina C y el glutatión (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2013).

### 2.2.2. Efecto prooxidativos dependiente de la dosis de los antioxidantes exógenos

Los antioxidantes exógenos desempeñan un papel clave en el mantenimiento del equilibrio redox, entre la oxidación y la antioxidación en los sistemas vivos (Valko et al., 2007).

Muchas investigaciones se han centrado en estudiar la actividad antioxidante de los fitoquímicos (Benedet et al., 2007; Kamiyama and Shibamoto, 2012). Sin embargo aunque la actividad antioxidante de los fitoquímicos es bien conocida, poco se habla de su actividad prooxidativa que puede presentarse en ciertas condiciones, como dosis elevadas o en presencias de iones metálicos, por lo cual los efectos beneficios o perjudiciales dependerán de su concentración (Bouayed and Bohn, 2010).

Por ejemplo se ha demostrado que los compuestos fenólicos en altas concentraciones puede generar especies reactivas de oxígeno por autooxidación predisponiendo a los fenoles a la generación de peróxido de hidrógeno y al comportamiento prooxidante (Ochiai et al., 1984; Kapetanovic, 2013).

Los efectos prooxidantes de los compuestos fenólicos también se han observado en presencia de metales de transición hierro y cobre, debido a su capacidad reductora y formadora de quelatos, ya que estos son componentes importantes en las plantas (Azam et al., 2004). El poder reductor de los antioxidantes también puede afectar los iones metálicos, especialmente  $Fe^{3+}$  y  $Cu^{2+}$ , incrementando su capacidad para formar concentraciones de radicales hidroxilo altamente reactivos, que se originan de los peróxidos a través de la reacción de Fenton (Valko et al., 2007).

Los antioxidantes fenólicos al donar electrones, pueden transformarse en radicales fenoxilo menos reactivos, ya que se pueden estabilizar por la deslocalización de electrones no apareados alrededor del anillo aromático (Bouayed and Bohn, 2010). Se ha demostrado que la oxidación mediada por la peroxidasa de los flavonoides que contienen el anillo del catecol B da como resultado la formación de semiquinona y quinona, estos metabolitos pueden actuar como electrófilos que se unen a macromoléculas celulares y pueden resultar en la producción de ROS a través del ciclo redox (Hanem M. Awad et al., 2001).

Los efectos de los compuestos fenólicos no solo abarcan su actividad benéfica o nociva como antioxidantes, ya que como se menciono anteriormente, también participan en la activación de vías de señalización celular, por ejemplo, el factor nuclear kappa B (NFkB) y el mitógeno proteína quinasa activada (MAPK) o mediante la unión a los sitios de unión a ATP de un gran número de proteínas, incluida la ATPasa mitocondrial, la ATPasa de la membrana plasmática de calcio, la proteína quinasa A, la proteína quinasa C y la topoisomerasa (Williams et al., 2004). Las acciones inhibitorias o estimulantes en estas vías pueden afectar la función celular al alterar el estado de fosforilación de las moléculas diana y / o al modular la expresión génica (Williams et al., 2004).

Como resultado de la activación de vías celulares particulares incluyen procesos inflamatorios, metabolismo de nitrógeno (estrés nitrosativo que resulta de la producción excesiva de especies de nitrógeno reactivas) y estrés de carbonilo (que resulta de la acumulación excesiva de compuestos de dicarbonilo reactivos), todos ellos promotores del estrés oxidativo (Valko et al., 2007). Se ha demostrado un aumento en la producción de mediadores proinflamatorios factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interleucina-8 (IL-8)] (Bouayed and Bohn, 2010).

Estudios han demostrado que la activación de la proteína de señalización de MAP quinasa puede ocurrir a concentraciones bajas de compuestos fenólicos como los flavonoides (nanomolar a micromolar bajo), lo que podría conducir a la

expresión génica mediada por el elemento de respuesta antioxidante (ARE), incluida la desintoxicación en fase II enzimática, como la UDP-glucuronosiltransferasa. Por lo tanto, el aumento de tales enzimas podría conducir a una eliminación más rápida y eficiente de los agentes carcinógenos en el cuerpo. Sin embargo a concentraciones más altas de flavonoides pueden conducir a una activación sostenida de las MAP quinasas, como la JNK, lo que daría como resultado una inducción de apoptosis (Williams et al., 2004).

### 2.2.3. Estudios in vitro del papel doble de los antioxidantes exógenos

Un estudio realizado en líneas celulares de mamíferos observó que una dosis baja de quercetina activo la ruta MAPK (ERK2, JNK1 y p38), lo que resultó en la expresión de genes de supervivencia (c-Fos, c-Jun) y genes defensivos (enzimas detoxificantes de fase II, glutatión S-transferasa, quinona reductasa), induciendo mecanismos de supervivencia y de protección (respuesta homeostática). Sin embargo, el aumento de las concentraciones de estos compuestos activo adicionalmente las rutas de las caspasas, promoviendo la apoptosis y promueve citotoxicidad, Un incremento adicional a las concentraciones llevará a una muerte celular necrótica inespecífica (Kong et al., 2000).

### 2.3. Fitoalexinas

Se cree que muchos de los productos químicos beneficiosos en los alimentos de origen vegetal (verduras, frutas y plantas) evolucionaron como toxinas (para la protección contra agentes dañinos como los insectos y otros depredadores) que, en dosis subtóxicas, en un organismo activan las vías adaptativas de respuesta al estrés celular (Mattson and Cheng, 2006). Dentro de los compuesto con dichas características están, las fitoalexinas son producto del metabolismo secundario de las plantas de bajo peso molecular biosintetizados de novo por las plantas en respuesta a diversos factores estresantes inductores bióticos (insectos, hongo, bacterias, virus) y abióticos (temperaturas extremas, radiación, luz UV) (Pedras and Ahiahonu, 2005; Agathokleous et al., 2019).



Los polifenoles son ejemplo de fitoalexinas ya que son sintetizados por una variedad de especies de plantas en respuesta a factores estresantes (Ejike et al., 2013; Guo et al., 2018). Los estudios sobre el análisis fenólico del pasto de cebada revelan la presencia principalmente de glucosidos flavonoides en esta planta, gran parte de los compuestos descritos se derivan de saponarina (isovitexin-7- O - glucósido ) y lutoarina (isoorientin-7- O- glucósido) (Ferrerres et al., 2008; Ferreres et al., 2009).

#### 2.4. Respuesta hormética

Los estudios de Paracelso en el siglo XVI, dilucidaron que la toxicidad de una sustancia depende de la dosis y que las dosis bajas de sustancias tóxicas pueden tener efectos beneficios para la salud (Poschenrieder et al., 2013).

El termino hormesis se ha utilizado principalmente en toxicología humana y medicina para describir los efectos estimulantes de sustancias tóxicas a dosis bajas. La respuesta estimulante puede presentarse como “un proceso compensatorio después de una interrupción inicial en la homeostasis” (Poschenrieder et al., 2013). La hormesis hace referencia a un proceso en el que la exposición a dosis bifásicas, es decir a una dosis baja de una gente que es tóxico a dosis más altas induce un efecto beneficioso sobre un organismo. El proceso adaptativo en un organismo que responde a un nivel bajo de estrés, aumenta su capacidad para resistir un estrés más severo que de otro modo podría ser perjudicial (Mattson and Cheng, 2006).

La evidencia sugiere que compuestos como los carotenoides pueden actuar como antioxidantes, cuando se consumen en la dieta, ya que se presentan en dosis bajas, Sin embargo, en el consumo de suplementos a dosis más altas también pueden actuar como prooxidantes (Ademowo et al., 2019).

Las fitoalexinas como los flavonoides presentes en el pasto de cebada, pueden causar la señalización redox, pero también, pueden causar daño oxidativo o estrés oxidativo si sus concentraciones son elevadas. Existe una respuesta

dependiente a la dosis dentro de la cual los antioxidantes de la dieta pueden mejorar la expresión de genes protectores, posiblemente induciendo estrés, y, por lo tanto, pueden ser importantes para promover la duración de la vida y la salud (Ademowo et al., 2019).

Los estudios *in vitro* demuestran la actividad que ejercen las fitoalexinas como los polifenoles frente a la actividad antioxidante y citoprotectora (tabla1). Sin embargo, también pueden tener actividades prooxidantes en ciertas condiciones, como en dosis altas o en presencia de iones metálicos (Azam et al., 2004).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Tabla 1. Estudios *in vivo* sobre la bioactividad de distintas fitoalexinas

Compuesto	Líneas celulares	Dosis	Bioactividad	Resultados	Referencia
<b>Quercetina</b>	Células humanas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.	0.7 $\mu$ M	Anticáncer	La combinación de Doxorubicin (Dox) y la dosis no tóxica de quercetina promovió la acumulación de Dox en células de cáncer de mama.  Regulando a la baja la expresión de los transportadores ABC de flujo de salida que incluyen P-gp, BCRP y MRP1, eliminando así las células cancerosas.	(Li et al., 2018)
<b>Flavononas, eriocitrina y hesperidina derivado de Albedo cítrico</b>	Linfocitos	20, 25 y 50 $\mu$ g / ml de extracto	Actividad antioxidante y Citoprotector.	Capacidad de disminuir la muerte celular y el daño oxidativo, con un clara relación dosis-respuesta.	(Smeriglio et al., 2019)
<b>Flavonoides de tipo 4'-O -metilo, acetina, diosmetina y kaempferida</b>	Células de melanoma B16F10	10 $\mu$ M	Inducción de la síntesis de melanina	Inducción de la síntesis de melanina en las células B16F10. Su actividad desencadena la regulación positiva de la tirosinasa, que es inducida por la activación de la vía de transducción de señales CREB.	(Horibe et al., 2013)
<b>Resveratrol</b>	Células de fibroblastos de piel humana	0,01%, 0,001% 0,0001%	Antioxidante	Los resultados mostraron una reducción altamente significativa (P <0,001) dependiente de la dosis de ROS reguladas al alza por peróxido de hidrógeno intracelular mediante resveratrol a diferentes concentraciones.	(Jagdeo et al., 2010)
<b>Capsaicina</b>	Líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, SKBR-3, MDA-MB231, T47D y BT-474)	$5 \times 10^{-5}$ M  $2 \times 10^{-4}$ M	Anticáncer	La capsaicina inhibe la proliferación e induce la detención del ciclo celular dependiente del tiempo y la dosis en células de cáncer de mama.	(Thoenissen et al., 2010)

## 2.5. Efectos toxicológicos de las hierbas

Existe la creencia por parte de la población, que los productos de origen natural como las plantas carecen de efectos adversos o tóxicos a diferencia de los fármacos utilizados en la medicina convencional, pero su eficacia, toxicidad y especificaciones en las dosis rara vez se han probado, por ello la necesidad obtener información que valide su seguridad y especificaciones de su uso (Unuofin et al., 2018). Para ello los medicamento herbales deberían seguir los lineamientos de investigación de los fármacos sintéticos (Olaniyan et al., 2016).

Se ha planteado que los beneficios a la salud de los fitoquímicos en hierbas son dependientes de la dosis de administración, cuando la dosis son elevadas los efectos benéficos podrían revertirse a efectos tóxicos, incluidos efectos carcinogénicos, neurotóxicos, genotóxicos, teratogénicos, citotóxicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos y gastrointestinales (Guldiken et al., 2018).

A continuación se presenta una serie de estudios sobre los efectos toxicológicos *in vivo* de diferentes plantas (tabla 2). Es importante mencionar que se deba tomar precauciones al elegir alimentos o productos hechos a base de ingredientes naturales para prevención o tratamiento de diversas patologías.

En general los alimentos vegetales se consideran mas seguros para la salud en comparación de productos elaborados a partir de ingredientes naturales por las dosis altas y aisladas, como las presentes en los suplementos (Bouayed and Bohn, 2010).

Algunos factores a tomar en cuenta para obtener efectos benéficos de los alimentos vegetales son: (1) Concentraciones adecuadas generalmente bajas de nutrimentos y metabolitos secundarios como las fitoalexinas presentan de forma natural en las matrices de alimentos naturales y (2) Las acciones aditivas o sinérgicas de los perfiles de mezcla compleja de fitoalexinas y nutrientes (Bouayed and Bohn, 2010).

Tabla 2: Estudios *in vivo* sobre efectos toxicológicos de diferentes plantas

Fuente	Organismo y tipo de prueba	Dosis (mg / kg de peso corporal)	Efecto toxicológico	Referencia
<i>Nelsonia campestris</i> (hierba) Extracto metanólico y acuoso.	Ratas (ambos sexos) 1) Prueba aguda 2) Prueba subaguda	1) 10, 100, 1000, 1600, 2900 y 5000 2) 100, 300 y 600	1) LD <sub>50</sub> mayor que 5000 mg / kg de peso corporal. 2) Necrosis hepática y renal	(Olaniyan et al., 2016)
<i>Pericampylus glaucus</i> (L-am.) Merr. (hojas) Extracto etanólico	Ratones BALB / c 1) Prueba aguda 2) Prueba subaguda	1) 2 000 y 4 000 2) 600 y 1000	1) Sedación, letargo y somnolencia 2) Elevación de las las enzimas transaminasas (AST) y (ALT) Posible lesión hepática.	(Kifayatullah et al., 2015)
<i>Saccharum MunjaRoxb</i> (Raíces) Extracto etanólico acuoso	Ratones albinos (hembra) Prueba aguda	Dosis límite 2000	LD <sub>50</sub> es mayor que 2000 mg / kg. Necrosis renal y hepática Elevación de ALT, AST, proteínas totales y niveles de globulina	(Saleem et al., 2017)
Galato de epigalocatequina (EG CG) Ingrediente activo de Té verde	Ratones albinos suizos hembra Prueba (14 días)	108, 67.8, 21.1 y 6.6	Dislipidemia y hepatotoxicidad	(Ramachandran et al., 2016)
<i>Vernonia mespilifolia</i> Less. (Planta) Extracto acuoso	Ratas Wistar 1) Prueba aguda 2) Prueba subaguda	1) 2000 y 5000 2) 200, 400 y 600	1) LD <sub>50</sub> es mayor que 5000 mg / kg de peso corporal. 2) No causó cambios significativos en Las secciones histológicas	(Unuofin et al., 2018)
<i>Terminalia citrina</i> (hojas) Extracto de metanol	Ratas Sprague Dawley 1) Prueba aguda 2) Prueba subaguda	1) 200, 400, 800, 1600, 3200 2) 250, 500 y 1 000	1) Seguro hasta un nivel de dosis de 3200 2) El examen histológico no reveló cambios en la arquitectura de los órganos.	(Das et al., 2015)

## 2.6. Consumo y usos de la cebada

La cebada pertenece a la familia Poaceae y al género *Hordeum*. La forma más común de cebada es *Hordeum vulgare* (Sullivan et al., 2013). La cebada (*Hordeum vulgare*) es uno de los cultivos más antiguos y se cultivan en la actualidad en todo el mundo (Idehen et al., 2017). Los restos arqueológicos de granos de cebada sugieren su existencia en la Media Luna Fértil de Medio Oriente (lo que comprende Egipto, Israel, Cisjordania, la Franja de Gaza y Líbano, así como partes del río Jordán, Siria, Irak, el sureste de Turquía y el suroeste de Irán), hace alrededor de 10.000 años (Badr et al., 2000).

Entre los cereales de mayor consumo en todo el mundo, la cebada ocupa el cuarto lugar después del maíz, el arroz y el trigo con un 12 % del total de cereales cultivados (Idehen et al., 2017). La cebada en comparación de otros cereales se caracteriza por su fácil adaptación a diversos climas extremos, invierno, sequía y a la maduración temprana, en general es económico de cultivar (Idehen et al., 2017). En países como Japón, Corea y China, la cebada es utilizada para la elaboración de diferentes preparaciones como pan, pasteles y bebidas, Además en Japón se elabora una bebida popular llamada “Aojiru”, conocida como jugo verde elaborado con hojas jóvenes de cebada (Ferrerres et al., 2009). Aproximadamente dos tercios de la cebada cultivada se utiliza para la alimentación animal, lo que representa un 65 % de cebada, Un tercio para el malteado esto es un 33% y aproximadamente solo el 2% para consumo humano (Sullivan et al., 2013).

En México durante el periodo 1995-2000, un 60% de la cebada cultivada se destinó a la industria cervecera; 34% como alimento para ganado; un 3% se estima en desperdicios; el 2% para semillas y solo 1% para consumo humano (SAGARPA, 2012).

## 2.7. Composición química y propiedades biológicas del pasto de cebada

La cebada es rica en compuestos antioxidantes, derivados del ácido fenólico, proantocianidinas, quinonas y flavonoides (Ferrerres et al., 2009). Se sabe que estos compuestos en las plantas de cebada pueden variar de acuerdo a diversos factores uno de ellos es el tipo de especie, otra la procedencia y condiciones geográficas, el mes de cosecha y la madurez de la planta (Oliveira et al., 2007). Sin embargo un estudio realizado en las hojas de cebada en diferentes orígenes, con condiciones climáticas similares, mostro que el contenido de compuestos fenólicos no vario de forma cualitativa, pero si cuantitativa (Ferrerres et al., 2009). Los componentes fenólicos en las plantas actúan como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atractores visuales y repelentes de insectos, como componentes estructurales de las paredes celulares de las plantas, para mantener su rigidez y fuerza (Pietta, 2000; Mathew and Abraham, 2004).

Las propiedades biológicas de los flavonoides en el consumo humano a través de los alimentos, se deben a su capacidad para reducir la formación de radicales libres y eliminar los radicales libres, en diversos estudios estas propiedades se han relacionado con acciones antialérgicas, antivirales, antiinflamatorias y vasodilatadoras (Pietta, 2000). Se ha dado mayor importancia a la actividad antioxidante y sus efectos preventivos y de tratamiento en enfermedades relacionadas a estrés oxidativo, como son el cáncer, la aterosclerosis, lesión isquémica y enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson y Alzheimer (Matteo Bonoli et al., 2004; Ferrerres et al., 2009).

En un estudio se analizó la presencia de compuestos polifenólicos en diferentes partes de la planta de cebada (semillas, tallos, hojas y aristas), Se observó una diversidad mayor y contenido de estos compuestos en las hojas, sin embargo, los perfiles fenólicos fueron muy particulares comparados con la semilla. En este mismo estudio se encontró una mayor cantidad de flavonoides vs ácidos fenólicos, (posiblemente debido a su efecto fotoprotector en la planta) (Allen et al., 1998; Ferrerres et al., 2009). Encontraron 12 flavonoides y 3 ácidos fenólicos, siendo,

isoorientin-7-O-glucosido (lutarina) el compuesto principal de las hojas de cebada (Ferrerres et al., 2009). Un estudio mostró que el lutarina podría tener un efecto protector contra la aterosclerosis causada por la oxidación de lipoproteínas en plasma sanguíneo (Benedet et al., 2007). Otro compuesto flavonoide encontrado en el pasto de cebada fue la saponarina, que mostro un efecto antioxidante casi del 100 % a comparación del  $\alpha$ -tocoferol que no mostro poca actividad antioxidante frente a la peroxidación lipídica de  $\omega$ -3 ácidos grasos poliinsaturados (Kamiyama and Shibamoto, 2012). Por lo tanto, las hojas de cebada podrían ser aprovechadas para el consumo humano en la dieta como una fuente de compuestos protectores, que podrían usarse, por ejemplo, para aprovechar los desechos resultantes de la obtención de bebidas alcohólicas.



Tabla 3. Composición nutrimental de la hoja de pasto de cebada seca

Contenido	Media $\pm$ DS	Rango
Calorías (KJ/100 g)	1333 $\pm$ 315	1055~1607
Sodio (mg/100 g)	328.2 $\pm$ 288.4	50~833
Carbohidratos (%)	57.9 $\pm$ 5.1	55.2~64.0
Fibra (%)	29.5 $\pm$ 15.5	2.0~39.1
Proteína (%)	27.3 $\pm$ 4.3	19.9~34.1
Grasa (%)	4.57 $\pm$ 1.31	2.30~6.03
Vitamina A (mg/100 g)	20.5 $\pm$ 4.7	14.4~25.0
Vitamina B1 (mg/100 g)	0.61 $\pm$ 0.40	0.05~1.19
Vitamina B2 (mg/100 g)	1.56 $\pm$ 0.65	0.24~2.41
Vitamina B3 (mg/100 g)	7.18 $\pm$ 7.39	2.20~16.49
Vitamina B6 (mg/100 g)	1.12 $\pm$ 0.97	0.18~2.58
Vitamina B12 (mg/100 g)	1.16 $\pm$ 0.26	0.81~1.40
Vitamina C (mg/100 g)	251.6 $\pm$ 239.1	19.4~548.0
Vitamina E (mg/100 g)	15.0 $\pm$ 14.1	6.1~46.1
Calcio (Ca, mg/100 g)	479.4 $\pm$ 172.5	330~819
Fósforo (P, mg/100 g)	380.4 $\pm$ 60.7	283~430
Cromo (Cr, mg/100 g)	0.14 $\pm$ 0.06	0.09~0.21
Cobre (Cu, mg/100 g)	1.66 $\pm$ 1.25	0.72~3.50
Azufre (S, mg/100 g)	305.5 $\pm$ 6.4	301~310
Hierro (Fe, mg/100 g)	23.3 $\pm$ 10.1	10.0~41.2
Magnesio (Mg, mg/100 g)	183.2 $\pm$ 46.0	110~247.1
Manganeso (Mn, mg/100 g)	3.94 $\pm$ 1.56	2.3~5.4
Molibdeno (Mo, mg/100 g)	0.048 $\pm$ 0.006	0.042~0.053
Potasio (K, mg/100 g)	3384 $\pm$ 649	2400~4300
Zinc (Zn, mg/100 g)	3.43 $\pm$ 1.36	1.80~5.68
Clorofila (mg/100 g)	542.9 $\pm$ 88.2	438~662
Superóxido dismutasa (U/g)	440.0 $\pm$ 39.8	416~1382
Catalasa (U/g)	839.0 $\pm$ 142.7	675~935
Lutonarin (mg/100 g)	342.9 $\pm$ 92.3	200.0~540.0
Saponarin (mg/100 g)	726.2 $\pm$ 250.1	300.0~1260.0
Polifenoles totales (%)	1.06 $\pm$ 0.02	1.03~1.08
Flavonoides totales (mg/100 g)	526.2 $\pm$ 52.7	487.5~593.4
ABTS (RC50, $\mu$ g/mL)	53.3 $\pm$ 9.1	41.8~63.8
GABA (mg/100 g)	150.5 $\pm$ 24.2	125~183
Triptófano (mg/100 g)	736.7 $\pm$ 569.0	290~1400

Modificada de (Zeng et al., 2018)

## 2.8. Efectos antinutricios o de toxicidad en el grano y hoja joven de cebada

Trabajos realizados con un extracto metanólico de la semilla de *H. vulgare*, en donde se analizó el efecto agudo, siguiendo directrices de la OCDE-425, 2001, obtuvieron una dosis de letalidad de 5000 mg/kg y una décima parte de la dosis máxima del extracto de 500 a 300 mg/kg fue seleccionada para la evaluación en la actividad hepatoprotectora (Purvi A. Shah, Mihir Y. Parmar, Vaishali T. Thakkar, 2009).

Kubatka y sus colaboradores en el 2016, administró dosis a dos concentraciones de 3 g / kg (0,3%) y 30 g / kg (3%) del pasto de cebada (*H. vulgare* L., phylloma), observó que la dosis más alta fue menos eficaz contra la carcinogénesis y que esto podría ser explicado por el exceso de dosis que conduce a la toxicidad en el animal o un aumento en el metabolismo y eliminación. Sin embargo, otros estudios que utilizaron la misma dosis mostraron efectos antineoplásicos de *Chlorella* y cáscaras de frutas en una forma dosis dependiente. Por ello el interés de determinar dosificaciones adecuadas en modelos *in vivo*, que tengan efecto benéfico a la salud, sin causar efectos adversos como la toxicidad, ya que la dosis es específica entre las diferentes sustancias que contiene los alimentos de origen vegetal.

## 2.9. Estudios pruebas *in vitro* de la hoja joven de cebada

En el laboratorio de Biología Celular en la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, Razo y colaboradores (2013), determinó el efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama MCF-7 con la finalidad de obtener una curva dosis-respuesta y se observó que un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada liofilizado (EHPCL), presentó un efecto citotóxico en función de la concentración, siendo la concentración de 100 µg de PCL/ml la que provocó una disminución en la proliferación del 94% en las células de cáncer de mama MCF-7 comparadas con las que no fueron tratadas.

Estudios realizados por (Soto et al., 2018), cuantificaron fenoles totales, flavonoides, taninos y capacidad antioxidante de un pasto fresco, seco y liofilizado de cebada de la variedad Esmeralda (*Hordeum vulgare*), los resultados mostraron que el EHPCL contiene polifenoles y capacidad antioxidante en sus diferentes presentaciones, lo que indica que pueden ser utilizados en diferentes pruebas relacionadas con procesos oxidativos como en diabetes, cáncer u otras enfermedades crónicas no transmisibles, ofreciendo beneficios a la salud.

(Jacobó et al., 2018) analizaron el efecto antiproliferativo de un extracto de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*), observaron que una CI50 de 100 µg/ml en línea celular no transformadas (fibroblastos humanos), de cáncer de próstata PC-3, y cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB 231, disminuyó el porcentaje de proliferación celular de manera significativa ( $p < 0.05$ ), esto resultó mostraron la sensibilidad antiproliferativa del pasto de cebada en modelos de cáncer *in vitro*.

Resultados parecidos fueron reportados en un estudio en el que utilizaron un extracto de hierba de cebada (*Hordeum vulgare* L.) como muerte celular apoptótica de las células de cáncer de mama y próstata al aumentar los niveles de ROS intracelular (Woo et al., 2017). Para aclarar el mecanismo de actividad antiproliferativa, del pasto de cebada, se realizó un ensayo en una línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), inhibió significativamente la viabilidad de la Células MCF-7 de una manera dependiente de la dosis y el tiempo a concentraciones de 0.0625–1 mg / ml, Como consecuencia, se observó una reducción significativa de la población de células en fase G0 / G1 y G2 / M (Kubatka et al., 2016).

## 2.10. Estudios pruebas *in vivo* del grano y pasto de cebada

El conjunto de los fitoquímicos presentes en la hoja joven de cebada (*H. vulgare* L., phylloma), contribuyen a los efectos benéficos, en lugar de uno solo, por ello se han realizado estudios con modelos animales. Para revelar dichos efectos, en un estudio se indujo carcinogénesis mamaria en ratas hembra Sprague-Dawley, se observó que inhibió el desarrollo de tumores mamarios de rata en una dosis independiente, en la dosis más baja de 3 g / kg (0,3%), a comparación de la dosis alta de 30 g / kg (3%), fue menos eficaz contra la carcinogénesis (Kubatka et al., 2016).

Aumento del volumen fecal atribuible al contenido de fibra insoluble que contiene el pasto de cebada (Ikeguchi et al., 2014).

## 2.11. Estudios clínicos en humanos

Estudios en humanos donde se analizó el efecto de un extracto de la hoja de cebada joven en el perfil de lípidos en plasma y su susceptibilidad a la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), en fumadores y no fumadores con hiperlipidemia, los cuales recibieron 15 g / día del extracto de hoja de cebada joven. Se obtuvo una disminución de los valores plasmáticos de colesterol total y LDL y un aumento de HDL, para ambos grupos. También reveló que las acciones antioxidantes posteriores a la ingestión del pasto de cebada, fueron 70.2% en no fumadores y 37.2% en fumadores (Yu et al., 2004).

Tabla 4. Estudios realizados del pasto de cebada *in vivo*.

Titulo	Modelo	Tipo de tratamiento	Dosis Administrada	Vía de administración	Tiempo de administración	Autor
Antidepressant-like effects of young green barley leaf ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) in the mouse forced swimming test	Ratones de seis semanas de edad	Extracto de las hojas para producir un polvo seco, disolvió en agua destilada.	(400 o 1000 mg / kg)	Vía oral	Dos días	(Yamaura et al. 2012)
Protective effect of young green barley leaf ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) on restraint stress-induced decrease in hippocampal brain-derived neurotrophic factor in mice	Ratones de seis semanas de edad	Extracto de las hojas para producir un polvo seco, disolvió en agua destilada.	(400 o 1000 mg / kg)	Vía oral	Siete días	(Yamaura et al. 2015)
Young Barley Indicates Antitumor Effects in Experimental Breast Cancer In Vivo and In Vitro	Ratas hembra Sprague-Dawley de 31 a 35 días de edad (4 a 5 semanas)	Polvo de cebada	3 g / kg (0,3%) y 30 g / kg (3%) Las dosis diarias de cebada por rata fueron 61 mg (BARLEY 0.3) y 615 mg (BARLEY 3).	Por vía oral en la dieta	Recibió 1 semana antes y 14 semanas después de la administración de NMU.	(Kubatka et al. 2016)
Hypercholesterolemia-reducing Effect of Young Barley Leaf Powder	Ratas Wistar macho de 3 semanas de edad	Polvo de hoja de cebada joven	Se preparó una dieta rica en colesterol que contenía 4% de polvo de hojas jóvenes de cebada (p / p).	Por vía oral en la dieta	Cuatro semanas	(Koga et al. 2013)
Effects of young barley leaf extract and antioxidative vitamins on LDL oxidation and free radical scavenging activities in type 2 diabetes.	Treinta y seis pacientes diabéticos tipo 2	Extracto de hoja de cebada joven	15 g	Vía oral	Cuatro semanas	(Y-M Yu et al. 2002)
Effect of young barley leaf extract and adlay on plasma lipids and LDL oxidation in hyperlipidemic smokers.	Cuarenta pacientes con hiperlipidemia, fumadores y no fumadores	Extracto de hoja de cebada joven	15 g	Vía oral	Cuatro semanas	(Ya-Mei Yu et al. 2004)

## 2.12. Modelo animal para pruebas de experimentación

Los modelos animales se han utilizado desde las primeras investigaciones científicas y actualmente continúan siendo utilizados, para entender las funciones individuales de los genes, los mecanismos de diferentes enfermedades y la efectividad y toxicidad de varios fármacos y compuestos químicos. Los genomas de muchos organismos modelo han sido secuenciados, y se ha descubierto que muchos genes se encuentran conservados entre los organismos modelo y el humano, por ello son considerados como herramientas indispensables en la investigación biomédica.

Los modelos animales más usados son los ratones y ratas de las cepas C57BL/6 (ratón), BALB/c (ratón), Sprague-Dawley (ratas) y Wistar (ratas). Estos modelos son utilizados en investigaciones de inmunología, oncología, fisiología, patología y cada vez más en neurociencia (Johnson, 2012).

### 2.12.1. Rata Sprague-Dawley

La rata Sprague-Dawley es una cepa híbrida albina con cabeza larga y estrecha. Es de gran utilidad en las investigaciones ya que posee una alta tasa de reproducción y una baja incidencia de tumores espontáneos. Su temperamento calmado y fácil manejo son atributos agradables para el atareado científico y los técnicos de laboratorio (Johnson, 2012). El peso corporal de las ratas macho adultos es de 250 a 300 g para las hembras, y 450 a 520 g para los machos. La vida útil típica es 2,5 años a 3,5 años (Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi), 2014).

## 2.13. Toxicidad oral aguda

“Se refiere a los efectos adversos que ocurren después de la administración oral de una dosis única de una sustancia, o dosis múltiples administradas dentro de las 24 horas” (OCDE, 2008a).

#### 2.14. Toxicidad subaguda

Es una evaluación importante para caracterizar los estudios de dosis-respuesta después de administración repetidas (28 días) (Freitas de Lima et al., 2017). Generalmente se realiza una vez que se lleva a cabo la prueba de toxicidad aguda, proporcionando información sobre los posibles peligros para la salud y surge de la exposición repetida durante un periodo relativamente limitado generalmente de 28 días (OCDE, 2008b).

#### 2.15. Toxicocinética de los glúcidos flavonoides

Los estudios sobre el análisis fenólico del pasto de cebada revelan la presencia de C-glucosil flavonas, gran parte de los compuestos descritos en esta planta se derivan de saponarina (isovitexin-7- O-glucósido) y lutoarina (isoorientin-7- O-glucósido) (Ferrerres et al., 2008; Ferreres et al., 2009).

Los flavonoides se han involucrado en actividades biológicas benéficas en diferentes estados patológicos, como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, antivirales, antidiabéticas, antiinflamatorias entre otras, todas ellas relacionadas al estrés oxidativo, sin embargo el efecto que proporcionan los compuestos fenólicos como los flavonoides va más allá de su efecto antioxidante (Williams et al., 2004), que proporciona su estructura clásica presente en los alimentos. Los flavonoides se encuentran con frecuencia en formas glicosiladas o esterificados, que consiste en  $C_6 C_3 C_6$  anillos, es decir, los anillos A y B unidas por un anillo de tres carbonos C, capaz de donar hidrogenos, debido a la presencia de sus grupos hidroxilo (Wang et al., 2018).

Las acciones biológicas de los flavonoides se han atribuido a sus propiedades antioxidantes, por un lado a través de sus capacidades reductoras o sus posibles influencias en el estado redox intracelular. Estudios recientes han observado que su actividad antioxidante donante de hidrógeno clásica es poco probable que sea la única explicación de los efectos celulares, Debido al

metabolismo *in vivo* que ocurre al modificar su estructura, lo cual altera su potencial redox (Williams et al., 2004).

Actualmente se sabe que el tracto gastrointestinal desempeña funciones importantes para la absorción de los glucósidos flavonoides, una vez la administración oral, pasan al estómago, no está muy claro el papel que desempeña, debido a su área de superficie relativamente pequeña. Sin embargo, los modelos *in vitro* muestran que compuestos como las antocianinas pueden ser absorbidos desde el estómago y escindidos por medio de la enzima  $\beta$ -glucosidasa específica del estómago y trasladarse al enterocito por medio de la bilitranslocasa (transportadora de aniones orgánicos) (Hostetler Gregory L, Ralston Robin A, 2017).

La arquitectura del intestino delgado, más largo que el estómago y su contenido de vellosidades y microvellosidades, permite una mejor absorción, se ha observado que el yeyuno e íleon juegan un papel importante en la absorción de estos compuestos. La escisión de glucósidos flavonoides en el intestino se puede llevar a cabo por la glicosidasa o por medio de lactasa-florizina hidrolasa (LPH), localizadas en la pared del intestino delgado del lado de la cavidad intestinal (Hostetler Gregory L, Ralston Robin A, 2017) (figura 4).

Una vez que ocurre la desglicosilación, la aglicona resultante puede ingresar a la célula por difusión pasiva, debido al aumento de lipofilia. También se ha reportado que compuestos como la quercetina 4'-O-glucósido pueden ser transportados por el transportador de glucosa dependiente de Na<sup>+</sup> 1 (SGLT1) presente en la membrana del intestino delgado, posteriormente ser hidrolizados dentro de la célula por la  $\beta$ -glucosidasa citosólica (CBG). En el enterocito puede ocurrir reacciones de fase I y II como lo es la glucuronidación por las UDP-glucuronil transferasa. Además, en el caso de los flavonoides que contienen un catecol en el anillo B, también pueden ocurrir O-metilación catalizada por la acción de la COMT (Catecol O-metiltransferasa), o de forma combinada glucurónidos O-metilados (Yang et al., 2018).



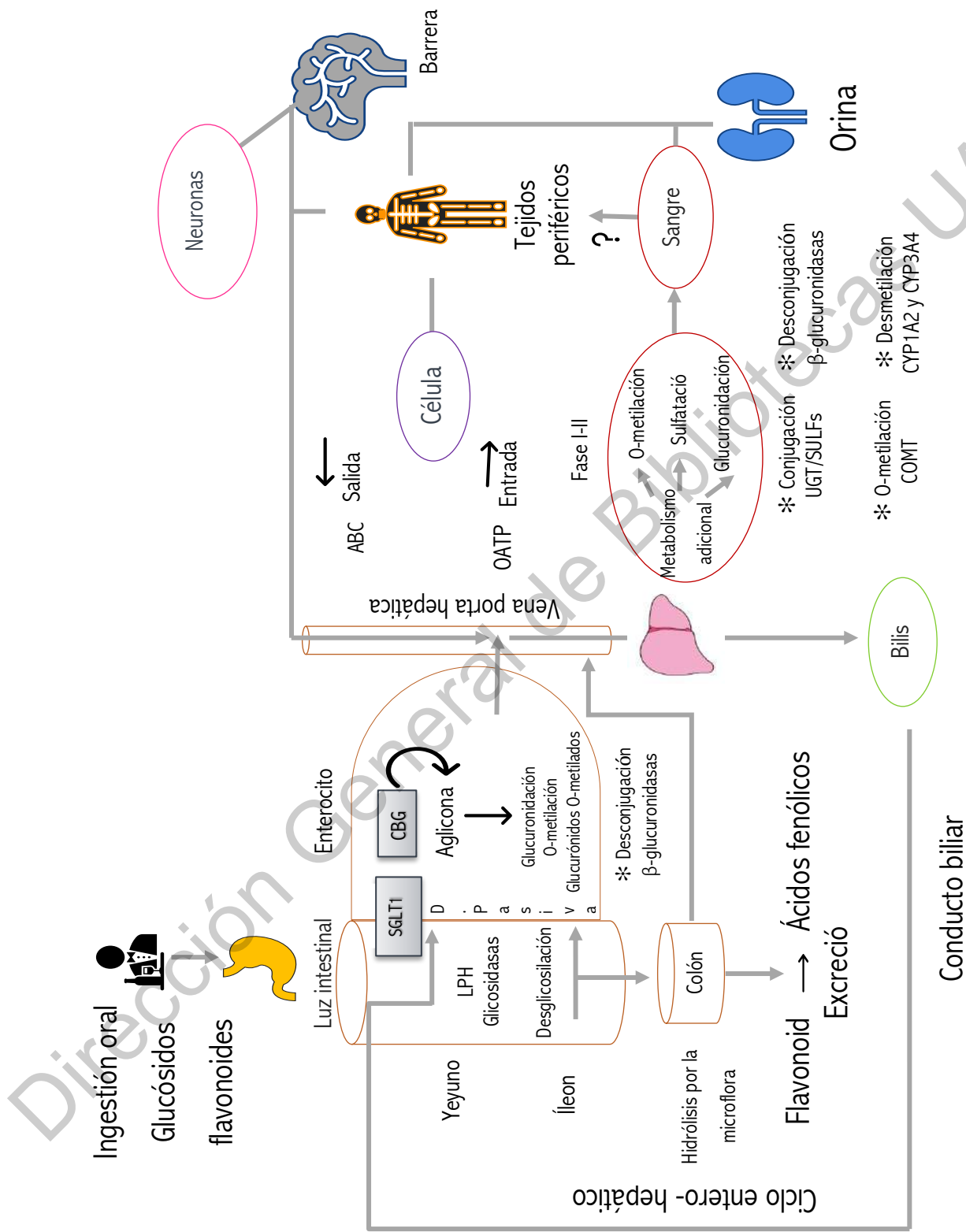


Figura 2. Toxicocinética de los glucósidos flavonoides.

Modificado de (Schroeter et al., 2002; Spencer et al., 2004)

Los compuestos que no son absorbidos en intestino delgado pasan a colón, donde la microbiota colónica puede realizar modificaciones extensas que incluyen hidrólisis, oxidación y escisión del anillo, formando metabolitos fenólicos secundarios más pequeños que también pueden ser absorbidos (Spencer et al., 2004).

Posteriormente los metabolitos resultantes de flavonoides presentes en el enterocito, salen en dirección a la vena porta hepática, por medio de los transportadores ABC de casete de unión a ATP P-gp, MDR1, MPR2, dirigiéndose al hígado en donde participan los OATP (polipéptido transportador de aniones orgánicos), que pertenecen a la superfamilia de transportadores SLC (portador de solutos), facilitando la entrada de compuestos al compartimento celular, para experimentar un metabolismo adicional (Yang et al., 2018).

El hígado es un órgano importante para el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Los estudios demuestran que los metabolitos de flavonoides son transportados al hígado donde se producirá un metabolismo adicional de fase I-II. Las isoformas involucradas en la glucuronidación en hígado humano es UGT 1A9 y la UGT 1A8 para intestino humano, ambas muestran la tasa de formación más rápida respectivamente, Posteriormente pueden ser distribuidos a los tejidos periféricos, quizás incluso a través de la barrera hematoencefálica, los metabolitos que no se absorben por los tejidos, son eliminados por la orina (Schroeter et al., 2002). También se han estudiado las enzimas del citocromo p450 humano (CYP) en el hígado, CYP1A2 y CYP3A4 son las enzimas clave que participan en la desmetilación de los metabolitos de flavonoides, por otra parte se ha observado que la desconjugación puede atribuirse a las enzimas  $\beta$ -glucuronidasas presentes en tejidos humanos como el hígado o el intestino delgado o durante condiciones locales de inflamación (Spencer et al., 2004; Yang et al., 2018). Además tanto en hígado como en intestino delgado, es más probable que la bioactividad de los flavonoides in vivo se derive de sus conjugados y no precisamente de las formas dietéticas ingeridas (Schroeter et al., 2002).

Posteriormente, los metabolitos que no son distribuidos a los tejidos, entran a la bilis donde pueden ser almacenados y posteriormente excretados por el conducto biliar directamente hacia la luz del duodeno, Los compuestos conjugados pueden sufrir un metabolismo adicional y convertirse en la aglicona primaria y reabsorberse volviendo a la circulación sistémica (Ciclo entero-hepático). La fracción de compuestos que no se reabsorbe se elimina por las heces (Schroeter et al., 2002).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

### III. JUSTIFICACIÓN

Los efectos benéficos de la hoja joven del pasto de cebada (*Hordeum vulgare*), como medicina tradicional se encuentran descritos en la literatura, probados en modelos *in vitro* e *in vivo*, con modelos animales y humanos. Estas pruebas se han enfocado en investigar efectos en diferentes patologías como cáncer, diabetes tipo 2, dislipidemias, etc. A pesar de que algunos estudios reportan dosis bajas y altas, no hay datos suficientes que demuestren la seguridad en las cantidades de consumo del pasto joven de cebada y los estudios realizados, en su mayoría son pruebas a nivel de modelos *in vitro*. Por ello, este estudio se basa en investigar la toxicidad de un extracto de la hoja joven de cebada (*Hordeum vulgare*), a diferentes concentraciones con pruebas agudas y subagudas, en modelos *in vivo* con la finalidad de conocer los efectos adversos y establecer una dosis segura (NOAEL) para posibles tratamientos de la administración del pasto de cebada como un posible alimento funcional que los seres humanos puedan consumir habitualmente y de forma segura.

#### IV. HIPÓTESIS

La administración oral aguda en una dosis de 5000 mg/kg y subaguda en dosis de 250 y 500 mg/kg de peso, del consumo de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*), no provoca efectos de toxicidad en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Evaluar la toxicidad aguda y subaguda en la administración oral de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos.

### 5.2. Objetivos específicos

Determinar la dosis letal 50 por medio de la prueba de toxicidad aguda en la administración oral de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos.

Determinar el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) por medio de la prueba de toxicidad subaguda en la administración oral de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos.

Evaluar el efecto de la administración oral de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos por medio de pruebas bioquímicas.

Evaluar el efecto en la administración oral de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) mediante análisis histopatológicos de hígado, riñón y corazón de ratas Sprague-Dawley de ambos sexos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Aprobación bioética

Se cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (10FCN2019) para la realización del presente estudio. En todo momento se observaron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), sobre las especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio, bajo las consideraciones éticas correspondientes.

### 6.2. Material vegetal

Para la siembra del pasto de cebada se utilizaron semillas de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) de la variedad Esmeralda, proporcionada por Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Celaya, a cargo del Dr. Mauro Refugio Zamora Díaz. Las semillas fueron sembradas en campo abierto en área agrícola del campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (20°42'43.3"N 100°15'31.6"W). en el mes de julio de 2019, época óptima para su desarrollo, sin tratamiento químico, utilizando 10 g de semilla por m<sup>2</sup>, sobre un suelo de textura arcillo-arenosa, fertilidad media-baja, con reacción ligeramente alcalina (pH 7.2) de 30 cm de profundidad, se suministraron 2 riegos cada semana.

El pasto fue cortado cuando alcanzó una altura de 20 a 30 cm. Esto a un mes aproximadamente de la siembra.

### 6.3. Obtención del extracto hidroalcohólico de pasto de cebada

El pasto recién cosechado fue secado en una estufa (Shel lab 1375 Fx, USA) de aire caliente a una temperatura de 40°C, hasta llegar a un peso constante, posteriormente se pulverizó en un molino (Thomas Scientific Model 4 Wiley, USA). Se paso por dos tamices de 1 mm y 0.5 mm, hasta obtener la harina del pasto.

Se almacenó en bolsas herméticas estériles de 100 g cada una, esto para tomar la harina necesaria para cada experimento y evitar la degradación de toda la obtenida. Fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  en ausencia de luz para evitar la degradación de compuestos.

Se tomó 100 g de la harina de pasto y se agregó en 1000 ml de una mezcla metanol/agua en proporción 80:20 (%v), posteriormente fue colocada en agitación constante y en ausencia de luz por 24 horas. El extracto metanólico-acuoso se filtro a través de un papel filtro (Whatman 541) y posteriormente se almacenó a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  en ausencia de luz, este procedimiento se repitió, hasta obtener la cantidad de muestra suficiente para cada experimento.

Se preparó el rotaevaporador (BUCHI Heating Bath B-490,) a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , presión 250 mBar/hpa, esto para acelerar la recolección del metanol, pero evitar la evaporación del agua (punto de ebullición  $80^{\circ}\text{C}$  a 400mmHg), Se agregó el extracto metanólico dentro de un matraz balón, una vez que comenzó la rotaevaporación se observó que no hiciera ebullición el extracto, esto indica que se elevó la temperatura y que el agua comienza a evaporarse.

Se vigiló que se colecte en el otro matraz el metanol ya que el proceso tardo aproximadamente de 6 a 8 horas para completarse, Se realizó en ausencia de luz y al finalizar se obtuvo en un matraz el extracto y en el otro el metanol, que se midió para confirmar el volumen recuperado.

El extracto fue colocado en una liofilizadora (LABCONCO Freezone 6, kansas city Missouri) y se llevo la muestra a  $133 \times 10^{-3}$  mBar y  $-50^{\circ}\text{C}$  para obtener un polvo fino por medio de sublimación que finalmente fue el precursor de nuestro análisis, al terminar se peso y registro el polvo obtenido para evaluar el rendimiento.

El producto liofilizado fue etiquetado y almacenado en frascos ámbar a una temperatura de refrigeración.



#### 6.4. Tipo de estudio y modelo animal

Estudio experimental, comparativo y longitudinal. Cuarenta y dos ratas Sprague-Dawley de ambos sexos libres de patógenos específicos fueron obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (INB-UNAM Campus Juriquilla). De cuatro semanas de edad, peso aproximado ( $110 \pm 22$  g). Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales UAQ, Los animales se separaron según el sexo y se les permitió la adaptación al nuevo entorno durante al menos 7 días previo al estudio. Todas las ratas se alojaron en jaulas de acrílico individuales y se mantuvieron en condiciones libre de patógenos específicos, a una temperatura de ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h, humedad relativa de (50 a 60%). Las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar de LabDiet (Pet Foods, S.A. de C.V.) y agua *ad libitum*, posterior a la aclimatación, los animales fueron seleccionados de manera aleatoria para cada experimento. De las 42 ratas utilizadas en todo el experimento, 12 se utilizaron en la prueba de toxicidad aguda y 30 para la prueba de toxicidad subaguda.

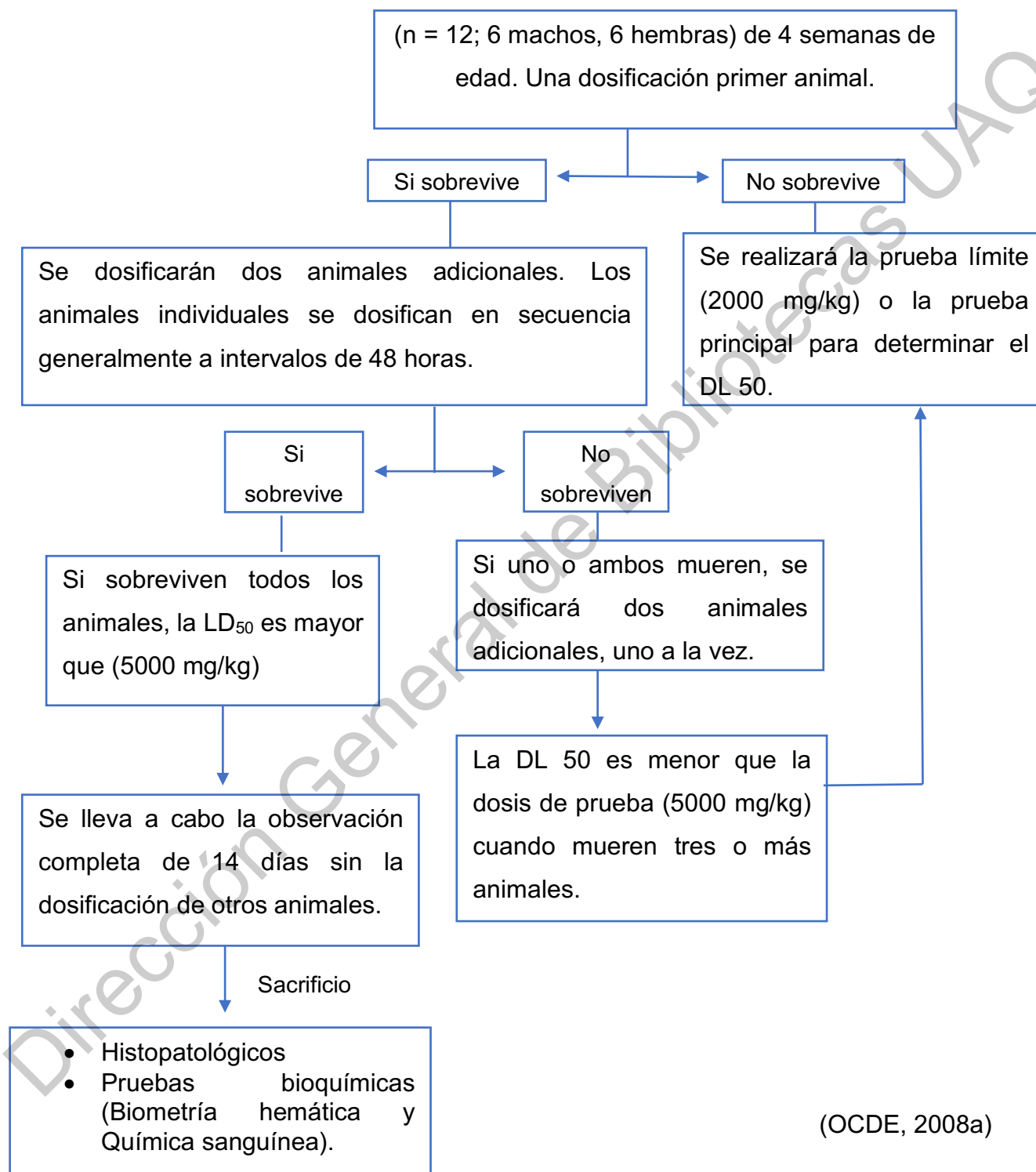
##### 6.4.1. Estudio de toxicidad oral aguda

De acuerdo con la OCDE directriz 425 (OCDE, 2008a), Se utilizaron ratas Sprague-Dawley un total de ( $n = 12$ ; 6 machos, 6 hembras), de 4 semanas de edad. El liofilizado de pasto de cebada fue rehidratado en agua destilada y se administro a través de una sonda oral 0.5 ml del extracto rehidratado. Se administro una dosis límite única de 5000 mg/kg de peso corporal, A tres ratas de cada sexo, ( $n = 6$  / grupo, 3 machos y 3 hembras) que se dejaron en periodo de ayuno de 8 a 12 horas antes de la dosificación (los alimentos, pero no el agua). Después del período de ayuno, los animales fueron pesados y la sustancia de prueba fue administrada. Se tomó el peso corporal en ayunas de cada animal y la dosis se calculó de acuerdo con el peso corporal, posterior a la administración se dio acceso *ad libitum* al alimento. Los grupos control para ambos sexos ( $n = 6$  / grupo, 3 machos y 3 hembras) recibieron solo agua destilada en el mismo volumen de 0.5 ml.

Antes y después de la administración, los animales se observaron, posteriormente una vez al día durante 14 días. De acuerdo con el Test de Irwin en ratas con leves modificaciones (Avellaneda, 2011; Christopher et al., 2017). El día 15 los animales fueron sacrificados por decapitación.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Gráfica 1. Diagrama de decisiones prueba de toxicidad aguda

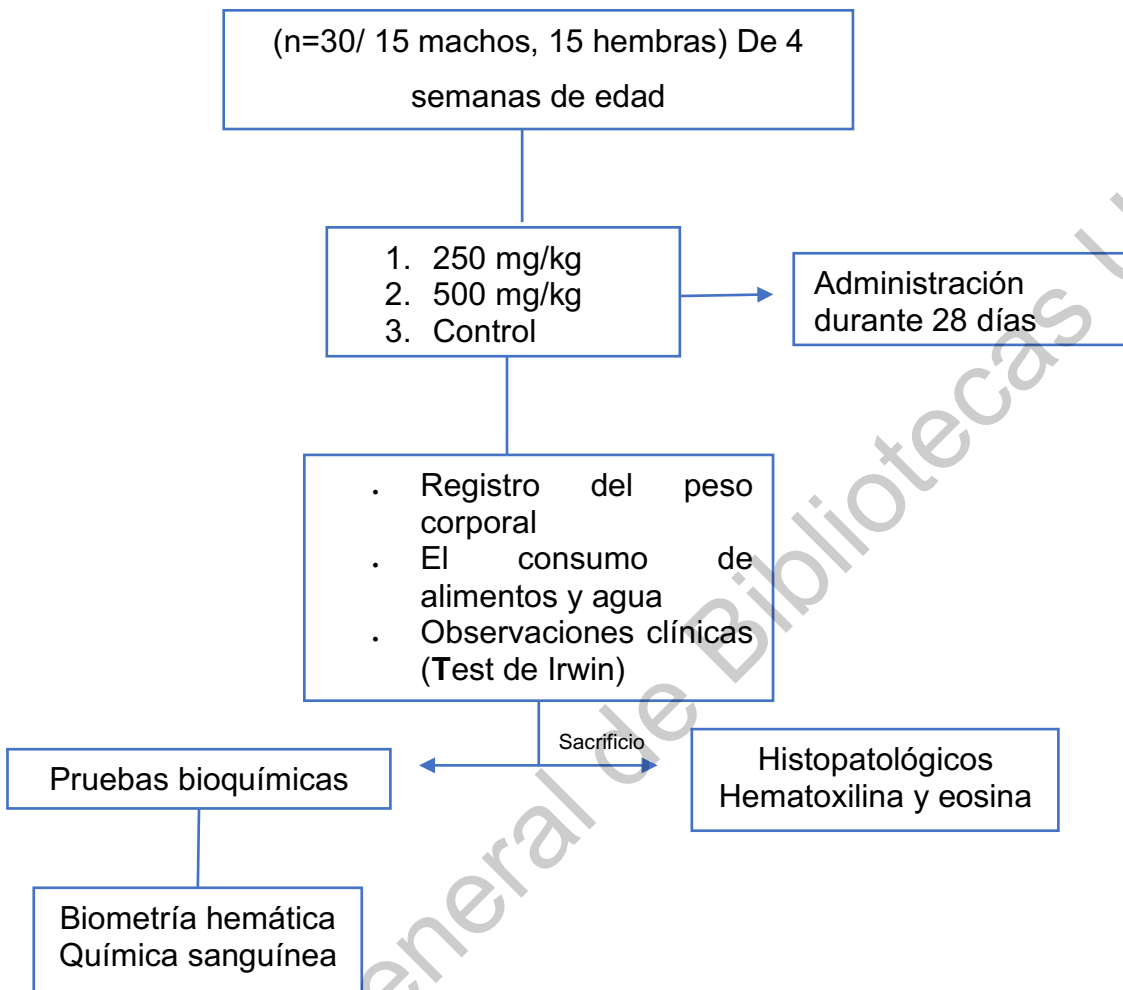


#### 6.4.2. Estudio de toxicidad oral subaguda

De acuerdo con la directriz OCDE 407 (OCDE, 2008b), Se utilizaron ratas Sprague-Dawley un total de (n=30 / 15 machos, 15 hembras) de 4 semanas de edad. Los animales se dividieron en 3 grupos de (n = 10 / grupo, 5 machos y 5 hembras). El liofilizado de pasto de cebada fue rehidratado en agua destilada y se administro a través de una cánula oral 0.3 ml, Se administraron dos dosis diferentes (250, 500, mg/kg de peso corporal), diariamente durante 28 días consecutivos. El grupo control recibió solo el vehículo (Agua destilada). Los animales fueron pesados y la sustancia de prueba fue administrada. Posterior a la administración se dio acceso *ad libitum* al alimento.

Antes y después de la administración, los animales se observaron, De acuerdo con el Test de Irwin en ratas con leves modificaciones (Avellaneda, 2011; Christopher et al., 2017). El día 29 los grupos (250, 500 y control) fueron sacrificados por decapitación.

Gráfica 2. Diagrama de decisiones prueba de toxicidad subaguda



(OCDE, 2008b)

## 6.5. Estudio de signos clínicos

Durante la prueba se realizaron, observaciones dos veces al día antes y después de la administración, de acuerdo con el Test de Irwin en ratas con leves modificaciones (Avellaneda, 2011; Christopher et al., 2017).

El consumo de alimentos y la ingesta de agua se midieron semanalmente hasta la culminación de cada experimento.

Todas las ratas se pesaron una vez antes del tratamiento y luego semanalmente. Al final de cada experimento, posterior al sacrificio, se calculó el peso relativo de los órganos con la siguiente fórmula:

Peso relativo de los órganos = peso absoluto de los órganos (g) × 100 / peso corporal de la rata en el día del sacrificio (g) {Formatting Citation}.

## 6.6. Químicas sanguíneas y biometrías hemáticas.

Los parámetros bioquímicos se evaluaron por medio de análisis de biometrías hemáticas de la serie roja y la serie blanca y químicas sanguíneas. A todos los animales que sobrevivieron al final del estudio. Las muestras de sangre se tomaron en la decapitación, recuperando la sangre en tubos morados con anticoagulante EDTA, para la realización del examen de biometría hemática, las muestras fueron enviadas de manera inmediata a analizar y procesarse en el Kx-21N – Hematology Analyzer y los tubos amarillos activadores de gel fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos para el análisis de química sanguínea en el Spin 120. Los procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Humana de la Facultad de Ciencias Naturales.

## 6.7. Análisis Histopatológicos

Los órganos obtenidos del sacrificio, fueron lavados con solución salina al 0,9% (P/v), se pesaron y se fijaron en formaldehído al 10 %, posteriormente se procesaron para la inclusión de parafina. Se prepararon secciones (5 µm de

espesor) y utilizo el método de tinción con hematoxilina y eosina (HE). Los tejidos (corazón, hígado y riñón), se analizaron en un (microscopio óptico) por su estructura general, cambios degenerativos, evidencia de necrosis y signos de inflamación (Araújo et al., 2017). En el laboratorio de histología de la Facultad de Ciencias Naturales.

#### 6.8. Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). La diferencia significativa entre los grupos se determinó por medio de la prueba t student para el estudio agudo y ANOVA seguido de la prueba post hoc de Dunnett para la prueba subaguda. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. Los datos fueron analizados en el programa estadístico IBM SPSS Statistics (Versión 25.0, IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

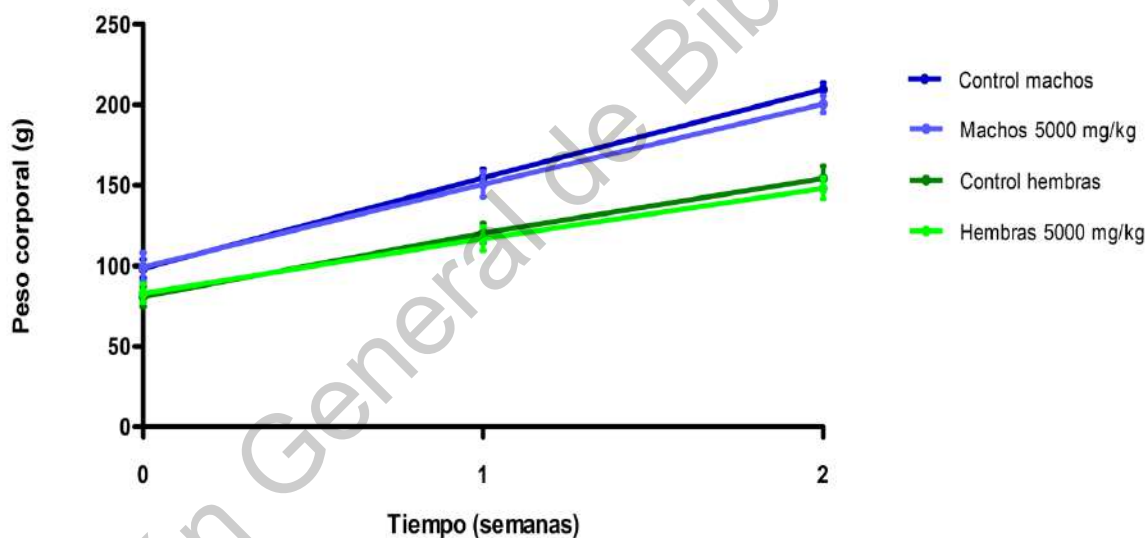
## VII. RESULTADOS

### 7.1. Prueba de toxicidad aguda

La DL 50 de un extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada (EHPC) (*Hordeum vulgare*), fue mayor a 5000 mg/kg de peso para ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, ya que ningún animal en experimentación murió. Por lo tanto, el extracto hidroalcohólico de pasto de cebada se considera de baja toxicidad.

#### 7.1.1. Cambios en el peso corporal prueba aguda

Gráfica 3. Peso en gramos (g) de ratas machos y hembras en la prueba de toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*)



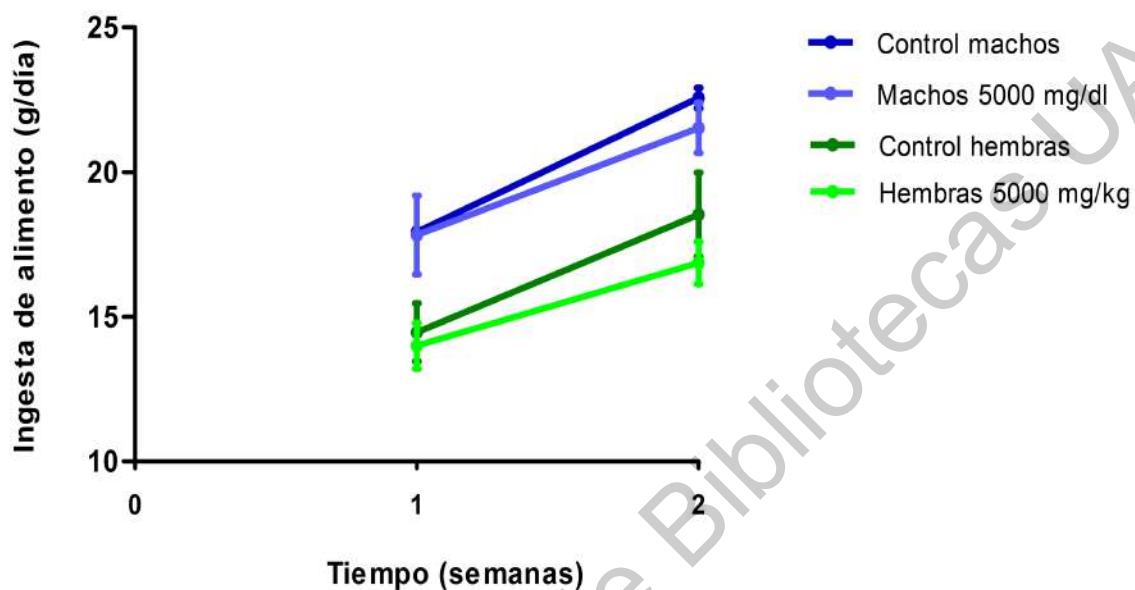
Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estandar;  $n = 3$  (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EHPC con t-student ( $P < 0.05$ ).

El peso corporal aumentó gradualmente durante todo el período del estudio, el aumento del grupo experimental del EHPC (*Hordeum vulgare*) no fue significativamente diferente al grupo control ( $p < 0.05$ ) para ambos sexos (gráfica 3).



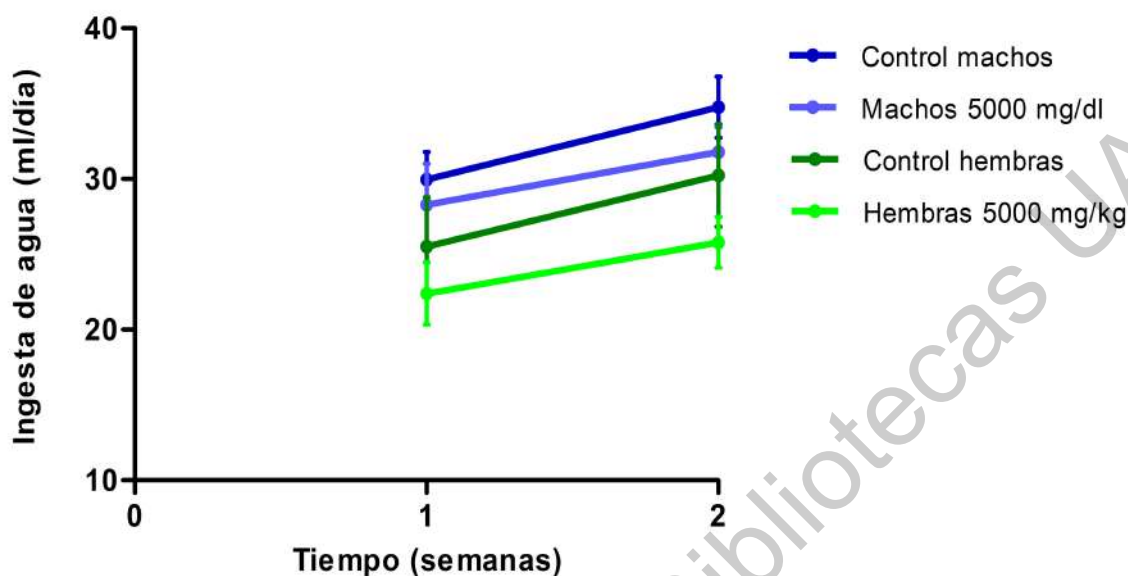
### 7.1.2. Cambios en el consumo de alimentos y agua prueba aguda

Gráfica 4. Efectos del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) en el consumo de alimento en la prueba de toxicidad aguda



Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estandar; n =3 (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EHPC con t-student ( $P < 0.05$ ).

Gráfica 5. Efectos del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) en el consumo de agua en la prueba de toxicidad aguda



Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estandar;  $n = 3$  (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EHPC con t-student ( $P < 0.05$ ).

Los resultados respecto a la ingesta de alimento y agua mostraron una tendencia similar durante la semana 1 y 2 para ambos sexos, Aunque el grupo experimental del EHPC (*Hordeum vulgare*) consumió menos alimento y agua respecto al grupo control, no fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) (gráfica 4 y 5). Eso se relaciono con los resultados obtenidos en el peso corporal, para ambos sexos, ya que el grupo experimental EHPC, tuvo una tasa de crecimiento menor que el grupo control, aunque tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas.

### 7.1.3. Efecto sobre el peso relativo de los órganos en la prueba aguda

Tabla 5. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre el peso relativo de los órganos en la prueba de toxicidad aguda.

Sexo	Machos		Hembras	
Grupo	Control	5000 mg/kg	Control	5000 mg/kg
Hígado	4.16 ± 0.15	4.20 ± 0.20	3.50 ± 0.81	3.63 ± 0.15
Riñones	1.06 ± 0.05	1.00 ± 0.00	1.06 ± 0.05	1.13 ± 0.05
Corazón	0.50 ± 0.00	0.53 ± 0.05	0.60 ± 0.00	0.60 ± 0.10
Páncreas	0.43 ± 0.05	0.46 ± 0.05	0.63 ± 0.5	0.56 ± 0.11
Bazo	0.26 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.33 ± 0.05
Timo	0.43 ± 0.11	0.43 ± 0.11	0.50 ± 0.10	0.43 ± 0.05

Los valores son expresados como la media ± desviación estandar; n =3 (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EHPC con t-student ( $P < 0.05$ ).

El peso absoluto de los órganos se convirtió en peso relativo, es decir por 100 g de peso corporal en ayunas, como se muestra en (tabla 5). Los datos indican para ambos sexos que el grupo experimental administrado con EHPC (*Hordeum vulgare*) no fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) en comparación con el grupo control del vehículo.

#### 7.1.4. Efecto sobre parámetros de biometría hemática en la prueba aguda

Tabla 6. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre parámetros de Biometría Hemática en la prueba de toxicidad aguda

Sexo	Machos		Hembras	
Grupo	Control	5000 mg/kg	Control	5000 mg/kg
<b>WBC (10<sup>3</sup> /μl)</b>	15.10 ± 4.05	10.76 ± 2.44	8.63 ± 5.19	9.76 ± 1.05
<b>LYM (10<sup>3</sup>/uL)</b>	10.80 ± 2.96	8.33 ± 1.92	6.56 ± 3.52	7.96 ± 0.77
<b>PLT(10<sup>3</sup>/μL)</b>	887.00 ± 139.86	890.00 ± 107.68	697.66 ± 230.16	850.00 ± 120.31
<b>RBC (10<sup>6</sup> /μl)</b>	7.06 ± 0.16	7.28 ± 0.17	7.34 ± 0.42	7.25 ± 0.41
<b>HGB (g/dL)</b>	14.33 ± 0.37	15.16 ± 0.60	15.36 ± 0.15	14.96 ± 0.05*
<b>HCT (%)</b>	43.50 ± 0.50	45.36 ± 0.90*	45.03 ± 0.95	43.50 ± 1.49
<b>MCV (fL)</b>	61.60 ± 2.08	62.30 ± 1.45	61.43 ± 2.20	60.00 ± 1.94
<b>MCH (pg)</b>	20.30±0.85	20.83±0.72	20.96 ± 0.97	20.66 ± 1.06
<b>MCHC (g/dl)</b>	32.93±0.55	33.40±0.65	34.13 ± 0.40	34.40 ± 1.05

Los valores son expresados como la media ± desviación estandar; n =3 (machos o hembras). El asterisco indica diferencias significativa entre el grupo control y experimental EHPC con t-student ( $P < 0.05$ ). WBC: leucocitos, LYM: linfocitos, PLY: plaquetas, RBC: eritrocitos, HGB: hemoglobina, HCT: hematocrito, MCV: volumen corpuscular medio, MCH: hemoglobina corpuscular media, MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media.

El efecto del EHPC sobre los índices hematológicos se examinó al final del estudio (tabla 6). El grupo experimental administrado con EHPC (*Hordeum vulgare*) mostro un efecto no significativo para ambos sexos sobre WBC, LYM, PLT, RBC, MCV, MCH, MCHC, RDW. Sin embargo, se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) para machos en el porcentaje de HCT y en hembras HGB, en comparación con el grupo control.

### 7.1.5. Efectos sobre parámetros de química sanguínea en la prueba aguda

Tabla 7. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre parámetros de química sanguínea en la prueba de toxicidad aguda

Sexo	Machos		Hembras	
Grupo	Control	5000 mg/kg	Control	5000 mg/kg
Glucosa (mg/dL)	138.33 ± 5.09	152.63 ± 13.80	122.30 ± 2.38	129.00 ± 3.15*
Ácido úrico (mg/dL)	0.90 ± 0.26	0.93 ± 0.20	1.40 ± 0.17	1.06 ± 0.37
Creatinina (mg/dL)	0.33 ± 0.11	0.36 ± 0.05	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00
Urea (mg/dL)	53.76 ± 4.07	49.23 ± 6.20	51.83 ± 10.37	41.56 ± 7.77
Proteína T. (g/dL)	5.60 ± 0.17	5.56 ± 0.23	5.40 ± 0.30	5.46 ± 0.32
Colesterol (mg/dL)	75.20 ± 8.47	86.86 ± 8.03	81.93 ± 2.51	72.73 ± 6.84
HDL (mg/dL)	40.53 ± 0.40	47.60 ± 5.50	44.23 ± 1.70	39.23 ± 7.75
LDL (mg/dL)	23.33 ± 7.50	24.00 ± 0.00	23.33 ± 3.51	22.33 ± 3.05
VLDL (mg/dL)	11.33 ± 1.15	15.33 ± 3.78	14.00 ± 3.60	11.00 ± 2.64
Triglicéridos (mg/dL)	57.76 ± 6.72	77.03 ± 17.19	71.30 ± 18.21	57.13 ± 13.53

Los valores son expresados como la media ± desviación estandar; n =3 (machos o hembras). El asterisco indica diferencias significativa entre el grupo control y experimental EHPC con t-student ( $P < 0.05$ ). HDL: lipoproteínas de alta densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Los resultados sobre los parámetros de química sanguínea, en el grupo experimental administrado con EHPC (*Hordeum vulgare*), en hembras, muestran diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), en glucosa, pero no para machos, en comparación con el control. No se observaron diferencias significativas para ácido úrico, creatinina, urea, proteína t, colesterol, HDLc, LDLc, VLDL y triglicéridos, para ambos sexos del grupo experimental vs control (tabla 7).

7.1.6. Efecto sobre parámetros bioquímicos de función y lesión hepática en la prueba aguda

Tabla 8. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre parámetros de función y lesión hepática en la prueba de toxicidad aguda

Sexo	Macho		Hembra	
Grupo	Control	5000 mg/kg	Control	5000 mg/kg
<b>Albúmina (g/dL)</b>	3.50 ± 0.00	3.46 ± 0.23	3.46 ± 0.15	3.56 ± 0.15
<b>Bil.total (μmol/L)</b>	4.21 ± 0.25	3.41 ± 0.51	3.53 ± 1.04	3.02 ± 0.39
<b>TGO/AST (U/L)</b>	169.66 ± 41.23	157.33 ± 19.13	155.33 ± 20.25	131.33 ± 12.74
<b>TGP/ALT (U/L)</b>	62.00 ± 3.46	59.33 ± 4.04	53.66 ± 2.51	55.66 ± 2.30
<b>ALP (U/L)</b>	752.36 ± 118.69	801.93 ± 99.41	488.70 ± 31.35	614.33 ± 90.73

Los valores son expresados como la media ± desviación estandar; n =3 (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EPHC con t-student ( $P < 0.05$ ). Bil. total: bilirrubina total, TGO/AST: aspartato aminotransfrasa, TGP/ALT: alanina aminotransferasa, ALP: fosfatasa alcalina.

Los marcadores bioquímicos en la prueba de función hepática en el grupo experimental administrado con EHPC (*Hordeum vulgare*), respecto al grupo control, indican que no hubo cambios significativos ( $P < 0.05$ ) como se resume en la (tabla 8).

### 7.1.7. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre el hígado en la prueba aguda

La evaluación histopatológica de las sección de hígado muestra sinusoides claros, vena central bien delineada y tríada portal sin cambios histopatológicos, en los controles de machos y hembras. Sin embargo, después de la administración de la dosis límite de 5000 mg/kg del EHPC, mostró lesiones hepáticas caracterizadas por una histoarquitectura mayoritariamente distorciónada. En machos pudimos observar hiperplasia de conductos biliares moderada difusa, infiltración linfocitaria perilobulillar. En hembras los cambios encontrados fueron, infiltración linfocitaria focal moderada.

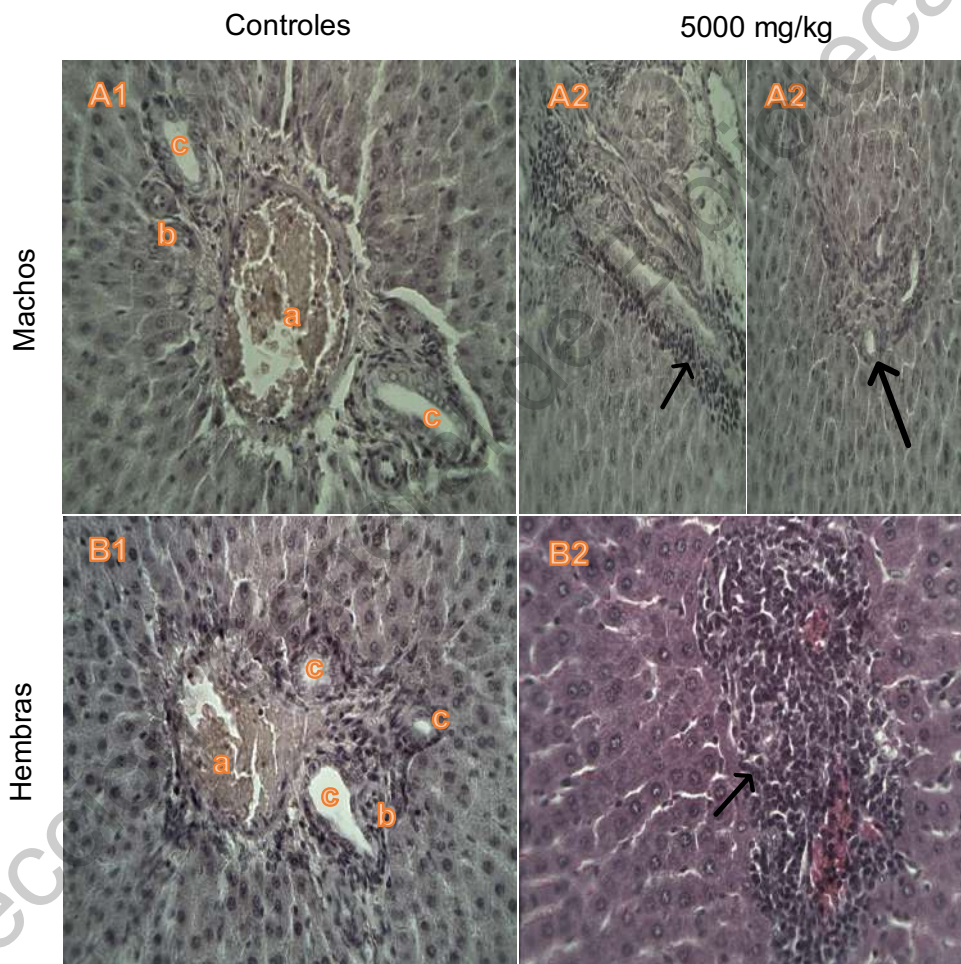


Figura 3. Corte de hígado de ratas machos y hembras del grupo control y tratamiento dosis límite única de 5000 mg/kg del EHPC *Hordeum vulgare*. H&E, 40X.

A1 – B1: Control machos y hembras: Triada portal con a) Vena portal, b) Arteria, c) Conducto biliar.

A2: Tratamiento machos (5000 mg/kg): La flecha corta indica infiltración linfocitaria perilobulillar y la flecha larga hiperplasia de conducto biliar moderada difusa.

B2: Tratamiento hembras (5000 mg/kg): La flecha indica una infiltración linfocitaria focal moderada.



7.1.8. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre el riñón en la prueba aguda

La evaluación en la arquitectura celular del riñón se muestra sin cambios histopatológicos, para el grupo control de machos y hembras (figura 4). Corpúsculos renales, túbulos proximales y distales claramente diferenciados. El grupo experimental administrado con 5000 mg/kg del EHPC para machos, no reveló cambios histopatológicos; Sin embargo, en hembras el análisis reveló lesiones patológicas; Glomerulitis moderada difusa. Estos resultados indican que las hembras fueron más susceptibles al daño causado por el EHPC que los machos.

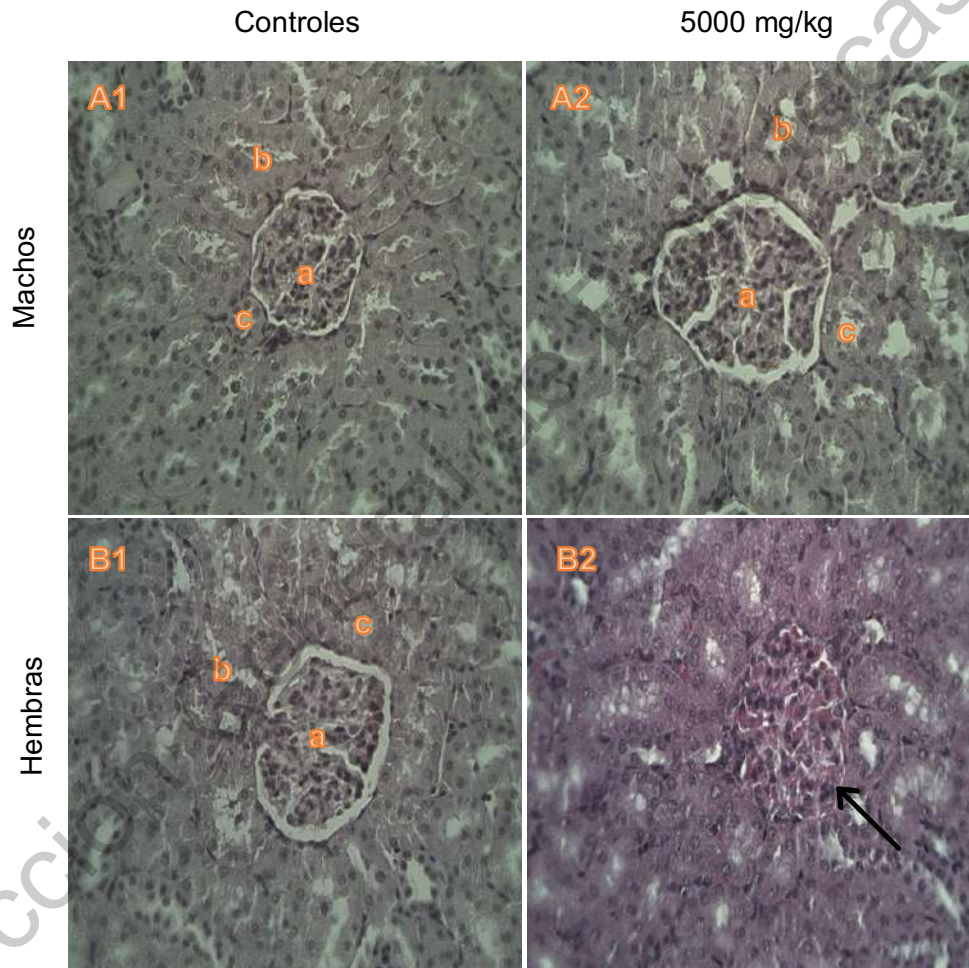


Figura 4. Corte de riñones de ratas macho y hembra del grupo control y tratamiento dosis límite única de 5000 mg/kg del EHPC *Hordeum vulgare*. H&E, 40X.

A1 – B1: Control machos y hembras: Corteza renal a) Glomérulo, b) Túbulos contorneado proximal, c) Túbulo contorneado distal.

A2: Tratamiento machos (5000 mg/kg): Corteza renal a) Glomérulo, b) Túbulos contorneado proximal, c) Túbulo contorneado distal. Sin cambios histopatológicos.

B2: Tratamiento hembras (5000 mg/kg): Se observó una glomerulitis moderada difusa, indicada por la flecha.



### 7.1.9. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre el corazón en la prueba aguda

La evaluación histopatológica sobre la arquitectura celular del corazón en el grupo control para machos y hembras, no muestra cambios histopatológicos. Por otra parte el grupo experimental administrado con 5000 mg/kg del EHPC para machos, no se encontraron cambios histopatológicos; Sin embargo, en hembras se observó congestión moderada difusa y miocarditis focal moderada (figura 5).

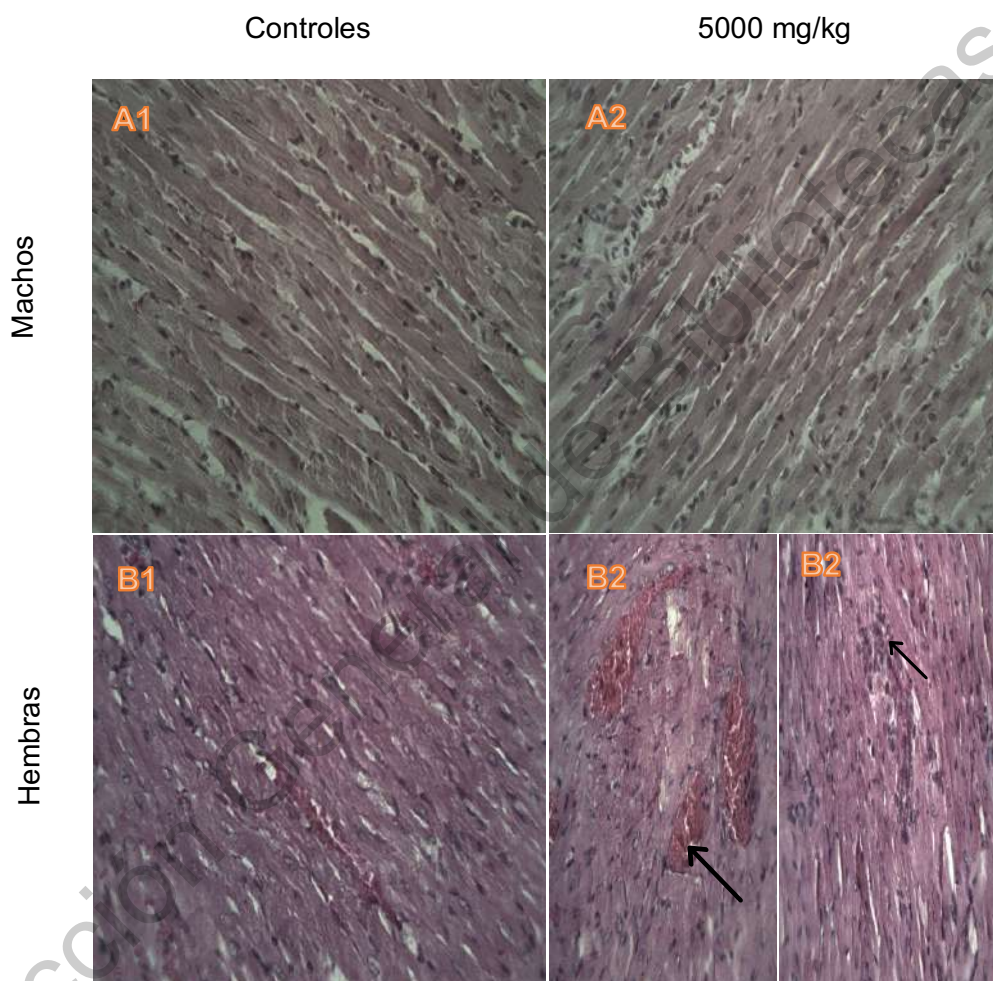


Figura 5. Corte de corazón de ratas macho y hembra del grupo control y tratamiento dosis límite única de 5000 mg/kg del EHPC *Hordeum vulgare*. H&E, 40X.

A1 – B1: Control machos y hembras: Miocardio, Sin cambios histopatológicos.

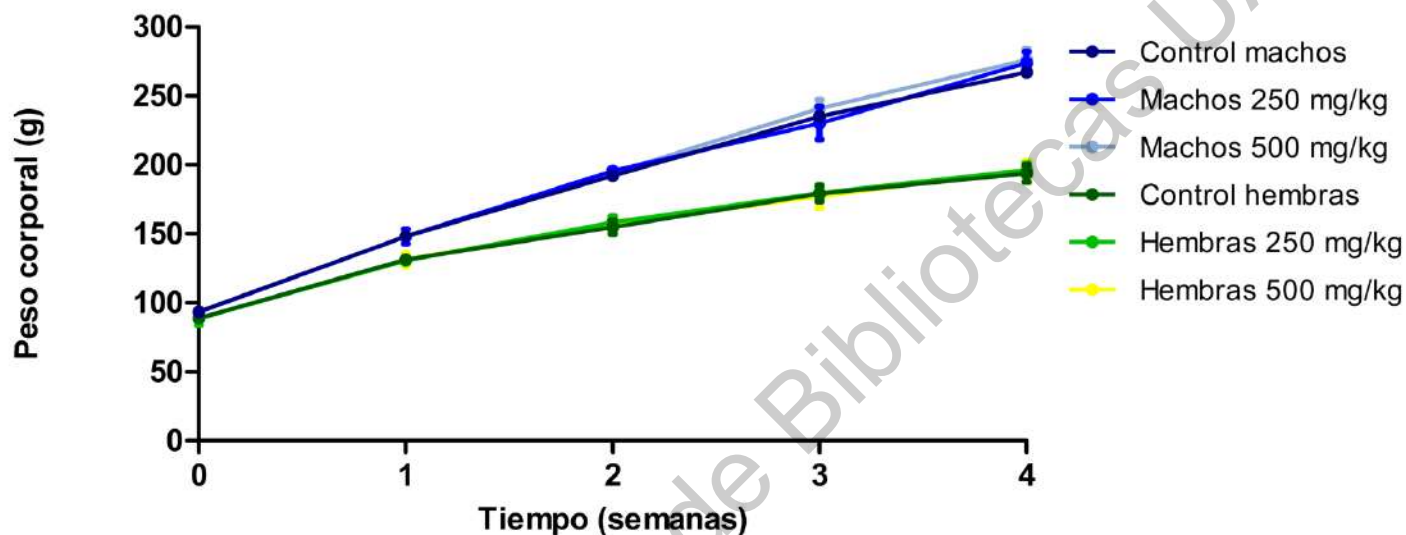
A2: Tratamiento machos (5000 mg/kg): Sin cambios histopatológicos.

B2: Tratamiento hembras (5000 mg/kg): La flecha larga indica una congestión moderada difusa y la flecha corta una miocarditis focal moderada.

## 7.2. Prueba de toxicidad subaguda

### 7.2.1. Cambios en el peso corporal prueba subaguda

Gráfica 6. Peso en gramos (g) de ratas machos y hembras en la prueba de toxicidad subaguda del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*).

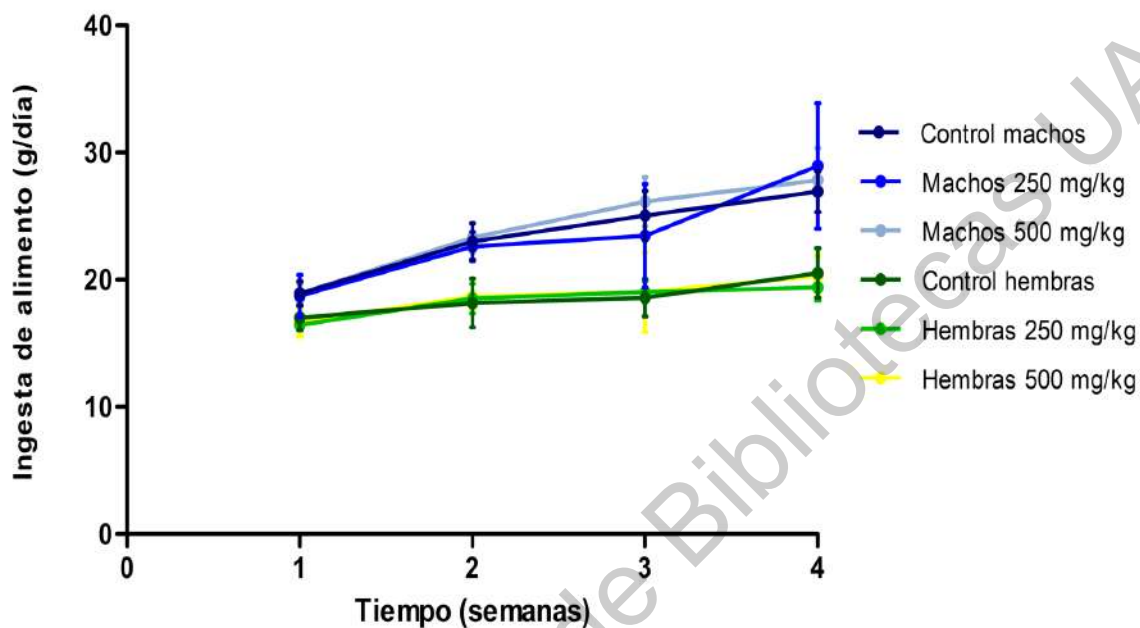


Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar;  $n = 5$  (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EHPC. ANOVA seguido la prueba post hoc de Dunnett ( $P < 0.05$ ).

A lo largo del estudio se observó un aumento gradual del peso corporal en machos y hembras. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en el peso corporal en machos o hembras de los grupos de dosis bajas o altas en comparación con sus respectivos controles.

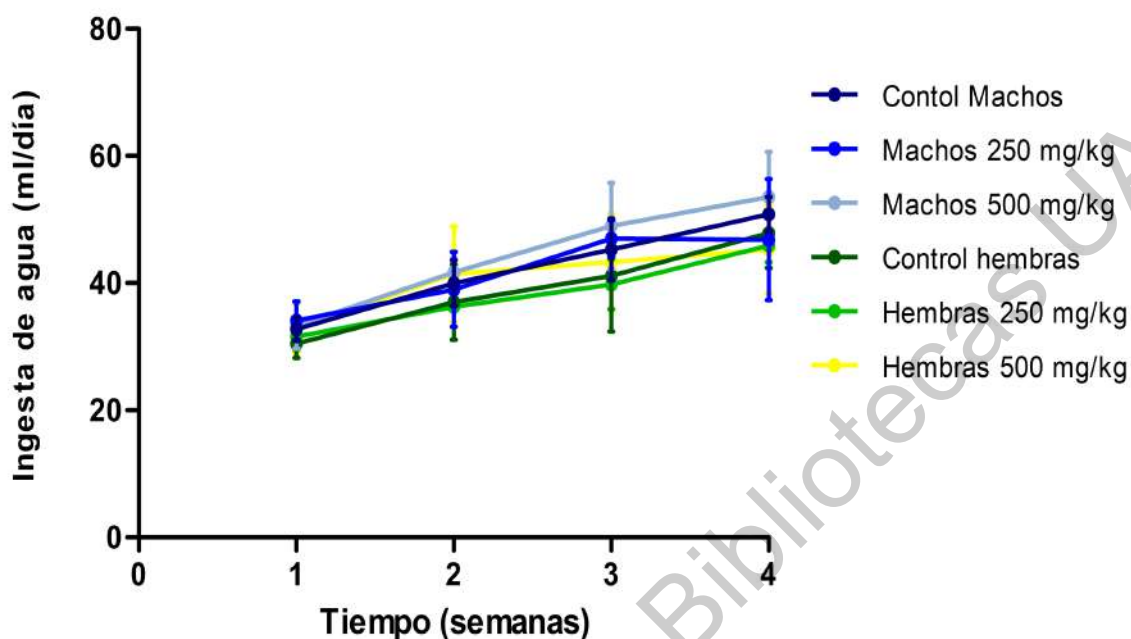
### 7.2.2. Cambios en el consumo de alimento y agua prueba subaguda

Gráfica 7. Efectos del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) en el consumo de alimento en la prueba de toxicidad subaguda



Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar;  $n = 5$  (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EHPC. ANOVA seguido la prueba post hoc de Dunnett ( $P < 0.05$ ).

Gráfica 8. Efectos del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada (*Hordeum vulgare*) en el consumo de agua en la prueba de toxicidad subaguda



Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar;  $n = 5$  (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EHPC. ANOVA seguido la prueba post hoc de Dunnett ( $P < 0.05$ ).

Los resultados en la ingesta de alimento y agua en los grupos administrados con EHPC en las dosis de 250 y 500 mg/kg, para ambos sexos, no mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), respecto a los grupos control, durante el periodo de experimentación (gráfica 7 y 8).

### 7.2.3. Efecto sobre el peso relativo de los órganos prueba subaguda

El peso relativo de los órganos mostró una diferencia no significativa ( $P < 0.05$ ) en cuanto al peso del hígado, riñones, bazo y timo, en los grupos administrados con EHPC, respecto a sus grupos control, para ambos sexos. El día 29, el porcentaje del peso relativo del corazón en hembras que recibieron 250 mg/kg de EHPC se vio disminuido y el páncreas aumentado significativamente ( $P < 0.05$ ), en comparación con el grupo control. Sin embargo los resultados no significativos del grupo 500 mg/kg en la administración de EHPC, en hembras, respecto a los controles, indican que las variaciones del peso relativo de los órganos no fue dosis dependiente (tabla 9).

Tabla 9. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada (*Hordeum vulgare*) sobre el peso relativo de los órganos en la prueba de toxicidad subaguda.

Grupo	Peso relativo de los órganos (%)					
	Hígado	Riñones	Corazón	Bazo	Páncreas	Timo
<b>Machos</b>						
<b>Grupo (250 mg/kg)</b>	3.52 ± 0.20	0.99 ± 0.06	0.53 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.52 ± 0.06	0.28 ± 0.05
<b>Grupo (500 mg/kg)</b>	3.54 ± 0.23	1.00 ± 0.07	0.56 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.31 ± 0.06
<b>Control</b>	3.51 ± 0.17	1.05 ± 0.06	0.55 ± 0.03	0.21 ± 0.05	0.54 ± 0.08	0.30 ± 0.06
<b>Hembras</b>						
<b>Grupo (250 mg/kg)</b>	3.64 ± 0.08	0.95 ± 0.08	0.49 ± 0.05*	0.24 ± 0.05	0.74 ± 0.16*	0.28 ± 0.05
<b>Grupo (500 mg/kg)</b>	3.49 ± 0.14	0.96 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.27 ± 0.05	0.66 ± 0.04	0.30 ± 0.05
<b>Control</b>	3.60 ± 0.26	0.99 ± 0.05	0.63 ± 0.03	0.28 ± 0.07	0.55 ± 0.03	0.34 ± 0.04

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar; n =5 (machos o hembras).  
 \* ANOVA seguido la prueba post hoc de Dunnett ( $P < 0.05$ ).

#### 7.2.4. Efecto sobre parámetros de biometría hemática en la prueba subaguda

Los resultados en el análisis hematológico de las hembras administradas con EHPC en dosis repetidas de 500 mg/kg, en comparación del grupo control, reveló una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en WBC y LYM. Sin embargo, en los machos los valores no mostraron diferencias significativas respecto a su grupo control. No hubo cambios significativos en otros parámetros (tabla 10).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Tabla 10. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada (*Hordeum vulgare*) sobre parámetros de biometría hemática en la prueba de toxicidad subaguda

Sexo	Machos			Hembras		
	Control	(250 mg/kg)	(500 mg/kg)	Control	(250 mg/kg)	(500 mg/kg)
<b>WBC (<math>10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	12.38 ± 3.15	17.16 ± 2.02	13.34 ± 6.31	17.72 ± 2.36	13.23 ± 3.48	10.62 ± 3.58*
<b>LYM (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	9.06 ± 2.97	12.68 ± 2.31	10.24 ± 3.63	12.68 ± 3.00	8.56 ± 1.61	7.20 ± 2.15*
<b>PLT (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	779.60 ± 132.10	733.80 ± 146.35	674.00 ± 198.16	788.80 ± 87.06	684.00 ± 108.46	699.80 ± 88.59
<b>RBC (<math>10^6/\mu\text{l}</math>)</b>	8.10 ± 0.26	7.81 ± 0.52	8.08 ± 0.48	8.19 ± 0.36	7.85 ± 0.19	8.02 ± 0.24
<b>HGB (g/dL)</b>	16.28 ± 0.41	15.88 ± 1.02	16.28 ± 0.58	16.70 ± 0.40	16.15 ± 0.17	16.18 ± 0.35
<b>HCT (%)</b>	47.38 ± 1.84	46.26 ± 2.89	47.70 ± 1.89	47.88 ± 1.09	46.00 ± 1.58	46.86 ± 1.11
<b>MCV (fL)</b>	58.48 ± 1.61	59.30 ± 2.18	59.10 ± 1.51	58.50 ± 1.84	58.52 ± 0.90	58.42 ± 0.96
<b>MCH (pg)</b>	20.10 ± 0.45	20.38 ± 0.81	20.16 ± 0.55	20.40 ± 0.67	20.57 ± 0.46	20.18 ± 0.32
<b>MCHC (g/dl)</b>	34.36 ± 0.47	34.34 ± 0.46	34.12 ± 0.20	34.90 ± 0.38	35.10 ± 0.98	34.54 ± 0.51

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar; n = 5 (machos o hembras).

\* ANOVA seguido la prueba post hoc de Dunnett ( $P < 0.05$ ). WBC: leucocitos, LYM: linfocitos, PLY: plaquetas, RBC: eritrocitos, HGB: hemoglobina, HCT: hematocrito, MCV: volumen corpuscular medio, MCH: hemoglobina corpuscular media, MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media.



#### 7.2.5. Efectos sobre parámetros de química sanguínea en la prueba subaguda

No se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), en parámetros de química sanguínea para ambos sexos, mostrados en la (tabla 11).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Tabla 11. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada (*Hordeum vulgare*) sobre parámetros de química sanguínea en la prueba de toxicidad subaguda

Sexo	Machos			Hembras		
	Control	(250 mg/kg)	(500 mg/kg)	Control	(250 mg/kg)	(500 mg/kg)
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	130.28 ± 15.18	123.30 ± 5.06	138.42 ± 14.58	143.82 ± 23.57	140.35 ± 15.00	142.60 ± 12.89
<b>Ácido úrico(mg/dL)</b>	1.02 ± 0.21	1.00 ± 0.38	0.86 ± 0.11	1.30 ± 0.15	1.12 ± 0.22	1.34 ± 0.42
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0.40±0.00	0.38 ±0.04	0.40 ± 0.00	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.05	0.42 ± 0.04
<b>Urea (mg/dL)</b>	47.80 ± 3.57	47.30 ± 10.24	45.32 ± 4.00	52.14 ± 4.32	50.95 ± 8.23	52.30 ± 5.44
<b>Proteína T. (g/dL)</b>	5.98 ± 0.31	5.98 ± 0.16	5.88 ± 0.31	6.50 ± 0.33	6.10 ± 0.28	6.42 ± 0.35
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	56.38 ± 3.25	59.10 ± 4.67	58.12 ± 4.32	67.94 ± 8.75	74.57 ± 11.93	66.02 ± 4.59
<b>HDL (mg/dL)</b>	34.24 ± 3.23	34.44 ± 3.59	34.38 ± 3.83	48.28 ± 5.29	50.67 ± 9.79	44.14 ± 3.24
<b>LDL (mg/dL)</b>	8.80 ± 3.63	8.60 ± 5.02	11.40 ± 2.19	6.60 ± 3.78	9.75 ± 4.27	6.40 ± 4.27
<b>VLDL (mg/dL)</b>	13.20 ± 2.38	16.40 ± 7.53	12.20 ± 1.64	13.00 ± 2.54	14.25 ± 2.36	15.60 ± 2.88
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	66.02 ± 12.92	81.84 ± 37.35	61.40 ± 7.55	64.76 ± 13.59	70.85 ± 10.16	77.96 ± 14.31

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar; n =5 (machos o hembras). No hay diferencia significativa entre el grupo control y experimental EHP. ANOVA seguido la prueba post hoc de Dunnett ( P < 0.05). HDL: lipoproteínas de alta densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

#### 7.2.6. Efecto sobre parámetros bioquímicos de función y lesión hepática en la prueba asubguda

Como se muestra en la (tabla 12), Los parámetros de lesión hepática en las hembras, mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), de TGO/AST en los grupos administrados con EHPC, en la dosis de (250 mg/kg), en comparación con el grupo control.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

Tabla 12. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre parámetros de función y lesión hepática en la prueba subaguda

Sexo	Machos		Hembras	
	Control	(250 mg/kg)	Control	(250 mg/kg)
Grupo		(500 mg/kg)		(500 mg/kg)
Albúmina (g/dL)	3.60 ± 0.07	3.52 ± 0.13	3.62 ± 0.08	3.75 ± 0.12
Bil.Total (mg/dl)	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.02
TGO/AST (U/L)	148.00 ± 33.80	127.00 ± 7.00	122.40 ± 8.67	147.75 ± 2.62*
TGP/ALT (U/L)	61.50 ± 9.67	66.75 ± 12.99	62.40 ± 7.82	62.00 ± 4.24
ALP (U/L)	569.26 ± 142.26	577.32 ± 111.99	595.84 ± 130.70	443.82 ± 74.68
				484.92 ± 100.62
				462.62 ± 118.87

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar; n =5 (machos o hembras).

\* ANOVA seguido la prueba post hoc de Dunnett ( $P < 0.05$ ). Bil. total: bilirrubina total, TGO/AST: aspartato aminotransferasa, TGP/ALT: alanina aminotransferasa, ALP: fosfatasa alcalina.

7.2.7. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre el hígado en la prueba subaguda

La arquitectura de hígado en la prueba subaguda de los grupos control para machos y hembras, se muestran sin cambios histopatológicos. Los grupos administrados con EHPC en dosis de 250 mg/kg en machos se observó, hiperplasia de conductos biliares moderada difusa. En hembras estuvo presente hiperplasia de conductos biliares moderada difusa más infiltración linfocitaria perilobulillar. El grupo de 500 mg/kg, presento para ambos sexos; hiperplasia de conductos biliares moderada difusa, infiltración linfocitaria multifocal perilobulillar (figura 6).

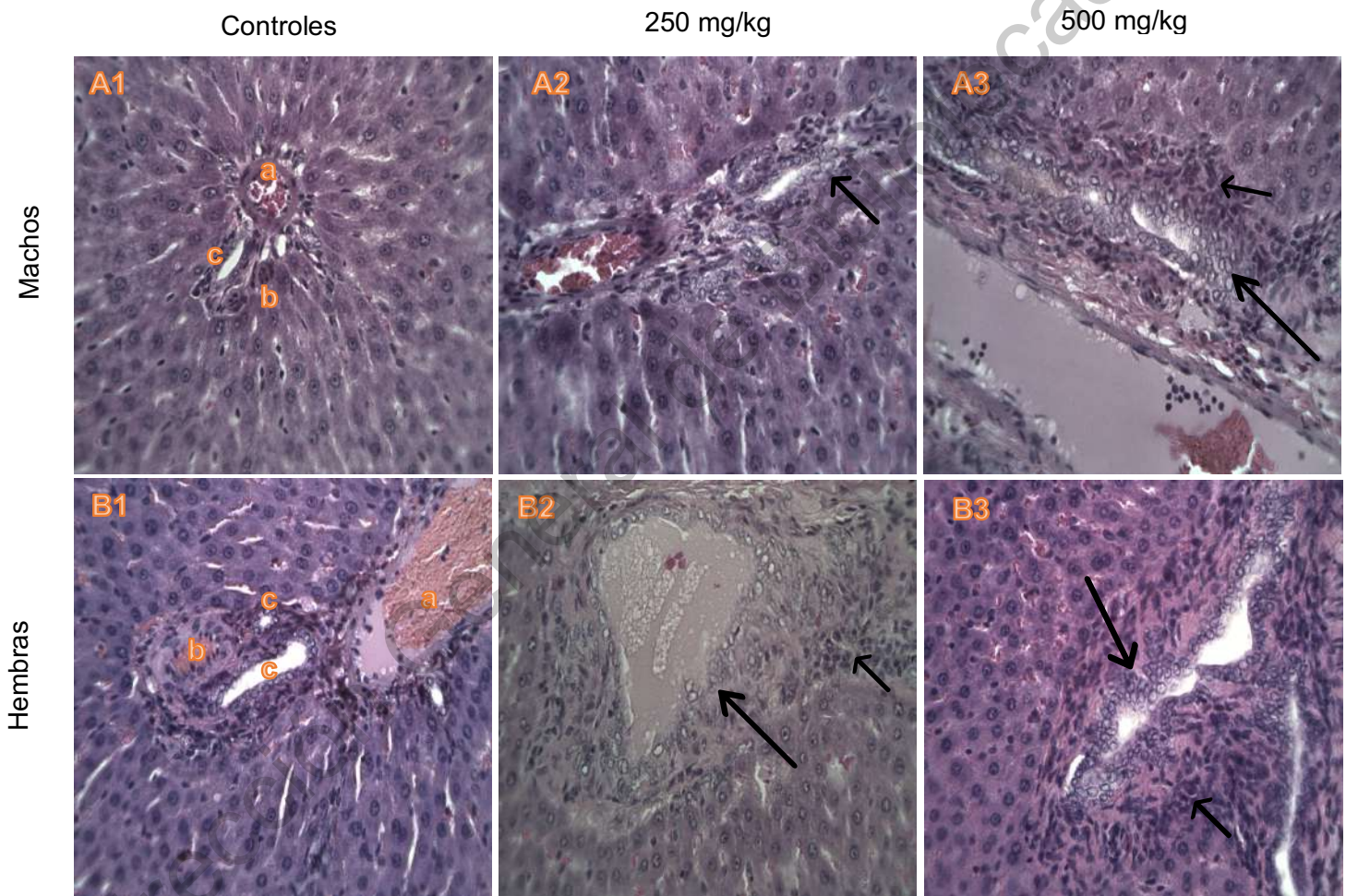


Figura 6. Cortes de hígado de ratas machos y hembras del grupo control y tratamiento en dosis (250 y 500 mg/kg) repetidas por 28 días del EHPC de *Hordeum vulgare*. H&E, 40X.

A1 – B1: Control machos y hembras: Triada portal con a) Vena portal, b) Arteria, c) Conducto biliar.

A2: Tratamiento machos (250 mg/kg): La flecha indica hiperplasia de conductos moderada difusa.

A3: Tratamiento machos (500 mg/kg): Se puede observar hiperplasia de conductos biliares moderada difusa (flecha larga), eh infiltración linfocitaria perilobulillar (flecha corta).

B2 – B3: Tratamiento hembras (250 y 500 mg/kg), para ambas dosis se muestra hiperplasia de conductos biliares moderada difusa (flecha larga), eh infiltración linfocitaria perilobulillar (flecha corta).



### 7.2.8. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre el riñón

La arquitectura celular del riñón en la prueba subaguda, en los grupos controles de machos y hembras, se muestra sin cambios histopatológicos (figura 7). Los grupos administrados con el EHPC de machos y hembras, en la dosis de 250 y 500 mg/kg mostró glomerulitis moderada difusa.

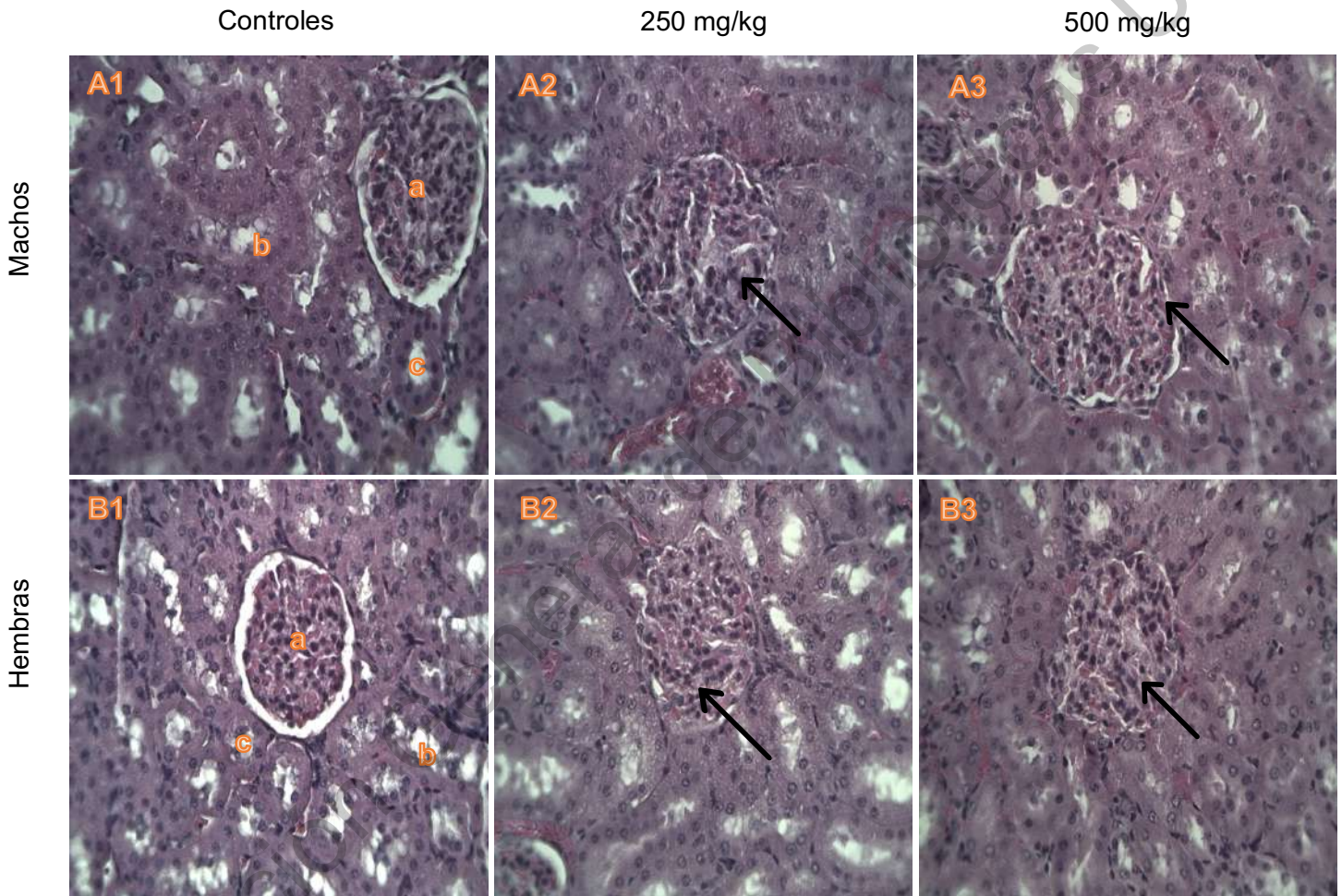


Figura 7. Corte de riñones de ratas macho y hembra del grupo control y tratamiento en dosis (250 y 500 mg/kg) repetidas por 28 días del EHPC de *Hordeum vulgare*. H&E, 40X.

A1 – B1: Control machos y hembras: Corteza renal a) Glomérulo, b) Túbulo contorneado proximal, c) Túbulo contorneado distal.

A2 – B2: Tratamiento machos y hembras (250 mg/kg): La flecha indica glomerulitis moderada difusa.

A3 – B3: Tratamiento machos y hembras (500 mg/kg): La flecha indica glomerulitis moderada difusa.

### 7.2.9. Efecto del extracto hidroalcohólico de pasto joven de cebada EHPC (*Hordeum vulgare*) sobre el corazón

Los cardiomiocitos de los grupos controles, se observan sin cambios histopatológicos. Sin embargo, el grupo de 250 mg/kg presento congestión moderada difusa para ambos sexos. Por otra parte el grupo de 500 mg/kg, además de presentar congestión moderada difusa, también se puede observar miocarditis focal en ambos sexos.

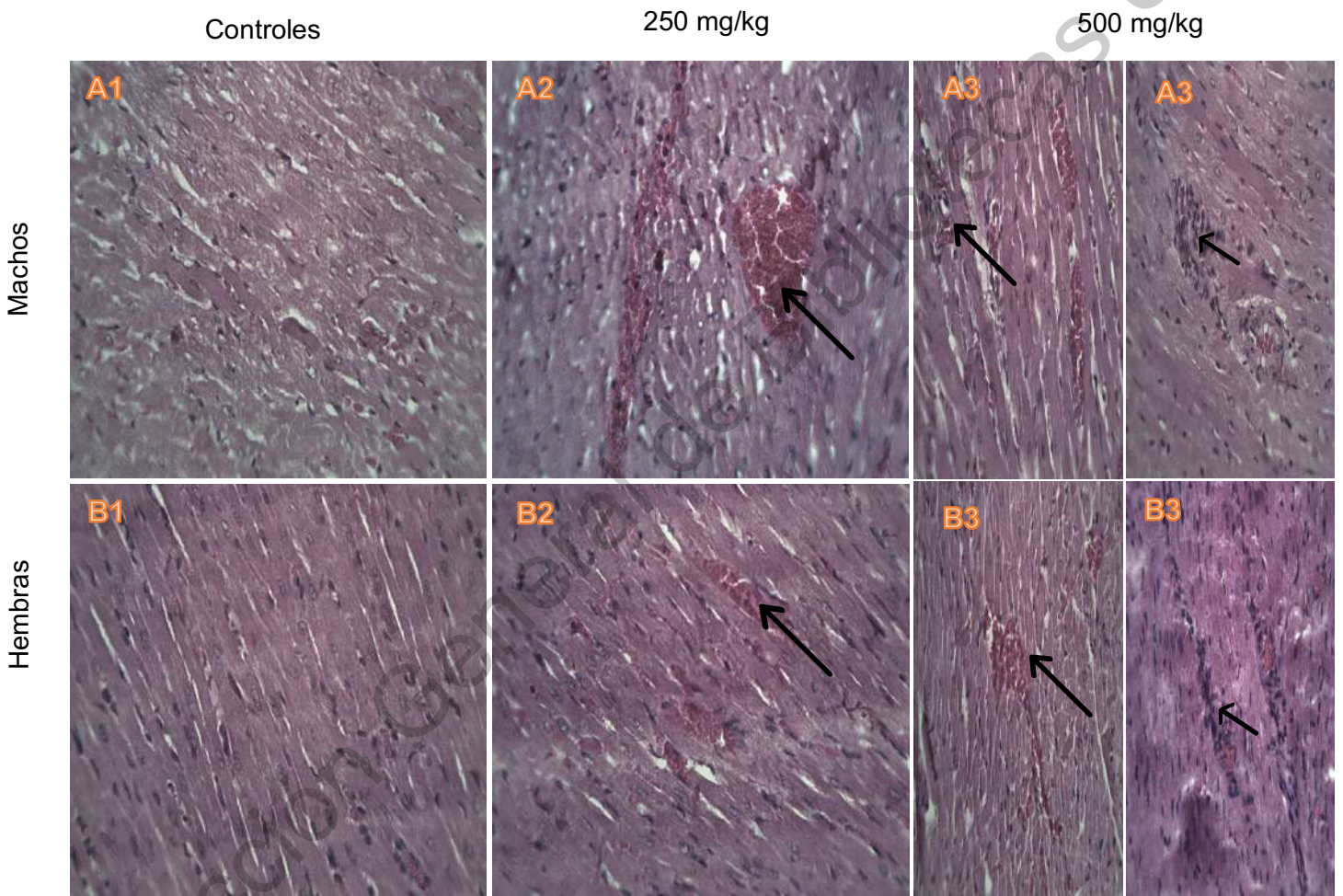


Figura 8. Corte del corazón de ratas macho y hembra del grupo control y tratamiento en dosis (250 y 500 mg/kg) repetidas por 28 días del EHPC de *Hordeum vulgare*. H&E, 40X.

A1 – B1: Control machos y hembras: Miocardio, Sin cambios histopatológicos.

A2 – B2: Tratamiento machos y hembras (250 mg/kg): La flecha indica congestión moderada difusa.

A3 – B3: Tratamiento machos y hembras (500 mg/kg): Congestión moderada difusa (flecha larga) y miocarditis focal (flecha corta).



## VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, la DL 50 en la administración oral de la prueba aguda del extracto hidroalcohólico de pasto de cebada no causó mortalidad en los animales en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, lo que sugiere que la dosis letal media es superior a 5000 mg / kg. Por lo cual el EHPC entra en una categoría 5 de las sustancias poco tóxicas (OMS, 2009). Sin embargo, tomando en cuenta los posibles efectos acumulativos del EHPC después de una administración oral repetida, la dosis seleccionada para el estudio subagudo fue la décima parte del estudio de toxicidad aguda (Olayode et al., 2019). El monitoreo diario durante la administración en la dosis única y repetida, confirmó que las dosis no indujeron la muerte. En la prueba de toxicidad subaguda, no se observó mortalidad en los grupos (control, 250, 500 mg/kg/día), para ambos sexos, durante el período de tratamiento de 28 días. Sin embargo, En la primera semana de administración, solo una hembra del grupo de dosis de 250 mg/kg/día fue sacrificada y sometida a necropsia por razones del protocolo bioético. El día 5 se observó una disminución de peso corporal del 6 %, con pérdida del apetito y movimientos circulares repetidos. El día 6 mostró disminución en la actividad y disnea. Los hallazgos en la necropsia revelaron una protuberancia en las vértebras cervicales del animal, esto se asoció a una lesión por parte de la madre para amantar a su cría, Por ello no se relacionó con la administración del EHPC.

En el presente estudio se utilizó el test de Irwin en ratas, este fue útil para evaluar los signos clínicos; en la prueba aguda, no se observaron alteraciones, en la postura, piel, ojos, orejas, pelaje y efectos gastrointestinales durante el período de observación. Tampoco se vieron comprometidos los patrones de conducta habitual de las ratas administradas con EHPC en comparación con el control. Sin embargo, tres animales en el estudio subagudo, una hembra del grupo de 500 mg/kg de peso, y dos machos, uno del grupo de 250 y otro del grupo control presentaron problemas dentales, se percato que los incisivos inferiores estaban desgastados y por ende se vio afectada la ingesta de alimento, debido a que todos los grupos presentaron este problema, no se



relaciono con la administración del EHPC. Por otra parte, se observaron deposiciones sueltas transitorias en machos y hembras en la dosis mas alta (500 mg/kg), sin embargo, fueron casos aislados y desaparecieron con el paso de los días.

El monitoreo del peso corporal y la ingesta de alimentos de los animales en experimentación, son indicadores comúnmente de toxicidad después de la administración de medicamentos o químicos (Teo et al., 2002). En general las sustancias toxicas podrían conducir a anormalidades en el peso corporal y por ello es un indicador fácil de obtener y sensible a la toxicidad (Olayode et al., 2019). En el estudio agudo se observo disminución en el peso corporal del grupo experimental administrado con EHPC, aunque estos resultados no tuvieron una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) comparado con el grupo control, una ingesta de alimentos menor por parte del grupo experimental vs el control, pueden considerarse como una posible explicación de estos cambios en el peso corporal; sin embargo, el peso relativo de los órganos no mostro diferencias significativas, entre el grupo EHPC y el control para ambos sexos, otros estudios muestran datos similares. (Yihang et al., 2016) reporto que para el extracto acuoso de la planta *Aspidopterys obcordata*, La DL 50 se estimó  $> 5000$  mg / kg de peso corporal, ya que todos los parámetros medidos en ratas tratadas con *A. obcordata* no se vieron afectados en comparación con los de las ratas control.

Después de la administración repetida durante 28 días del EHPC, No hubo cambios significativos en el peso corporal, tampoco en la ingesta de alimento y agua. Los grupos incrementaron su peso corporal de manera normal, sin diferencias significativa ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y el control para ambos sexos respectivamente. Sin embargo, el peso relativo de los órganos en hembras mostro disminución ( $P < 0.05$ ) significativa del corazón, pero un aumento en páncreas significativo en el grupo 250 mg/kg de peso corporal, en comparación con el grupo control. La alteración en el peso relativo de los órganos puede ser resultado de un posible daño tóxico diferencial entre el sexo. Un posible daño en corazón fue confirmado por los hallazgos en el análisis

histopatológico de las hembras, ya que presentaron congestión moderada difusa en ambas dosis administradas (250 y 500 mg/kg). Aunque el peso relativo del corazón en el grupo de 500 mg/kg, no fue significativamente diferente respecto a los controles. Estos resultados indican cambios fisiológicos de interés, respecto a la toxicidad del EHPC. Otros reportes sobre la evaluación de toxicidad en fármacos (Ihsan et al., 2010; Murbach et al., 2017), observaron este mismo comportamiento, la disminución significativa en el peso relativo del corazón en los grupos tratados, respecto a los controles. Sin embargo, otros análisis donde han evaluado la toxicidad de plantas con contenido fitoquímico, no se encontró el mismo efecto en la disminución del peso relativo de los órganos (Adewale et al., 2016; Nahdi et al., 2018; Unuofin et al., 2018). Esta información proporciona evidencia inicial de la seguridad del extracto hidroalcohólico de pasto de cebada, por una parte, la ausencia de mortalidad y por otra, el inicio de signos clínicos adversos observables del EHPC en ratas durante la prueba aguda (dosis única) y subaguda (dosis repetidas).

El torrente sanguíneo es el principal medio de transporte de muchos fármacos y xenobióticos, en donde las células sanguíneas, están inicialmente expuestas a concentraciones significativas de compuestos tóxicos (Yehya et al., 2019). Los biomarcadores hematológicos son utilizados actualmente para determinar posibles efectos adversos de fármacos y sustancias químicas. Recientemente la evidencia científica ha demostrado que el consumo de plantas medicinales, indiscriminado puede causar alteraciones en el perfil hematológico (Sani et al., 2009). El hematocrito es un indicador que representa el volumen que ocupan los hematíes respecto al total de la sangre. En la prueba de dosis única los datos revelaron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en % HCT en el grupo experimental de los machos administrados con EHPC (*Hordeum vulgare*) vs el grupo control. Las elevaciones significativas de baja magnitud en el hematocrito se ha relacionado con una deshidratación leve (Murbach et al., 2017), Sin embargo, el % HCT y el recuento de eritrocitos estaba dentro del rango de algunos de los valores de referencia publicados (Han et al., 2010). Se

consideraron indicativos variación biológica normal y sin relevancia toxicológica (Murbach et al., 2017).

El sistema hematopoyético es uno de los objetivos más sencibles de las sustancias tóxicas, en la médula ósea donde se lleva acabo la producción de glóbulos rojos (Olaniyan et al., 2016). En el estudio agudo observamos una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) de HGB en las hembras del grupo experimental en comparación con el control; Sin embargo, la diferencia no significativa en los índices de glóbulos rojos sugiere que el EHPC no afecto la producción de células sanguíneas, por lo cual no indujo anemia.

Las hembras administradas con la dosis máxima de 500 mg/kg del EHPC, en el estudio subagudo, presentaron una disminución significativa en el recuento de WBC y LYM, en comparación con el grupo control. Los glóbulos blancos son un conjunto de células sanguíneas, entre ellas los linfocitos, que participan en la inmunidad adaptativa y celular. Generalmente un aumento indica la presencia de infección u antígenos, lo cual genera inflamación (Nahdi et al., 2018), pero una disminución esta relacionada con leucopenia, que puede ser ocasionado por problemas en la médula ósea, bazo o timo, órganos encargados de su producción, crecimiento y desarrollo. Lo cual conlleva a un debilitamiento del sistema inmune. Los parámetros de referencia en el recuento de glóbulos blancos para hembras comparados con los obtenidos en el presente trabajo indican que el grupo de 250 mg/kg y el control se encuentran por encima del rango establecido. Los valores de LYM obtenidos en hembras se mantuvieron en los parámetros de referencia (Giknis et al., 2006), para los grupos tratados con EHPC; Sin embargo, el grupo control se vio aumentado. Por lo cual no se encontró una relación de dosis o hallazgos correlacionados en otros parámetros del estudio y se consideró indicativo de variación biológica normal (Murbach et al., 2017). La sensibilidad diferencial del efecto, con respecto al sexo en la administración de EHPC, se confirmo por la falta de cambios significativos en el recuento de WBC en machos.

Los análisis de química sanguínea son biomarcadores de gran utilidad para evaluar la función hepática, renal y cardiovascular, ya que su papel es vital en los procesos metabólicos (Olayode et al., 2019). En la prueba aguda, De todos los parámetros analizados (tabla 7 y 8), La glucosa se vio a la alza en el grupo experimental en machos y hembras; Sin embargo, en comparación con el control, solo las hembras fueron significativamente diferente ( $P < 0.05$ ). Aún así el valor de glucosa en hembras estaba dentro de los parámetros normales para sexo, edad y tipo de cepa (Giknis et al., 2006). No obstante los datos bioquímicos nos dieron indicios de cambios fisiopatológicos en hembras y machos que se relacionaron con el análisis histopatológico de las secciones de hígado, riñón y corazón, al presentar lesiones de leves a moderadas. Aunque fueron más marcados en hembras que en machos, lo cual nos habla de efectos diferenciales por sexo (Gochfeld, 2017).

Los parámetros analizados en la química sanguínea en la administración repetida por 28 días en las dosis de 250 y 500 mg/kg no mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), respecto al grupo control (tabla 11), y los valores obtenidos se encontraron en el rango establecido para sexo, edad y tipo de cepa (Giknis et al., 2006). Los biomarcadores utilizados comunmente, para evaluar posible daño hepático, causado por sustancias toxicas, son las transaminasas (AST Y ALT). El daño al hepatocito, aumenta su permeabilidad de la membrana celular, provocando la liberación de las aminotransferasas en el torrente sanguíneo (Saleem et al., 2017). ALP esta presente en riñón, hígado, intestino, hueso y placenta. Es la enzima principal involucrada en la eliminación del pirofosfato inorgánico, un inhibidor de la mineralización ósea (Goes et al., 2012). Es un marcador estándar de obstrucción del tracto biliar, enfermedades óseas o daño hepático (Manjunatha et al., 2005). Se ha informado que un aumento fisiológico de los niveles plasmáticos se produce en animales en fase de crecimiento indicativo de la mineralización de la matriz extracelular y actividad osteoblástica en el hueso (Sánchez et al., 2002).

En el presente estudio AST, mostro disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en hembras en el grupo tratado con 250 mg/kg del EHPC en comparación con el grupo control. AST está presente en diferentes tejidos (corazón, músculo esquelético, riñon, cerebro e hígado), mientras que la ALT se localiza principalmente en el hígado (Algandaby, 2015), Sin embargo, no se obtuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en este parámetro ni en ALP. Los valores obtenidos en el presente trabajo de AST, ALT y ALP se encontraron por encima de los parámetros reportados y ya establecidos para sexo, edad y tipo de cepa (Giknis et al., 2006), en todos los grupos, incluso como se mencionó anteriormente la AST en los controles de las hembra fue mayor que en los grupos experimentales 250 y 500 mg/kg de EHPC (tabla 12). Un estudio de datos históricos en ratas Sprague Dawley considerando valores de referencia de parámetros bioquímicos, reveló, que los valores fisiológicos de AST y ALT podrían aumentar 3, 5 y 6 veces el valor medio, respectivamente (Petterino and Argentino-Storino, 2006). Lo cual podría explicar la diferencia estadística no significativa en la prueba aguda y subaguda de estos analitos en los grupos tratados con EHPC, en todas las dosis, con relación a sus respectivos controles. Sin una relación de dosis o hallazgos correlacionados en otros parámetros del estudio, se consideró indicativo de variación biológica normal y sin relevancia toxicológica (Murbach et al., 2017). Además, la bilirrubina, un indicador importante en el diagnóstico de una destrucción elevada de eritrocitos, disfunción hepática o de una obstrucción de los conductos biliares, se encontró en rangos normales. Las diferencias significativas obtenidas en la prueba subaguda no parecen estar relacionadas a la dosis; Sin embargo, estuvieron presentes en hembras y no en machos. Lo que sugiere una respuesta diferencial de los órganos por sexo (Olayode et al., 2019). Varios informes han documentado que las hembras tienen mayores efectos adversos en comparación con los machos. Esto se debe a varios factores entre los cuales se describe la toxicocinética, toxicodinámica, la anatomía, la fisiología, bioquímica y la genética. Los xenobióticos pueden interactuar de manera

diferente con las hormonas sexuales masculinas y femeninas y sus receptores (Gochfeld, 2017).

Además, el examen histopatológico de hígado, riñón y corazón en ratas administradas con el EHPC, reveló lesiones de leves a moderadas, incluso en los animales tratados con las dosis más bajas del EHPC, en la prueba aguda (5000 mg/kg) y subaguda (250, 500 mg/kg). El hígado presentó daños más evidentes, que el riñón y el corazón, Sin embargo, para que una disfunción hepática sea clínicamente evidente, es necesario que más del 70 % del parénquima hepático se vea afectado, Esta puede ser una razón por la cual el rendimiento fisiológico de los animales no se vio afectado. Estudios demuestran que metabolitos como los flavonoides son transportados al hígado donde se produce un metabolismo adicional de fase I-II. Se ha reportado que el hígado es uno de los principales órgano blanco para fármacos y/o xenobióticos (Schroeter et al., 2002). El análisis histológico fue de utilidad para observar lesiones tempranas, causadas por los compuestos fenólicos presentes en el EHPC, aunque no representativo para observar disfunción hepática, renal o cardiovascular a nivel bioquímico. Otros estudio muestran datos similares (Elias et al., 2011). Sin embargo, (Thatiparthi et al., 2019), difere con nuestros resultados, encontraron que el pasto de cebada joven de 15 a 16 con de altura, administrado en dosis de 200 a 400 mg/kg por 60 días, mejoró el perfil lipídico alterado, el peso corporal y el IMC, enzimas hepáticas AST, ALT, ALP y fue potente antioxidante para mejorar los cambios necróticos inducidos en el modelo *in vivo* por una dieta alta en grasas. Las diferencias pueden deberse a la preparación del pasto de cebada, si bien nuestro estudio realizó un extracto hidroalcohólico, no así (Thatiparthi et al., 2019), quienes realizaron un jugo a partir del pasto de cebada.

El presente estudio, es el primero en la literatura que se centró en los posibles efectos adversos de un extracto hidroalcohólico de pasto de cebada. Sin embargo, las dosis de 250 y 500 mg/kg de peso corporal no fueron seguras

para establecer el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL). Los datos toxicológicos obtenidos de este estudio ayudarán a seleccionar las mejores dosis para futuros estudios y obtener la dosis inicial máxima recomendada (MRSD) para ensayos clínicos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## IX. CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico del pasto joven de cebada (*Hordeum vulgare*), en las dosis probadas en la prueba de toxicidad aguda y subaguda, mostraron el potencial para provocar cambios histopatológicos en órganos diana (hígado, riñón y corazón). Aunque se ha demostrado el potencial benéfico a la salud de esta planta. El presente estudio demostró que los fitoquímicos extraídos, a los que se les atribuye un efecto antioxidante, pueden inducir daños de leves a moderados en concentraciones elevadas y un período prolongado.

La necesidad de tener información sobre la seguridad en el consumo de plantas medicinales, es cada vez es más demandante, debido al aumento en el consumo alrededor del mundo y los efectos adversos que esto podrían tener como consecuencia de su abuso. Por ello las evidencias sugieren tener precaución y evitar el consumo indiscriminado de este tipo de plantas medicinales.

El presente estudio, contribuye en el área de investigación y desarrollo de extractos naturales, elaborados a partir de plantas con potencial benéfico a la salud. Sin embargo, los resultados sugieren que el pasto de cebada joven, debe evaluarse más a fondo, para garantizar dosis seguras en futuros estudios preclínicos. Además de obtener la dosis inicial máxima recomendada (MRSD) para ensayos clínicos.

El desarrollo de pautas nutricionales es fundamental para orientar a la población sobre el consumo de compuestos polifenólicos, presentes en una gran variedad de alimentos y hierbas medicinales, con el fin de prevención y mejora en la calidad de vida, en patologías de importancia en la salud pública, relacionadas con un desequilibrio oxidativo.

Debido a la pandemia por COVID-19, no fue posible concluir la prueba subaguda, como se tenía planeado en el presente estudio. Los grupos con las dosis más altas de 1000 mg/kg y el grupo satélite. Sin embargo, se verá la manera de continuar con la investigación, al reanudar actividades, por parte de las autoridades correspondientes.



## X. ANEXOS

### 10.1. Registro del peso prueba de toxicidad aguda

No. de rata	Peso inicial Día1		Peso día 7		Peso final día 14	
MACHOS						
	E	C	E	C	E	C
1						
2						
3						
HEMBRAS						
1						
2						
3						

(E): animales experimentales;(C): animal control.

10.2. Registro de peso prueba de toxicidad subaguda

No. de rata	Peso Día 1		Peso Día 7		Peso Día 14		Peso Día 21		Peso Día 28	
Grupo control										
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
1										
2										
3										
4										
5										
Dosis 250mg /kg										
1										
2										
3										
4										
5										
Dosis 500 mg/kg										
1										
2										
3										
4										
5										

M): Macho; (H): Hembra

### 10.3. Estudio observacional /test de irwin en ratas modifica

FECHA:	SEXO:	SUSTANCIA:	DOSIS:	RESPONSABLE:															
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
Tiempo minutos/horas/días	30 m	1h	2h	3h	4h	6h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
OJOS	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Enofalmia																			
Exofalmia																			
Posis palpebral																			
Nistagnus																			
Lacrimación																			
OREJAS																			
Palidez																			
Hiperemia																			
Cianosis																			
EFFECTOS GENERALES																			
Salivación																			
Erección de la cola																			
Piloerección																			
Micción																			
Diarrea																			
Movimiento circular																			
EFFECTOS SUBJETIVOS																			
Agresivo																			
Pasivo																			
Temeroso																			
MUERTE																			

Observaciones: \_\_\_\_\_

(-): Respuesta ausente; (+): Respuesta presente; (++): Respuesta exaltada; (E): animales experimentales; (C): animal control.

10.4. Registro peso de órganos

ID	HÍGADO	RIÑONES	CORAZÓN	BAZO	PÁNCREAS	TIMO	ESTÓMAGO	I.DELGADO	I.GRUESO
<b>MACHOS</b>									
EXP-01									
EXP-02									
EXP-03									
CT-01									
CT-02									
CT-03									
<b>HEMBRAS</b>									
EXP-01									
EXP-02									
EXP-03									
CT-01									
CT-02									
CT-03									

## XI. LITERATURA CITADA

Ademowo, O. S., H. K. I. Dias, C. Pararasa, and H. R. Griffiths. 2019. Nutritional Hormesis in a Modern Environment. In: *The Science of Hormesis in Health and Longevity*. Elsevier. p. 75–86.

Adewale, O. B., A. Onasanya, S. O. Anadozie, M. F. Abu, I. A. Akintan, C. J. Ogbole, I. I. Olayide, O. B. Afolabi, K. F. Jaiyesimi, B. O. Ajiboye, and A. O. Fadaka. 2016. Evaluation of acute and subacute toxicity of aqueous extract of *Crassocephalum rubens* leaves in rats. *J. Ethnopharmacol.* 188:153–158. doi:10.1016/J.JEP.2016.05.003.

Agathokleous, E., M. Kitao, and E. J. Calabrese. 2019. Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science. *Trends Plant Sci.* 24:318–327. doi:10.1016/J.TPLANTS.2019.01.004.

Algandaby, M. M. 2015. Assessment of acute and subacute toxic effects of the Saudi folk herb *Retama raetam* in rats. *J. Chinese Med. Assoc.* 78:691–701. doi:10.1016/j.jcma.2015.06.011.

Allen, D., S. Nogué, and N. Baker. 1998. Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis?

Araújo, M. C. de P. M., N. M. S. Barcellos, P. M. de A. Vieira, T. M. Gouveia, M. O. Guerra, V. M. Peters, and D. A. Saúde-Guimarães. 2017. Acute and sub chronic toxicity study of aqueous extract from the leaves and branches of *Campomanesia velutina* (Cambess) O. Berg. *J. Ethnopharmacol.* 201:17–25. doi:10.1016/J.JEP.2017.02.043.

Avellaneda, D. L. 2011. EVALUACIÓN EXPERIMENTAL EN ROEDORES, DE LA TOXICIDAD DE LA PROCAÍNA EN ALGUNOS ESQUEMAS DE UTILIZACIÓN COMO NEURAL TERAPÉUTICO.

Azam, S., N. Hadi, N. . Khan, and S. . Hadi. 2004. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol. Vitr.* 18:555–561. doi:10.1016/J.TIV.2003.12.012.

Badr, A., K. M. R. Sch, H. El Rabey, S. Effgen, H. H. Ibrahim, C. Pozzi, W. Rohde, and F. Salamini. 2000. On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* 17:499–510. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330.

Benedet, J. A., H. Umeda, and T. Shibamoto. 2007. Antioxidant Activity of Flavonoids Isolated from Young Green Barley Leaves toward Biological Lipid Samples. *J. Agric. Food Chem.* 55:5499–5504. doi:10.1021/jf070543t.

Bouayed, J., and T. Bohn. 2010. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3:228–37. doi:10.4161/oxim.3.4.12858.

Christapher, P. V., S. Parasuraman, M. Z. Asmawi, and V. Murugaiyah. 2017. Acute and subchronic toxicity studies of methanol extract of *Polygonum minus* leaves in Sprague

Dawley rats. Regul. Toxicol. Pharmacol. 86:33–41. doi:10.1016/J.YRTPH.2017.02.005.

COFEPRIS. 2018. La COFEPRIS y la Federación Nacional de Medicina Tradicional y Herbolaria, firman convenio de colaboración | Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios | Gobierno | gov.mx. Available from: <https://www.gob.mx/cofepris/prensa/la-cofepris-y-la-federacion-nacional-de-medicina-tradicional-y-herbolaria-firman-convenio-de-colaboracion>

Das, N., D. Goshwami, M. S. Hasan, and S. Z. Raihan. 2015. Evaluation of acute and subacute toxicity induced by methanol extract of Terminalia citrina leaves in Sprague Dawley rats. J. Acute Dis. 4:316–321. doi:10.1016/J.JOAD.2015.05.001.

Durán C, R., and A. Valenzuela B. 2010. LA EXPERIENCIA JAPONESA CON LOS ALIMENTOS FOSHU: ¿LOS VERDADEROS ALIMENTOS FUNCIONALES? Rev. Chil. Nutr. 37:224–233. doi:10.4067/S0717-75182010000200012.

E. Action. 1999. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. Br. J. Nutr. 81:S1–S27. doi:10.1017/S0007114599000471.

Ejike, C. E. C. C., M. Gong, and C. C. Udenigwe. 2013. Phytoalexins from the Poaceae: Biosynthesis, function and prospects in food preservation. Food Res. Int. 52:167–177. doi:10.1016/J.FOODRES.2013.03.012.

Elias, F., A. O. Latorre, F. Pípole, M. Haraguchi, S. L. Górnaiak, and I. M. Hueza. 2011. Haematological and immunological effects of repeated dose exposure of rats to integerrimine N-oxide from Senecio brasiliensis. Food Chem. Toxicol. 49:2313–2319. doi:10.1016/j.fct.2011.06.032.

Ferreres, F., P. B. Andrade, P. Valentão, and A. Gil-Izquierdo. 2008. Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1182:56–64. doi:10.1016/J.CHROMA.2007.12.070.

Ferreres, F., Z. Kršková, R. F. Gonçalves, P. Valentão, J. A. Pereira, J. Dušek, J. Martin, and P. B. Andrade. 2009. Free Water-Soluble Phenolics Profiling in Barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Agric. Food Chem. 57:2405–2409. doi:10.1021/jf8037727.

Freitas de Lima, F., G. K. Traesel, S. E. L. T. Menegati, A. C. dos Santos, R. I. C. Souza, V. S. de Oliveira, E. J. Sanjinez-Argandoña, C. A. L. Cardoso, S. A. Oesterreich, and M. do C. Vieira. 2017. Acute and subacute oral toxicity assessment of the oil extracted from *Attalea phalerata* Mart ex Spreng. pulp fruit in rats. Food Res. Int. 91:11–17. doi:10.1016/J.FOODRES.2016.11.019.

Galadari, S., A. Rahman, S. Pallichankandy, and F. Thayyullathil. 2017. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? Free Radic. Biol. Med. 104:144–164. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.01.004.

Giknis, M. L. A., B. Charles, and D. V. M. Clifford. 2006. CHARLES RIVER LABORATORIES Information Prepared by.

Gochfeld, M. 2017. Sex Differences in Human and Animal Toxicology. *Toxicol. Pathol.* 45:172–189. doi:10.1177/0192623316677327.

Goes, P., I. M. Melo, C. S. Dutra, A. P. S. Lima, and V. Lima. 2012. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Arch. Oral Biol.* 57:1537–1544. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.07.007.

Goldberg, I. 1994. Functional Foods. In: *Functional Foods*. Springer US, Boston, MA. p. 3–16.

Goldberg, I. 2012. *Functional foods : designer foods, pharmafoods, nutraceuticals*. Springer Science & Business Media.

Guldiken, B., G. Ozkan, G. Catalkaya, F. D. Ceylan, I. Ekin Yalcinkaya, and E. Capanoglu. 2018. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. *Food Chem. Toxicol.* 119:37–49. doi:10.1016/J.FCT.2018.05.050.

Guo, X., J. Ni, X. Dai, T. Zhou, G. Yang, J. Xue, and X. Wang. 2018. Biphasic regulation of spindle assembly checkpoint by low and high concentrations of resveratrol leads to the opposite effect on chromosomal instability. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 825:19–30. doi:10.1016/J.MRGENTOX.2017.11.004.

Han, Z.-Z., H.-D. Xu, Kwang-Ho Kim, T.-H. Ahn, J.-S. Bae, Ji-Young Lee, K.-H. Gil, Joo-Young Lee, S.-J. Woo, H.-J. Yoo, H.-K. Lee, Kap-Ho Kim, C.-K. Park, H.-S. Zhang, and S.-W. Song. 2010. Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague-Dawley Rats from Pre-clinical Toxicity Studies. *Lab. Anim. Res.* 26:153. doi:10.5625/lar.2010.26.2.153.

Hanem M. Awad, †, ‡, † Marelle G. Boersma, † Sjeff Boeren, §, || Peter J. van Bladeren, † and Jacques Vervoort, and †, §, || Ivonne M. C. M. Rietjens\*. 2001. Structure–Activity Study on the Quinone/Quinone Methide Chemistry of Flavonoids. doi:10.1021/TX000216E.

Horibe, I., Y. Satoh, Y. Shiota, A. Kumagai, N. Horike, H. Takemori, S. Uesato, S. Sugie, K. Obata, H. Kawahara, and Y. Nagaoka. 2013. Induction of melanogenesis by 4'-O-methylated flavonoids in B16F10 melanoma cells. *J. Nat. Med.* 67:705–710. doi:10.1007/s11418-012-0727-y.

Hostetler Gregory L, Ralston Robin A, S. S. J. 2017. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Adv Nutr.* 8:423–435. doi:10.3945/an.116.012948.

Idehen, E., Y. Tang, and S. Sang. 2017. Bioactive phytochemicals in barley. *J. Food Drug Anal.* 25:148–161. doi:10.1016/j.jfda.2016.08.002.

Ighodaro, O. M., and O. A. Akinloye. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 54:287–293. doi:10.1016/J.AJME.2017.09.001.

Ihsan, A., X. Wang, X. ju Huang, Y. Liu, Q. Liu, W. Zhou, and Z. hui Yuan. 2010. Acute and subchronic toxicological evaluation of Mequindox in Wistar rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*

57:307–314. doi:10.1016/j.yrtph.2010.03.011.

Ikeguchi, M., M. Tsubata, A. Takano, T. Kamiya, K. Takagaki, H. Ito, Y. Sugawa-Katayama, and H. Tsuji. 2014. Effects of young barley leaf powder on gastrointestinal functions in rats and its efficacy-related physicochemical properties. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2014:974840. doi:10.1155/2014/974840.

Jacobo, P., R. A. Ferriz, J. L. Chávez, J. E. Escobar, A. A. Feregrino, and C. Saldaña. 2018. Efecto antiproliferativo de un extracto de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) en modelos de cáncer in vitro. Universidad Autónoma de Querétaro.

Jagdeo, J., L. Adams, H. Lev-Tov, J. Sieminska, J. Michl, and N. Brody. 2010. Dose-dependent antioxidant function of resveratrol demonstrated via modulation of reactive oxygen species in normal human skin fibroblasts in vitro. *J. Drugs Dermatol.* 9:1523–6.

Johnson, M. 2012. *MATER METHODS.* 2:133.

Kamiyama, M., and T. Shibamoto. 2012. Flavonoids with Potent Antioxidant Activity Found in Young Green Barley Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 60:6260–6267. doi:10.1021/jf301700j.

Kapetanovic, I. M. 2013. Toxicity of Green Tea Polyphenols. *Tea Heal. Dis. Prev.* 1435–1447. doi:10.1016/B978-0-12-384937-3.00120-8.

Kifayatullah, M., M. S. Mustafa, P. Sengupta, M. M. R. Sarker, A. Das, and S. K. Das. 2015. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *J. Acute Dis.* 4:309–315. doi:10.1016/J.JOAD.2015.06.010.

Kong, A. N., R. Yu, C. Chen, S. Mandlekar, and T. Primiano. 2000. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch. Pharm. Res.* 23:1–16.

Kubatka, P., M. Kello, K. Kajo, P. Kruzliak, D. Výbohová, K. Šmejkal, P. Maršík, A. Zulli, G. Gönciová, J. Mojžiš, A. Kapinová, R. Murin, M. Pěč, M. Adamkov, and R. M. Przygodzki. 2016. Young Barley Indicates Antitumor Effects in Experimental Breast Cancer In Vivo and In Vitro. *Nutr. Cancer.* 68:611–621. doi:10.1080/01635581.2016.1154577.

Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi). 2014. Sprague Dawley. Available from: <http://lebi.ucr.ac.cr/index.php/es/2-uncategorised/5-sprague-dawley>

Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., and C. Fernández-Mejía. 2013. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. In: *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants.* InTech.

Li, S., S. Yuan, Q. Zhao, B. Wang, X. Wang, and K. Li. 2018. Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. *Biomed. Pharmacother.* 100:441–447. doi:10.1016/J.BIOPHA.2018.02.055.

Lü, J.-M., P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen. 2010. Chemical and molecular mechanisms of



antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* 14:840–60. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.

Manjunatha, B. K., S. M. Vidya, P. Dhiman, and R. Pallavi. 2005. Hepatoprotective activity of *Leucas hirta* against CC1 4 induced hepatic damage in rats.

Mathew, S., and T. E. Abraham. 2004. Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24:59–83. doi:10.1080/07388550490491467.

Matteo Bonoli, \*,†, † Vito Verardo, ‡ and Emanuele Marconi, and M. F. Caboni†. 2004. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. doi:10.1021/JF040075C.

Mattson, M. P., and A. Cheng. 2006. Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci.* 29:632–639. doi:10.1016/J.TINS.2006.09.001.

Mirończuk-Chodakowska, I., A. M. Witkowska, and M. E. Zujko. 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv. Med. Sci.* 63:68–78. doi:10.1016/J.ADVMS.2017.05.005.

Murakami, A. 2014. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents. *Arch. Biochem. Biophys.* 557:3–10. doi:10.1016/J.ABB.2014.04.018.

Murbach, T. S., R. Glávits, G. Hirka, J. R. Endres, A. E. Clewell, and I. P. Szakonyiné. 2017. A 28-day oral toxicology study of an aqueous extract of *Polypodium leucotomos* (Fernblock®). *Toxicol. Reports.* 4:494–501. doi:10.1016/j.toxrep.2017.09.002.

Nahdi, A., I. Hammami, R. Ben Ali, O. Kallech-Ziri, A. El May, and M. V. El May. 2018. Effect of *Hypericum humifusum* aqueous and methanolic leaf extracts on biochemical and histological parameters in adult rats. *Biomed. Pharmacother.* 108:144–152. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.034.

OCDE. 2008a. 425 OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP).

OCDE. 2008b. OECD/OCDE 407 OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents INTRODUCTION.

Ochiai, M., M. Nagao, K. Wakabayashi, and T. Sugimura. 1984. Superoxide dismutase acts as an enhancing factor for quercetin mutagenesis in rat-liver cytosol by preventing its decomposition. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 129:19–24. doi:10.1016/0027-5107(84)90118-0.

Olaniyan, J. M., H. L. Muhammad, H. A. Makun, M. B. Busari, and A. S. Abdullah. 2016. Acute and sub-acute toxicity studies of aqueous and methanol extracts of *Nelsonia campestris* in rats. *J. Acute Dis.* 5:62–70. doi:10.1016/J.JOAD.2015.08.006.

Olayode, O. A., M. O. Daniyan, and G. Olayiwola. 2019. Biochemical, hematological and histopathological evaluation of the toxicity potential of the leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis* in rats. *J. Tradit. Complement. Med.* doi:10.1016/j.jtcme.2019.05.001.

Oliveira, A. P., J. A. Pereira, P. B. Andrade, P. Valentão, R. M. Seabra, and B. M. Silva. 2007. Phenolic Profile of *Cydonia oblonga* Miller Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 55:7926–7930. doi:10.1021/jf0711237.

OMS. 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009.

OMS. 2018. Las 10 principales causas de defunción. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Opie, L. H. 2014. Cardiac Metabolism in Health and Disease. *Cell. Mol. Pathobiol. Cardiovasc. Dis.* 23–36. doi:10.1016/B978-0-12-405206-2.00002-8.

Pedras, M. S. C., and P. W. K. Ahiahonu. 2005. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry.* 66:391–411. doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2004.12.032.

Petterino, C., and A. Argentino-Storino. 2006. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57:213–219. doi:10.1016/j.etp.2005.10.002.

Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63:1035–42.

Poschenrieder, C., C. Cabot, S. Martos, B. Gallego, and J. Barceló. 2013. Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Sci.* 212:15–25. doi:10.1016/J.PLANTSCI.2013.07.012.

Purvi A. Shah, Mihir Y. Parmar, Vaishali T. Thakkar, T. R. G. 2009. Hepatoprotective activity of *hordeum vulgare* linn. seeds against ethanol-induced liver damage in rats. *Pharmacologyonline.* 2:538–545.

Ramachandran, B., S. Jayavelu, K. Murhekar, and T. Rajkumar. 2016. Repeated dose studies with pure Epigallocatechin-3-gallate demonstrated dose and route dependant hepatotoxicity with associated dyslipidemia. *Toxicol. Reports.* 3:336–345. doi:10.1016/J.TOXREP.2016.03.001.

SAGARPA. 2012. Plan rector sistema producto nacional cebada maltera.

Saleem, U., S. Amin, B. Ahmad, H. Azeem, F. Anwar, and S. Mary. 2017. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicol. Reports.* 4:580–585. doi:10.1016/J.TOXREP.2017.10.005.

Sánchez, J., E. Soriano, R. Girona, P. Pérez, and C. Viñets. 2002. ¿Por qué aumentan las fosfatasas alcalinas? *Atención primaria.* 29:241–245.

Sani, D., S. Saka, U. K. Sandabe, and S. I. Ngulde. 2009. Effect of intake of aqueous stem

extract of *Anisopus mannii* on haematological parameters in rats Application of *Ganoderma* spp. extract in the management of dermatological conditions in animals View project Malaria and malaria chemotherapy View project.

Schroeter, H., C. Boyd, J. P. E. Spencer, R. J. Williams, E. Cadenas, and C. Rice-Evans. 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging*. 23:861–880. doi:10.1016/S0197-4580(02)00075-1.

Singh, D. T., J. Oey, and I. Singh. 2018. Biomimetic Plant Foods: Structural design and functionality. *Trends Food Sci. Technol.* doi:10.1016/j.tifs.2018.09.010.

Smeriglio, A., L. Cornara, M. Denaro, D. Barreca, B. Burlando, J. Xiao, and D. Trombetta. 2019. Antioxidant and cytoprotective activities of an ancient Mediterranean citrus (*Citrus lumia* Risso) albedo extract: Microscopic observations and polyphenol characterization. *Food Chem.* 279:347–355. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2018.11.138.

Soto, Z., R. A. Ferriz, A. A. Feregrino, J. L. Chávez, and C. Saldaña. 2018. Cuantificación de fenoles totales, flavonoides, taninos y capacidad antioxidante de un pasto fresco, seco y liofilizado de cebada de la variedad esmeralda (*Hordeum vulgare*). Universidad Autónoma de Querétaro.

Spencer, J. P. ., M. M. Abd El Mohsen, and C. Rice-Evans. 2004. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch. Biochem. Biophys.* 423:148–161. doi:10.1016/J.ABB.2003.11.010.

Sullivan, P., E. Arendt, and E. Gallagher. 2013. The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods. *Trends Food Sci. Technol.* 29:124–134. doi:10.1016/j.tifs.2012.10.005.

Teo, S., D. Stirling, S. Thomas, A. Hoberman, A. Kiorpes, and V. Khetani. 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*. 179:183–196. doi:10.1016/S0300-483X(02)00338-4.

Thatiparthi, J., S. Dodoala, B. Koganti, and P. KVSRRG. 2019. Barley grass juice (*Hordeum vulgare* L.) inhibits obesity and improves lipid profile in high fat diet-induced rat model. *J. Ethnopharmacol.* 238:111843. doi:10.1016/J.JEP.2019.111843.

Thoennissen, N. H., J. O'Kelly, D. Lu, G. B. Iwanski, D. T. La, S. Abbassi, A. Leiter, B. Karlan, R. Mehta, and H. P. Koeffler. 2010. Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and -negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene*. 29:285–296. doi:10.1038/onc.2009.335.

Unuofin, J. O., G. A. Otunola, and A. J. Afolayan. 2018. Evaluation of acute and subacute toxicity of whole-plant aqueous extract of *Vernonia mespilifolia* Less. in Wistar rats. *J. Integr. Med.* 16:335–341. doi:10.1016/J.JOIM.2018.07.003.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44–84. doi:10.1016/J.BIOCEL.2006.07.001.

Vazquez-Medina, J. P. 2018. Redox Signaling and the Onset of the Inflammatory Cascade. *Immun. Inflamm. Heal. Dis.* 37–42. doi:10.1016/B978-0-12-805417-8.00003-2.

Wang, T., Q. Li, and K. Bi. 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* 13:12–23. doi:10.1016/J.AJPS.2017.08.004.

Williams, R. J., J. P. . Spencer, and C. Rice-Evans. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 36:838–849. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.01.001.

Woo, S. M., S.-C. Kwon, S. G. Ko, and S.-G. Cho. 2017. Barley grass extract causes apoptosis of cancer cells by increasing intracellular reactive oxygen species production. *Biomed. reports.* 6:681–685. doi:10.3892/br.2017.897.

Yamaura, K., N. Nakayama, M. Shimada, Y. Bi, H. Fukata, and K. Ueno. 2012. Antidepressant-like effects of young green barley leaf (*Hordeum vulgare* L.) in the mouse forced swimming test. *Pharmacognosy Res.* 4:22–6. doi:10.4103/0974-8490.91030.

Yang, B., H. Liu, J. Yang, V. K. Gupta, and Y. Jiang. 2018. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends Food Sci. Technol.* 79:116–124. doi:10.1016/J.TIFS.2018.07.006.

Ye, Q., N. Georges, and C. Selomulya. 2018. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends Food Sci. Technol.* 78:167–179. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.025.

Yehya, A. H. S., M. Asif, G. Kaur, L. E. A. Hassan, F. S. R. Al-Suede, A. M. S. Abdul Majid, and C. E. Oon. 2019. Toxicological studies of *Orthosiphon stamineus* (Misai Kucing) standardized ethanol extract in combination with gemcitabine in athymic nude mice model. *J. Adv. Res.* 15:59–68. doi:10.1016/j.jare.2018.05.006.

Yihang, L., L. Guang, S. Meifang, L. Xuelan, Z. Xia, L. Juan, and C. Xi. 2016. Acute toxicity study of *Aspidopterys obcordata* aqueous extract in Sprague-Dawley rats. *J. Tradit. Chinese Med.* 36:377–381. doi:10.1016/S0254-6272(16)30052-8.

Yu, Y.-M., W.-C. Chang, C.-S. Liu, and C.-M. Tsai. 2004. Effect of Young Barley Leaf Extract and Adlay on Plasma Lipids and LDL Oxidation in Hyperlipidemic Smokers.

Zahn, R., N. Perry, E. Perry, and E. B. Mukaetova-Ladinska. 2019. Use of herbal medicines: Pilot survey of Northern England (UK) users' views. *Complement. Ther. Med.* doi:10.1016/J.CTIM.2019.02.007.

Zeng, Y., Awe, X. Pu, J. Yang, J. Du, X. Yang, X. Li, L. Li, Y. Zhou, and T. Yang. 2018. Preventive and Therapeutic Role of Functional Ingredients of Barley Grass for Chronic Diseases in Human Beings. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018:3232080. doi:10.1155/2018/3232080.