



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

“Evaluación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante durante la germinación en diferentes variedades de cebada”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Licenciada en Química en Alimentos

PRESENTA:

Zirce Fabiola Martínez Becerril

DIRECTORAS:

Fabiola Araceli Guzmán Ortiz

Alma Delia Román Gutiérrez

Pachuca, Hgo. Noviembre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
 School of Engineering and Applied Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 18 de octubre de 2018

Número de control: ICBI-D/825/2018
 Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de Licenciatura en Química en Alimentos **Zirce Fabiola Martínez Becerril**, quien presenta el trabajo de titulación "**Evaluación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante durante la germinación en diferentes variedades de cebada**" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

- PRESIDENTE: M. en C. Juan Homero Roldán Rojas
- PRIMER VOCAL: Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz
- SEGUNDO VOCAL: Dr. Javier Castro Rosas
- TERCER VOCAL: Dra. Alma Delia Román Gutiérrez
- SECRETARIO: Dra. Elizabeth Contreras López
- PRIMER SUPLENTE: Dra. María Luisa Rodríguez Marín
- SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Esmeralda Rangel Vargas

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Castillo
 Director del ICBI



ORSC/SEPC

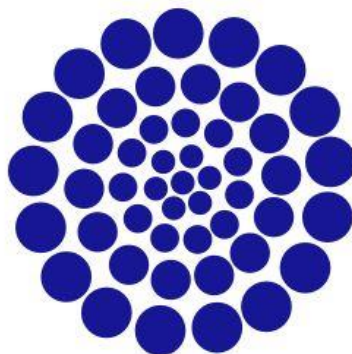


Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
 México, C.P. 42184
 Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2231
 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Alimentos II del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo del proyecto de cátedras CONACYT 1232 de “Nuevos productos innovadores que impacten a la salud del consumidor y a la industria alimentaria”.



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



ALFaNutra

La Red ALFaNutra
A través de la Universidad Autónoma de Querétaro

Otorga la presente constancia a:
Zirce Fabiola Martínez Becerril

Por su Ponencia de Cartel :

Efecto de la germinación en la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en la variedad de cebada Esmeralda

Co-autores:

Fabola Anceff, Guadalupe Ortiz, Alma Delia Rosales Gutiérrez, Javier Castro Rojas, Carlos Alberto Gómez Almagu.

Dentro del:



Realizado el 22 al 24 de junio de 2016 en las Instalaciones del Posgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Comité Organizador

Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Presidente de la Red-ALFaNutra



El Comité Organizador del Food & Biotechnology International Congress 2016

Otorga la Presente Constancia a:

**Martínez-Becerril Z. F., Guzmán-Ortiz F. A., Román-Gutiérrez A.
D., Gómez-Aldapa C. A., Castro-Rosas J.**

Por su participación con el trabajo:

“Evaluación de la Concentración de Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante en las Variedades de Cebada Perla y Cleopatra como Consecuencia del Proceso de Germinado”

Del 19 al 21 de Octubre de 2016, en la Ciudad de Pachuca, Hidalgo, México.

Dr. Alejandro Téllez Jurado
Universidad Politécnica de Pachuca
Comité Organizador - F&BIC2016

MC. Luis Díaz Batalla
Universidad Politécnica de Francisco I Madero
Comité Organizador - F&BIC2016

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Comité Organizador - F&BIC2016

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a Dios, a mi madre, a mi abuela
y a mi directora de Tesis.

Por ser parte importante en mi vida y por brindarme su apoyo incondicional a lo
largo de mi formación profesional.

Sé que sin todo su cariño, sacrificio, paciencia y confianza, este sueño no hubiera
sido posible.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por iluminar y mostrarme un camino repleto de sueños, ilusiones y grandes proyectos, por ponerme en el lugar y tiempo exactos para poder ingresar y culminar una carrera profesional. Las cosas siempre suceden por alguna razón.

Agradezco a mi madre, Marcela Becerril, por ser el pilar de mi vida entera, porque sin su amor y sacrificio todos mis estudios no hubieran sido posibles, así como muchos otros aspectos en mi vida. Gracias por siempre ponerme al frente de todo como prioridad. Gracias por todo el apoyo y la confianza brindada, por todos tus consejos y regaños, por todas tus preocupaciones, por estar siempre al pendiente de que no me faltara nada, pero sobre todo, gracias por tanto cariño.

Agradezco a mi abuela, Catalina Zepeda, por siempre preocuparse por mí y brindarme su apoyo incondicional.

Agradezco a la Dra. Fabiola Guzmán, por compartir su sabiduría conmigo y ser mi guía durante gran parte de mis estudios profesionales. Gracias por su paciencia, porque a pesar de tanto tiempo transcurrido siempre estuvo al pendiente de mí y mis proyectos, viendo y preocupándose siempre por mi futuro.

De igual manera, agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por abrirme las puertas de esta prestigiosa institución y brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que dentro de este pequeño paso en mi vida estuvieron presentes brindándome su cariño y apoyo:

Al resto de mi familia, por su apoyo y preocupación

A la Familia García Castillo por abrirme las puertas de su casa. Porque estando en una ciudad extraña para mí, me hicieron sentir como en casa.

A todos mis profesores por compartir su conocimiento conmigo y mis compañeros.

Gracias infinitas a todos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	XI
RESUMEN	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 LOS CEREALES Y LA ALIMENTACIÓN HUMANA	3
2.2 LA CEBADA.....	3
2.3 GERMINACIÓN DE LOS GRANOS DE CEBADA	5
2.3.1 Tratamientos previos.....	6
2.3.2 Remojo.....	6
2.3.3 Germinación.....	8
2.3.3.1 Generación de metabolitos secundarios durante la germinación.....	9
2.3.4 Secado.....	13
2.4 COMPUESTOS BIOACTIVOS	14
2.4.1 Compuestos fenólicos.....	15
2.4.1.1 Flavonoides.....	17
2.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	19
2.5.1 Método del radical catiónico ABTS^{•+}.....	21
2.5.2 Ensayo del radical libre DPPH[•].....	22
2.5.3 Análisis FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS.....	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. HIPÓTESIS.....	24
6. DISEÑO METODOLÓGICO	24
7. METODOLOGÍA.....	25
7.1 PROCESO DE GERMINACIÓN.....	25
7.2 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	25
7.2.1. Extracción de compuestos fenólicos totales.....	25
7.2.2. Preparación de la curva estándar y tratamiento de la muestra.....	26
7.2.3. Cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales.....	27
7.2.4. Preparación de reactivos.....	27
7.3 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	27
7.3.1. Extracción de flavonoides.....	27
7.3.2. Procedimiento para la cuantificación de flavonoides.....	28

7.3.3. Cálculo de la concentración de flavonoides	28
7.3.4. Preparación de reactivos	28
7.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ABTS	29
7.4.1. Cálculo del porcentaje de inhibición	29
7.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE DPPH.....	30
7.5.1. Cálculo del porcentaje de actividad antirradical	30
7.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE FRAP	30
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
8.1 PROCESO DE GERMINACIÓN.....	32
8.2 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	35
8.3 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	37
8.3 ANÁLISIS ABTS	39
8.4 ANÁLISIS DPPH.....	41
8.5 ANÁLISIS FRAP	42
9. CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	45

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PREPARACIÓN DE LA CURVA TIPO DE ÁCIDO GÁLICO.	26
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PLANTA DE CEBADA	4
FIGURA 2. GRANO DE CEBADA.....	4
FIGURA 3. PRODUCCIÓN Y LIBERACIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS Y ABSORCIÓN DE NUTRIENTES DURANTE LA FASE DE GERMINACIÓN DEL GRANO DE CEBADA	8
FIGURA 4. RELACIÓN GENERALIZADA ENTRE EL METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO. PROCESOS SECUNDARIOS RESALTADOS EN COLOR ROJO	10
FIGURA 5. SÍNTESIS DE FOSFOENOLPIRUVATO Y ERITROSA 4-FOSFATO	11
FIGURA 6. RUTA DEL SHIKIMATO O ÁCIDO SHIKÍMICO Y SÍNTESIS DEL CORISMATO.....	12
FIGURA 7. CORISMATO COMO SUSTRATO PARA LA SÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS	12
FIGURA 8. SÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	13
FIGURA 9. ESTRUCTURAS BÁSICAS Y TIPOS DE FLAVONOIDES	17
FIGURA 10. CRECIMIENTO DE RADÍCULA DE CEBADA ESMERALDA DURANTE 1-7 DÍAS DE GERMINACIÓN ..	32
FIGURA 11. CRECIMIENTO DE RADÍCULA DE CEBADA PERLA DURANTE 1-7 DÍAS DE GERMINACIÓN	33
FIGURA 12. CRECIMIENTO DE RADÍCULA DE CEBADA CLEOPATRA DURANTE 1-7 DÍAS DE GERMINACIÓN...	33
FIGURA 13. ELONGACIÓN DE RADÍCULA PARA CADA UNA DE LAS VARIEDADES DE CEBADA ESTUDIADAS ...	34
FIGURA 14. CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	37
FIGURA 15. CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES	38
FIGURA 16. CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DEL RADICAL ABTS	40
FIGURA 17. CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DEL RADICAL DPPH	42
FIGURA 18. CAPACIDAD DE OXIDACIÓN DEL IÓN Fe^{+2}	43

ÍNDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. CÁLCULO DE MG EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO ($100\text{ G DE MUESTRA}^{-1}$)	27
ECUACIÓN 2. CÁLCULO DE MG EQUIVALENTES DE QUERCETINA ($100\text{ G DE MUESTRA}^{-1}$).....	28
ECUACIÓN 3. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CATIÓN $ABTS^+$	29
ECUACIÓN 4. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ANTIRRADICAL EN EL ANÁLISIS DE DPPH	30

RESUMEN

La cebada se germina con el fin de producir alimentos y bebidas fermentadas, debido a su alta actividad enzimática, pero pocos son los análisis en alimentos que enfocan su interés en la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos de este cereal pueden proporcionar. El propósito de este estudio fue examinar la actividad antioxidante de algunas variedades de cebada cultivadas en el estado de Hidalgo, con el fin de cuantificar y observar el comportamiento de los antioxidantes naturales de este cereal como compuestos fenólicos y flavonoides, cuyo consumo se ha asociado a una disminución en la aparición de enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas que están en crecimiento.

Se germinaron tres variedades de cebada (Esmeralda, Perla y Cleopatra) durante 7 días a 26°C. Posteriormente se midió la elongación de radícula con el fin de estudiar la relación entre el crecimiento de radícula y la concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides, así como la actividad antioxidante ligada a estos. La concentración de fenoles totales presenta un incremento de 4.2, 1.8 y 1.5 veces para las variedades Esmeralda, Perla y Cleopatra respectivamente. La concentración de flavonoides no incrementa conforme el paso de la germinación; los granos de cebada sin germinar mostraron alrededor de un 47% más de concentración en comparación con la concentración obtenida durante 7 días de germinación. La actividad antioxidante se cuantificó utilizando el ensayo de ABTS, DPPH y FRAP. ABTS presentó un incremento en la actividad antioxidante de 2.1, 10.6 y 3.4 veces para las variedades Esmeralda, Perla y Cleopatra, respectivamente; DPPH presentó un incremento en la actividad antioxidante de 1.2, 1.5 y 1.3 veces para las variedades Esmeralda, Perla y Cleopatra, respectivamente; ambos ensayos al séptimo día de germinación en comparación con los granos de cebada sin germinar de cada una de las variedades. El ensayo FRAP por otro lado, presentó el mayor incremento en la actividad antioxidante al primer día de germinación en comparación con los granos de cebada sin germinar de cada una de las variedades, con valores de 0.91, 0.84 y 0.82 veces para las variedades Esmeralda, Perla y Cleopatra, respectivamente.

Los resultados mostraron que el proceso de germinación en las 3 variedades de cebada estudiadas, favorece el incremento de la concentración de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

Los cereales constituyen un grupo de plantas de suma importancia para la alimentación humana y animal, a nivel mundial y nacional (Robles, 1990) gracias a su alto contenido en macro y micronutrientes (Ramos Gamiño, 2013).

En México, la cebada es uno de los cuatro principales cereales revestidos que se canalizan para alimentación animal, y pocas son las variedades de éste grano que se canalizan a consumo humano directo o a la fabricación de alimentos. Generalmente, las variedades de cebada que se comercializan para consumo humano están sujetas a algún tipo de procesamiento, como lo es la germinación (González Aguilar & col., 2012).

La germinación es el término utilizado para definir el conjunto de fenómenos por los cuales pasa el embrión o radícula, que se halla en estado de vida latente dentro de una semilla o grano, para activar su proceso de crecimiento y desarrollarse hasta formar una plántula (Courtis, 2013). Dentro de los cereales más utilizados para proceso de germinación se encuentra la cebada, debido a su alta actividad diastásica o también llamada actividad enzimática, útil en la industria alimentaria para la producción de alimentos y bebidas fermentadas (Sharma & col., 2012). El proceso de germinación modifica el sabor, la apariencia y las propiedades tecnológicas de los granos; ésta modificación de atributos se lleva a cabo debido a la alteración estructural interna y a la síntesis de nuevos compuestos conocidos como bioactivos que pueden aumentar la estabilidad y el valor nutricional de los granos (Chinma & col., 2015).

Los compuestos bioactivos generados durante la germinación de los granos, también llamados fitoquímicos o fitonutrientes, son metabolitos secundarios de origen vegetal cuya clasificación puede estar dada por diversas cualidades o constituyentes de sus moléculas, aunque una de sus principales clasificaciones se establece debido a su función biológica, en: antioxidantes, anticancerígenos, hipocolesterolémicos, antiinflamatorios, osteogénicos (promueven la formación de los huesos), antibacteriales, entre otros (Badui Dergal & col., 2006).

Durante el proceso de germinación se han logrado evaluar diversos fitoquímicos con una alta actividad antioxidante, como lo son los compuestos fenólicos, entre los cuales destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles; u otros como las isoflavonas y el glutatión (Fernandez-Orozco & col., 2008). La importancia del estudio de éstos compuestos se enfoca principalmente a la protección del ADN, las proteínas y las membranas lipídicas de los daños

oxidativos en los sistemas biológicos; además, son potencialmente efectivos en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas que actualmente están en crecimiento (Ragae & col., 2006). En éste sentido, los compuestos antioxidantes con mayor concentración y capacidad antioxidante en los granos de cereal germinado, son los compuestos fenólicos (Fogarasi & col., 2015).

En este trabajo se cuantificaron los compuestos fenólicos totales y flavonoides, así como la actividad antioxidante, con de fin de observar la relación de dichos compuestos con el proceso de germinación en diferentes variedades de cebada.

2. ANTECEDENTES

2.1 Los cereales y la alimentación humana

Los cereales constituyen un grupo de plantas, llamadas gramíneas, de suma importancia para la alimentación humana y animal, a nivel mundial y nacional (Robles, 1990).

Gracias a su contenido de almidón, vitaminas, fibra dietética y azúcares de descomposición lenta, así como a su aportación de proteínas, carbohidratos y minerales, los cereales son una de las fuentes más importantes de nutrientes, y han constituido, durante siglos, un elemento fundamental para la alimentación de la humanidad (Ramos Gamiño, 2013). Además, su consumo es adecuado para cualquier edad o condición económica y cultural, debido a su capacidad para provocar pronta saciedad, sus costos relativamente bajos, su versatilidad y su facilidad de tratamiento agrícola, agroindustrial o culinario (FAO, 2005).

2.2 La cebada

La planta de la cebada (*Hordeum vulgare*) es uno de los nueve cereales conocidos, sus cañas llegan a medir un aproximado de 50 cm de altura y son coronadas por una espiga que aloja el grano, el cual suele tener hojas estrechas y un color verde claro. En el punto en que el limbo se separa del tallo se desarrollan dos estípulas que se cruzan por delante del tallo. Es una planta autógena (capaz de realizar una reproducción por autofecundación) y sus flores tienen tres estambres y un pistilo de dos estigmas. Las espiguillas se encuentran unidas directamente al raquis, cubriéndose unas a otras. Las glumas son alargadas y agudas en su vértice, y las glumillas están adheridas al grano (Figura 1 y 2) (Serna, 2001). Es un grano poco exigente en cuanto al clima, gracias a ello su cultivo se encuentra muy extendido en todo el país y en gran parte del mundo; aunque crece mejor en los climas frescos y moderadamente secos. Requiere poca acumulación de calor para madurar, y por ello puede sembrarse bien a diferentes altitudes y zonas geográficas. En las zonas templadas y frías la cebada alcanza entre 70 cm a más de un metro de altura. En general, es un grano que está adaptado a muchas condiciones ambientales (SIAP, 2014).



Figura 1. Planta de cebada

(SIAP, 2014)



Figura 2. Grano de cebada

(SIAP, 2014)

La cebada a pesar de no encontrarse entre los granos de cereal con mayor importancia comercial, es un cereal cuya extensión agrícola es sumamente amplia. A nivel mundial los principales países productores de cebada son Alemania, Australia, Canadá, República Checa, China, Dinamarca, España, E.U., Finlandia, Francia, Irán y Kazajstán. En México, las principales áreas de producción de cebada se encuentran en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y México, así como en las regiones templadas semisecas y subhúmedas con lluvias en el verano, como lo es Jalisco. (SAGARPA, 2014).

Dentro de las múltiples variedades de cebada cultivadas principalmente en México encontramos a la Esmeralda, Perla, Cleopatra, Josefa, entre otras. Se dice que la primera variedad de cebada desarrollada en el país fue la Esmeralda, debido a su gran tolerancia a climas extremos y enfermedades (SAGARPA, 2014).

En México, la cebada es uno de los cuatro cereales principales que se canalizan para alimentación animal (exceptuando a las aves debido al alto contenido de β -glucanos), y pocas son las variedades de éste grano que se canalizan a consumo humano directo o a la fabricación de alimentos. Generalmente los granos de cebada que se comercializan para consumo humano directo están sujetos a algún tipo de procesamiento que puede incluir molienda, germinación, extracción con calor, extrusión, hojuelado, o bien, pueden ser de alguna manera alterados con el fin de elaborar productos más deseables para el consumidor (González Aguilar & col., 2012).

Para fines de este trabajo se decidió estudiar el comportamiento de 3 variedades de cebada cultivadas en el estado de Hidalgo. La variedad Esmeralda al ser una de las más conocidas en México además de contar con un vasto revestimiento de

glumas. La variedad Perla, por ser un grano utilizado generalmente sin cascarilla. Y por último la variedad Cleopatra, por ser un grano de color más oscuro y falto de revestimiento.

2.3 Germinación de los granos de cebada

La germinación es un término utilizado para definir el conjunto de fenómenos por los cuales el embrión o radícula, que se halla en estado de vida latente dentro de una semilla o grano, pasa para activar su proceso de crecimiento y desarrollarse hasta formar una plántula (Courtis, 2013). Es considerada una tecnología económica y efectiva de alteración de un grano, que involucra cambios fisiológicos, síntesis y rompimiento de macronutrientes para mejorar la calidad del grano, y por consiguiente incrementar su digestibilidad y valor nutrimental, además de modificar el sabor, la apariencia y las propiedades tecnológicas de dichos granos (Fernandez-Orozco & col., 2008).

Dentro de los cereales más utilizados para un proceso de germinación se encuentra la cebada, debido a su alta actividad diastásica o también llamada actividad enzimática, útil en la industria alimentaria para la producción de alimentos y bebidas fermentadas (Sharma & col., 2012). Los granos de cebada sometidos a este proceso, son utilizados para elaborar productos como la cerveza, whisky, jarabes, sustitutos de café o productos de panificación (Serna, 2001).

En este sentido, la alta actividad diastásica de la cebada germinada es el resultado de la calidad estructural del grano y de las condiciones del proceso de germinación. (González Aguilar & col., 2012).

Según Courtis (2013), para la obtención de un grano germinado de buena calidad, con una actividad diastásica deseable y apto para la fabricación de alimentos de consumo humano, deben cumplirse tres condiciones básicas: la primera y más importante es que el embrión sea viable, es decir, que esté vivo y no presente daños físicos que impidan su crecimiento. La segunda es que los factores externos sean favorables para el crecimiento de la plántula, y de ser posible, que estén controlados; entre los factores externos críticos de crecimiento destacan el aporte suficiente de agua, oxígeno y luz, además de una temperatura apropiada. Finalmente, es necesario que la semilla no presente factores internos que impidan la germinación, como por ejemplo la composición química del grano o su madurez. Zhou & col. (2013) por su parte, reportaron algunos otros factores a considerar, tales como la variedad de cebada y el manejo poscosecha, según sea el fin de los germinados.

La germinación del grano de cebada se da aproximadamente entre 2 y 6 días, hasta la aparición de las primeras hojas; a partir de este momento el grano germinado recibe el nombre de plántula (Courtis, 2013). Cada variedad de cebada germina y crece de diferente manera, aunque las condiciones sean las mismas (Zhou & col., 2013).

El primer signo de la germinación es la protrusión de un punto blanco en el hilum de la semilla, el cual protege a la radícula para su crecimiento; lo que propicia que el grano pierda su rigidez (Zhou & col., 2013)

Según Serna (2001) la germinación comprende cuatro etapas primordiales para la obtención de un germinado de calidad, dichas etapas son descritas a continuación:

- ❖ Tratamientos previos
- ❖ Remojo (imbibición de agua)
- ❖ Germinación
- ❖ Secado

2.3.1 *Tratamientos previos*

Antes de germinar la cebada es necesario realizar una clasificación o selección de los granos viables, seguido de una limpieza y desinfección de estos. La clasificación o selección es una operación que se realiza por cribado o de manera manual y consiste en la separación de materia gruesa, impurezas, otros granos, o bien, granos dañados (quemados, helados, chupados, contaminados por hongos, entre otras). Una vez seleccionados los granos, estos se limpian con abundante agua (evitando el uso de jabón) con el fin de eliminar restos terrosos o algunas otras sustancias que puedan ser arrastradas fácilmente a chorro de agua (Serna, 2001). Posteriormente se realiza una desinfección con cloro o hipoclorito de sodio en bajas concentraciones (en un rango de 0.001-0.007%), o algún otro desinfectante que no perjudique o se adsorba en el grano y pueda afectar el producto alimentario a realizar (Zhou & col., 2013).

2.3.2 *Remojo*

El remojo o imbibición tiene como principal objetivo hidratar al grano bajo condiciones aeróbicas, de tal manera que la humedad absorbida propicie la generación de fitohormonas giberélicas que desencadenen el suceso fisiológico de la germinación (Serna, 2001).

La imbibición es un fenómeno físico y se realiza mediante una simple inmersión de los granos en contenedores con agua, o en algunos pocos casos por aspersión en depósitos que ayuden a la absorción de agua o que contengan algún material que ayude a acumular la mayor humedad posible (sin saturar al grano). Posteriormente el agua penetra en el grano por difusión a través del germen o endospermo, atravesando fácilmente las glumas o glumillas (si el grano las contiene) (González Aguilar & col., 2012).

La duración de la hidratación de un grano es variable según la especie a germinar y el tipo de sustancias de reserva que contenga; aquellos granos con endosperma amiláceo (como lo es el caso de los cereales en general) tienen un grado de hidratación menor que los granos que presentan endosperma proteico (como lo es el caso de las legumbres), que son altamente hidratables (Pita & col., 1998).

La tasa de imbibición se ve afectada por diversos factores que pueden determinar la respuesta de los granos a la germinación, como lo son la permeabilidad, la cantidad de sales en el agua de remojo, la superficie de contacto, entre otros (Courtis, 2013). Algunos de los factores más importantes son:

- ❖ **Temperatura:** las altas temperaturas favorecen el crecimiento microbiano o proliferación de hongos, desestabilizando la producción o balance de fitohormonas y reguladores de crecimiento, disminuyendo la disponibilidad de oxígeno para que el embrión se desarrolle y provocando una mala absorción de agua (Herrera & col., 2016). Por otro lado, las bajas temperaturas pueden provocar un escaso crecimiento y desarrollo de las plantas, además de la aparición de anormalidades en raíces, impidiendo una buena nutrición de la futura planta (Courtis, 2013). En este sentido, el intervalo de temperatura del agua empleada para remojo oscila entre 10-20°C o bien a temperatura ambiente (Zhou & col., 2013).
- ❖ **Déficit o exceso hídrico:** la velocidad de germinación de un grano suele ser menor cuando la semilla ha estado sometida a déficit hídrico, además de ser más susceptible a las infecciones por hongos; y un exceso de agua puede llegar a ser desfavorable, dificultando la llegada de oxígeno al embrión (Pita & col., 1998). Es por eso que algunos autores como González Aguilar & col. (2012) sugieren una proporción de hidratación de 1:3 (grano:agua).
- ❖ **Velocidad de hidratación:** una rápida hidratación puede provocar alteraciones de tipo mecánico (rotura del eje embrionario) que afectan a la germinación y al posterior establecimiento de la plántula (Pita & col., 1998). En general, el remojo se lleva a cabo durante 12-24 h (en cereales y dependiendo el grano a germinar) y es controlado mediante el drenaje de

agua y restitución de la misma cada 8 horas aproximadamente (Zhou & col., 2013).

Para el caso de los granos de cebada, la tasa de imbibición oscila entre 30 y 60% del peso de la semilla seca, según la variedad. Sin embargo, el aumento en la tasa de hidratación no solo se da durante el proceso de remojo, si no también conforme avanza la germinación; siendo más alta al comienzo del proceso y decayendo hasta la aparición de la radícula (Courtis, 2013).

2.3.3 Germinación

Mediante la absorción/difusión de agua y la generación de giberelinas, que se llevan a cabo durante el proceso de remojo, se sintetizan en el albumen del grano algunas enzimas como amilasas, maltasas, dextrinasas y lipasas, entre otras, las cuales rompen el endosperma amiláceo y otros nutrientes de estructura compleja, almacenados en el endospermo o en los cotiledones dentro del grano, a estructuras más simples como la glucosa o azúcares fermentables, ácidos grasos libres, aminoácidos y otros compuestos secundarios, con el fin de proveer a dicho grano de nutrientes y energía para lograr la división celular del embrión (Figura 3) y un posterior desarrollo de radícula, seguido de la generación de la nueva plántula. A este proceso se le conoce como germinación (Cornejo & col., 2015; Courtis, 2013).

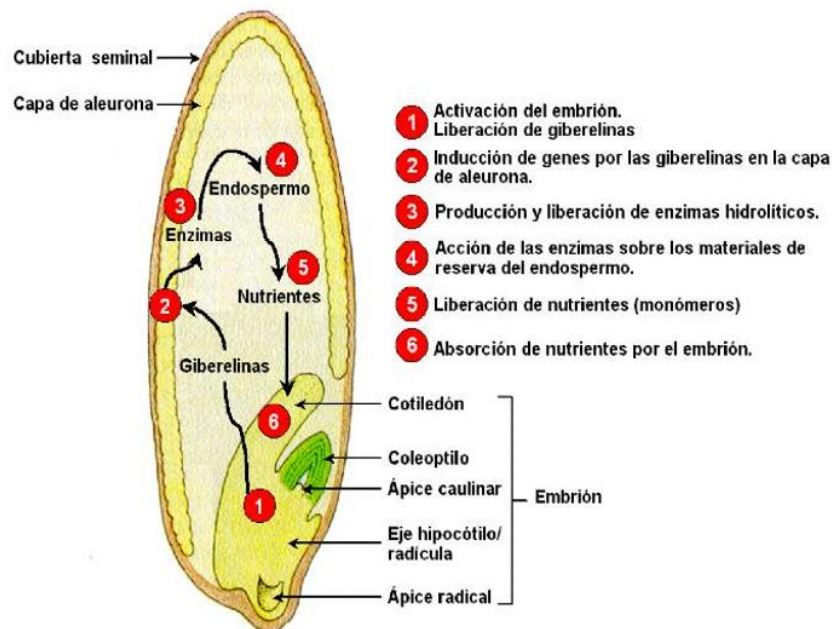


Figura 3. Producción y liberación de enzimas hidrolíticas y absorción de nutrientes durante la fase de germinación del grano de cebada

(Courtis, 2013)

Esta etapa se caracteriza por el incremento en la actividad metabólica del grano para que el embrión rompa las cubiertas seminales e inicie el desarrollo de la radícula, posteriormente la plántula; esto implica un elevado gasto de energía que se obtiene mediante la movilización de reservas nutritivas de la semilla. Aunado a esto, el grano comienza a generar metabolitos secundarios, conocidos como compuestos bioactivos, fitoquímicos o fitonutrientes, que aparentemente no están involucrados en procesos celulares basales (como la biosíntesis, respiración o síntesis de proteínas y ácidos nucleicos) pero son prescindibles en la supervivencia inmediata del grano (Cornejo & col., 2015; Courtis, 2013).

2.3.3.1 Generación de metabolitos secundarios durante la germinación

Los compuestos bioactivos generados a partir de la germinación juegan un papel muy importante en la habilidad que tienen las plántulas de contrarrestar el ataque de patógenos o de cualquier otro factor externo, o bien, son los responsables de generar algunas características propias de la especie a germinar, tales como el color o la estructura. Entre los compuestos bioactivos más estudiados se incluye de manera general a las ligninas y compuestos fenólicos como los flavonoides. (Cornejo & col., 2015; Fogarasi & col., 2015).

Cornejo & col. (2015) reportaron que la defensa bioquímica de una plántula en crecimiento representa una respuesta muy importante de su sistema inmune. La correlación entre la concentración de metabolitos secundarios y la tasa de crecimiento de la plántula normalmente se mantiene en equilibrio. Sin embargo, las plántulas tienen recursos limitados para satisfacer sus procesos fisiológicos y solo cuando su crecimiento está restringido por diversos factores (fisiológico y/o ecológico), se activa la desviación de carbono hacia la producción de metabolitos secundarios.

Rao & col. (2004) reportaron que no solo los factores fisiológicos y/o ecológicos causan la producción de compuestos bioactivos como defensa bioquímica en germinados, también, dicha producción puede activarse sin la necesidad de un factor de estrés. Una vez que la radícula de un grano en germinación haya roto por completo su cubierta seminal, absorba la mayor parte de nutrientes esenciales para su crecimiento y su desarrollo sea constante, la plántula comenzará la producción de compuestos bioactivos como mecanismo de defensa a posibles afecciones. Este proceso tiene lugar entre los días 3-4 de germinación.

La obtención de compuestos bioactivos en granos germinados se produce a partir de la movilización de compuestos de reserva y la vía de los fenilpropanoides (Cornejo & col., 2015; Herrera & col., 2016; Tzin & col., 2010).

La movilización de compuestos de reserva es un proceso que inicia cuando los macronutrientes del endospermo del grano son degradados mediante la actividad diastásica, con el fin de dejar disponibles los nutrientes necesarios para el crecimiento radicular de la planta o bien, para el comienzo de la vía de los fenilpropanoides. Durante este proceso, algunos compuestos bioactivos conjugados a nutrientes como polisacáridos y proteínas, principalmente, quedan libres para poder actuar si es necesario (Cornejo & col., 2015).

La vía de los fenilpropanoides es un paso transitorio entre el metabolismo primario y secundario en las plántulas, que da como resultado diversos compuestos bioactivos obtenidos a partir de la estructura de carbono de la fenilalanina, entre los que se incluyen ligninas y compuestos fenólicos como los flavonoides (Figura 4). Este proceso consiste en una serie de reacciones que tienen como sustrato principal los azúcares liberados a partir de la movilización de compuestos de reserva. El almidón hidrolizado del endospermo deja moléculas libres de glucosa que entran a la ruta del ácido Shikímico o Shikimato para obtener, mediante reacciones enzimáticas, la eritrosa 4-fosfato y el fosfoenolpiruvato procedentes de la vía de las pentosas y glucólisis, respectivamente (Figura 5) (Herrera & col., 2016; Tzin & col., 2010)

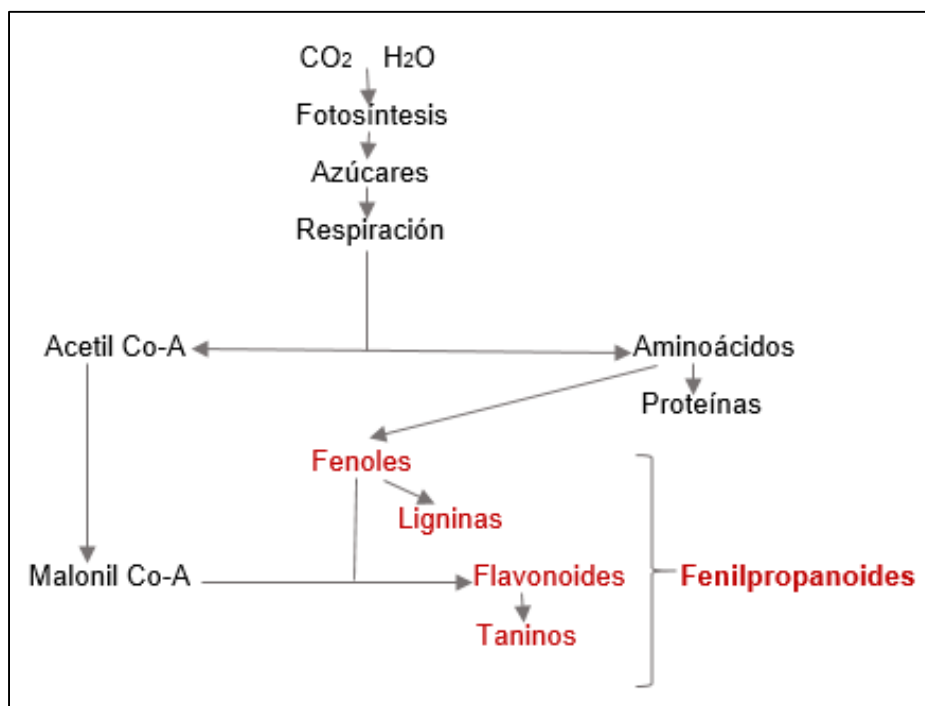


Figura 4. Relación generalizada entre el metabolismo primario y secundario. Procesos secundarios resaltados en color rojo

(Herrera & col., 2016)



Figura 5. Síntesis de fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato

(Tzin & col., 2010)

A partir de la eritrosa 4-fosfato y el fosfoenolpiruvato se inicia una secuencia de reacciones que dan origen al corismato (Figura 6). El corismato es un metabolito central en la síntesis de productos primarios y es el sustrato de dos enzimas (Antralinato sintasa y Corismato mutasa) que actúan para definir diferentes rutas específicas que conducen a la formación de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptófano y tirosina (Figura 7) (Herrera & col., 2016; Tzin & col., 2010).

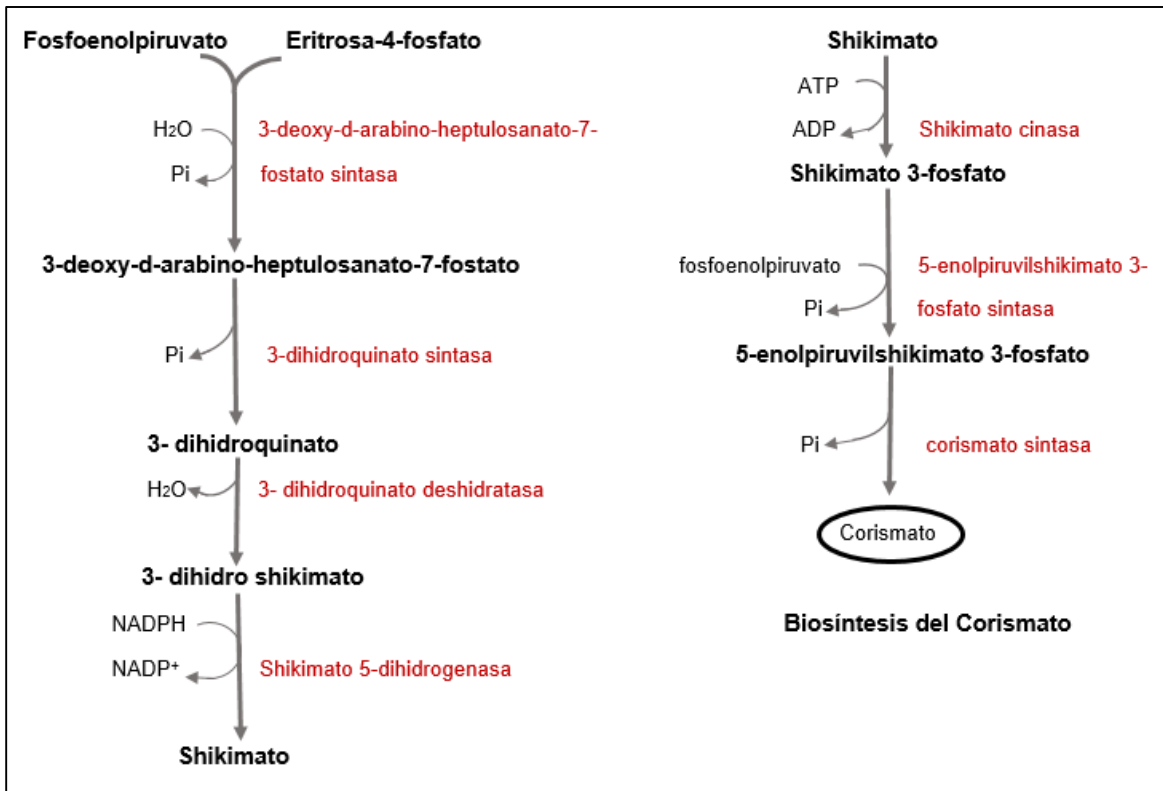


Figura 6. Ruta del Shikimato o ácido Shikímico y síntesis del corismato

(Tzin & col., 2010)

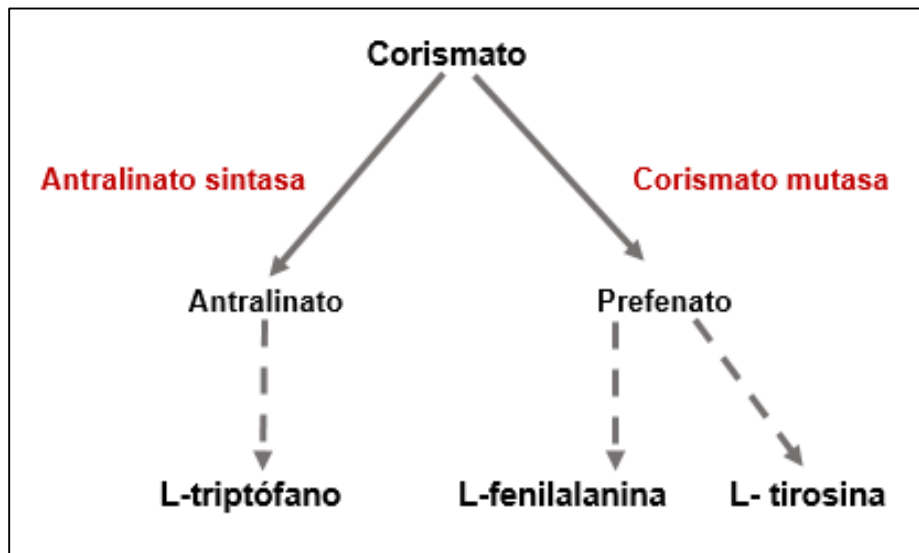


Figura 7. Corismato como sustrato para la síntesis de aminoácidos aromáticos

(Tzin & col., 2010)

Una vez sintetizada la fenilalanina, la activación de la fenilalanina amonoliasa (PAL, por sus siglas en inglés) es el primer paso en el metabolismo de los fenilpropanoides, es decir, la activación de esta enzima desencadena la producción de compuestos fenólicos, como flavonoides, antocianinas y taninos entre otros (Figura 8), por medio de diferentes rutas biosintéticas (Herrera & col., 2016; Tzin & col., 2010).

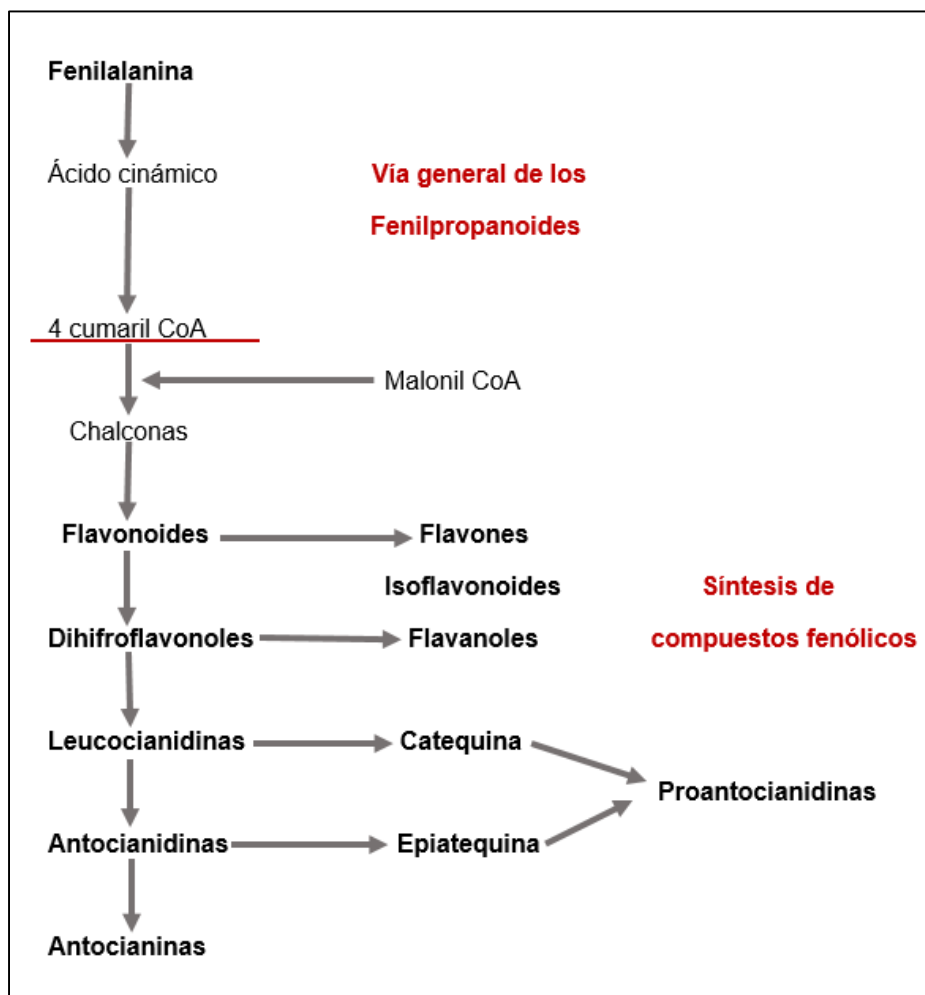


Figura 8. Síntesis de compuestos fenólicos

(Tzin & col., 2010)

2.3.4 Secado

El secado es una operación que consiste en someter al grano de cebada ya germinado a una temperatura de 40-45°C para detener el desarrollo botánico de la

cariópside y obtener productos aptos para la producción de diversos alimentos (Serna, 2001).

Algunos autores no consideran el secado dentro de las etapas de germinación, sin embargo, es una operación importante que tiene como objetivo detener, en un tiempo establecido, el proceso de germinación de un grano, para obtener un producto estable, con características deseables de actividad diastásica y concentraciones de compuestos bioactivos (Courtis, 2013).

En los últimos diez años, las investigaciones sobre compuestos bioactivos, en cereales y legumbres germinadas, han ido aumentando dado el interés de los consumidores en obtener productos que contengan dichos compuestos. Estos estudios han demostrado que las modificaciones de los granos germinados dan lugar a compuestos bioactivos que pueden aumentar la estabilidad y el valor nutricional de los granos (Chinma & col., 2015), además de ser considerados “benéficos a la salud” (Ragaei & col., 2006).

2.4 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son metabolitos secundarios que cumplen con diversas funciones biológicas, la más importante es actuar como agentes protectores de una plántula en crecimiento (Mareček & col., 2017). Durante el proceso de germinación de un grano se han logrado evaluar algunos de estos compuestos, tales como isoflavonas, glutatión y compuestos fenólicos, entre los que destacan flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles (Fernandez-Orozco & col., 2008).

Una de las razones de estudio de los compuestos bioactivos es la funcionalidad biológica que estos presentan (Liu & col., 2007) a partir del crecimiento de una nueva plántula; como es el caso de los cereales geminados (Serna, 2001). Dicha bioactividad es importante, aunque no esencial, para la alimentación del ser humano gracias a sus efectos positivos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, coronarias y varios tipos de cáncer, como de pulmón cervicouterino, colon, recto, páncreas y mama (Fernandez-Orozco & col., 2008). En este sentido, Fogarasi & col (2015) han demostrado que los compuestos con mayor bioactividad en los granos de cereal germinado son los compuestos fenólicos.

Para el estudio de compuestos bioactivos, estos se clasifican en 2 grupos: de acuerdo a su funcionalidad y a sus características estructurales (Fogarasi & col., 2015). La clasificación más importante es de acuerdo a sus funciones biológicas y se divide en: antioxidantes, anticancerígenos, hipocolesterolémicos,

antiinflamatorios, osteogénicos (promueven la formación de los huesos), antibacteriales, entre otros (Badui Dergal & col., 2006).

En este trabajo sólo nos enfocaremos en algunos compuestos bioactivos, descritos a continuación.

2.4.1 Compuestos fenólicos

Son compuestos químicos de carácter hidrofílico o lipofílico, definidos como aquellas sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidróxilo. Representan una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en plantas, en su mayoría derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina y lisina. Estos compuestos constituyen un amplio grupo de más de 8,000 compuestos identificados, presentes en las plantas con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas (Porras-Loaiza & col., 2009).

Los compuestos fenólicos son una amplia familia dentro de los compuestos bioactivos a base de una estructura fenólica, formados durante el crecimiento de una plántula en respuesta a un estrés generado (infecciones, lesiones y protección a la radiación UV); y son los principales responsables de la actividad antioxidante de estas. (Mareček & col., 2017). Dentro de estos compuestos se incluyen antocianinas, carotenoides, taninos, lignanos, ligninas, flavonoides como las isoflavonas, flavononas y flavonoles (catequinas); principalmente (Badui Dergal & col., 2006). Aunque en general la clasificación más conocida de estos compuestos se divide en flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles (Porras-Loaiza & col., 2009).

En conjunto, a los compuestos fenólicos se les adjudican diversos efectos benéficos como antioxidantes, antiinflamatorios, cardioprotectores y antimicrobianos, principalmente. En los cereales desempeñan funciones como protección contra depredadores herbívoros y patógenos (ácidos fenólicos), protección antioxidativa de la membrana celular (polifenoles y flavonoides) y otros por su colorido atraen a los animales para favorecer la polinización (antocianinas) (Fogarasi & col., 2015).

Estos compuestos al estar localizados en la interfase lípido-agua de la membrana de las células contenidas principalmente en la aleurona y el endospermo, su ubicación les permite recoger radicales libres dentro y fuera de la célula, debido a su estructura lipo-hidrofílica. Los efectos protectores de estos compuestos son amplios, e incluyen la protección contra la destrucción oxidativa mediante la eliminación de radicales libres, la eliminación de productos de peroxidación lipídica (evita la degradación de la capa lipídica de las membranas de las células) y la

preservación del estado tiol-disulfuro de las proteínas y los procesos de reparación a nivel proteico (hasta niveles de DNA) (Fernandez-Orozco & col., 2008; Fogarasi & col., 2015).

Para la industria alimentaria, los compuestos fenólicos están relacionados de múltiples formas con diversos productos, especialmente aquellos fabricados a base de cereales y legumbres, debido a sus funciones biológicas, entre las que destaca su carácter antioxidante (Serna, 2001). En los cereales, la mayor actividad antioxidante está dada por los polifenoles, flavonoides y taninos, ya que han demostrado ser el grupo de sustancias químicas más capaces de producir la eliminación de radicales libres y quelantes (Fogarasi & col., 2015). Por su parte, la cebada cuenta con una amplia gama de compuestos fenólicos que involucran a los ácidos fenólicos (derivados del ácido benzoico y cinámico), proantocianidinas, quinonas, flavonoles, chalconas, flavonas, flavononas y compuestos amino-fenólicos; capaces de fungir un papel importante en la eliminación de radicales libres, romper la reacción radical en cadena y de igual manera, quelar metales; con el fin de reducir los riesgos de enfermedades cardiovasculares y algunos cánceres (Liu & col., 2007).

Hoy en día, existen múltiples estudios de aplicación del carácter antioxidante de los cereales (y en general de los productos vegetales) en la industria alimentaria, gracias a su alto contenido en compuestos fenólicos. Un ejemplo es el aprovechamiento de los ácidos fenólicos, como el gálico, vainillínico, ferúlico y cumárico, para la eliminación del uso de aditivos, con el fin de reducir costos de producción e incluso englobar algunos productos dentro de los llamados alimentos funcionales (Chinma & col., 2015; Porras-Loaiza & col., 2009; Ragaei & col., 2006).

Diversos reportes sobre germinación, mencionan que los compuestos fenólicos con carácter antioxidante son sustancias ampliamente distribuidas dentro de estos granos. Chen & col. (2017) en estudios comparativos de perfiles fenólicos y actividades enzimáticas durante la germinación en diferentes variedades de cebada china, y Fogarasi & col. (2015) en estudios con diferentes condiciones de remojo de cebada para una posterior germinación, reportaron una concentración de alrededor de 200 y 180 mg equivalentes ácido gálico (100g muestra seca⁻¹) en cebada sin germinar, y una concentración de 200 y 250 mg equivalentes ácido gálico (100g muestra seca⁻¹) en cebada germinada durante 2 y 4 días, respectivamente. Tian & col. (2010) por su parte, en estudios con avena germinada, reportaron una concentración de compuestos fenólicos totales de 450 mg equivalentes ácido gálico (100g muestra seca⁻¹) en granos sin germinar y 870 mg equivalentes ácido gálico (100g muestra seca⁻¹) en granos germinados durante

5 días. Dicha concentración va en aumento conforme avanza el proceso de germinación, con el fin de dar protección a la futura planta (Rao & col., 2004).

2.4.1.1 Flavonoides

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos cuyas estructuras van desde simples moléculas cíclicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30,000 g (mol⁻¹). Todos estos compuestos tienen la misma estructura básica característica: dos anillos aromáticos (A y B) unidos a ambos lados de un anillo de pirano oxigenado (anillo C) (Figura 9) (Martínez-Flórez & col., 2002). Dentro de esta amplia familia de compuestos destacan: antocianinas, flavanos, flavonoles, flavonas, flavanonas, chalconas e isoflavonoides, cuyas estructuras se muestran ejemplificadas en la Figura 10. (Gonzalo & col., 2002; Sampietro, 2009).

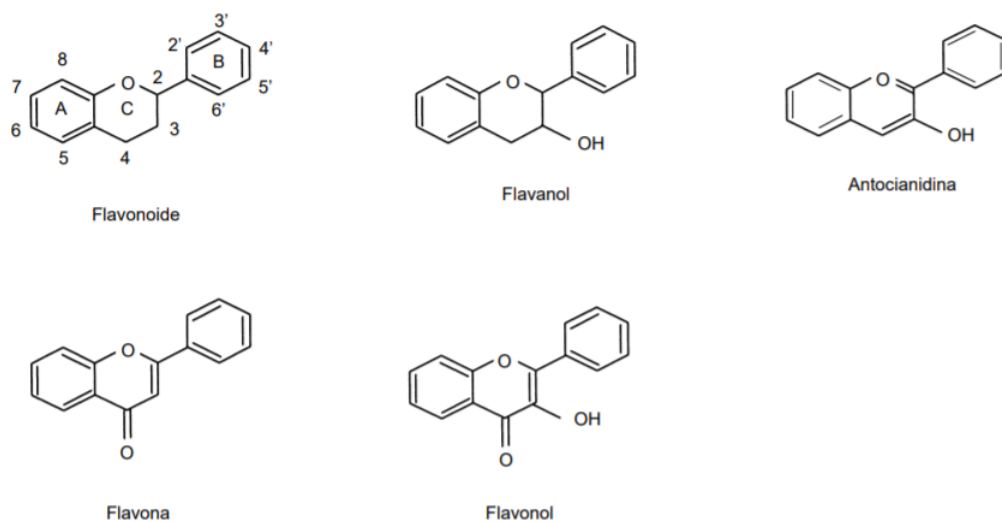


Figura 9. Estructuras básicas y tipos de flavonoides

(Sampietro, 2009)

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuido en frutas y vegetales, así como en diversos cereales y alimentos como té negro, cerveza, café, cacao y vinos (Pérez Trueba, 2003) En las plantas juegan un papel importante como pigmentos responsables de los colores vivos de muchos frutos y flores, también de los colores otoñales de las hojas. En su metabolismo, fungen como reguladores del crecimiento y protectores contra los rayos UV, oxidación y calor; además,

ahuyentan insectos devoradores con su sabor amargo, o bien, atraen otros insectos que ayudan con la polinización (Martínez-Flórez & col., 2002).

Al igual que los demás compuestos fenólicos, los flavonoides tienen diversas funciones de gran uso dentro de la industria alimentaria. Generalmente son utilizados gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa y topoisomerasa, principalmente (Martínez-Flórez & col., 2002; Navas, 2013; Pérez Trueba, 2003)

Desde el punto de vista bioquímico, los flavonoides se caracterizan por poseer una elevada reactividad que se expresa en su afinidad por unirse a polisacáridos, principalmente, o proteínas; u otras moléculas biológicas como iones divalentes de metales (Sharma & col., 2012). También se caracterizan por su capacidad para catalizar el transporte de electrones y captar radicales libres. Estas propiedades, en conjunto, dan lugar a efectos biológicos muy diversos, muchos de los cuales sólo han podido ser puestos de manifiesto en ensayos *in vitro*: inhibición de enzimas, actividad antioxidante, efectos antiinflamatorios, acción antibacteriana y antiviral, secuestro de metales, actividad vascular, entre otros (Gonzalo & col., 2002).

Dada esta afinidad de acoplamiento, una de las propiedades biológicas de los flavonoides con mayor interés de estudio clínico y nutricional es su efecto antioxidante. Diversos autores como Martínez-Flórez & col. (2002) y Navas (2013) en estudios con plántulas (*in vitro*), mencionan que los flavonoides tienen una función antioxidante directa que es similar o más potente que otros antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E o el glutatión, y esta función probablemente está relacionada con sus estructuras polifenólicas.

Teniendo en cuenta que las dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos, comúnmente recomendados en todo el mundo, no producen los efectos esperados o resultan dañinos, se prefiere incluir en la dieta una mezcla de alimentos de origen vegetal que aporten flavonoides y taninos, los cuales pueden ser encontrados en cereales y legumbres, principalmente. La ingesta dietética de flavonoides junto con otros antioxidantes naturales de eficacia comprobada, como las vitaminas C y E, taninos y carotenoides, coadyuvan en los procesos de defensa del cuerpo humano (Martínez-Flórez & col., 2002).

Pérez Trueba (2003) reportó que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres; además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), ciclo-oxigenasa (CO), mieloperoxidasa (MPO), NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); lo que permite evitar la generación de especies reactivas del oxígeno *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se sabe que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A₂ (FLA₂), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación del radical en sí.

Dentro de la germinación de cereales la concentración de flavonoides es bastante considerable (Martínez-Flórez & col., 2002). Nava (2013) en su trabajo con harina de granos de maíz y soya germinados durante 3 días, reportó una concentración de flavonoides de 15.95 mg equivalentes de quercetina/100 g de muestra; la mezcla de granos utilizada en dicho estudio se realizó con el fin de obtener una harina con mayor concentración proteica. Gonzalo & col. (2002) en estudios con guisantes y judías verdes germinadas hasta la aparición del primer brote de radícula, reportaron una concentración de 25 y 48 mg equivalentes de quercetina (100g muestra seca⁻¹). Pérez Trueba (2003) en su trabajo con cebada germinada durante 48 h, reportó una concentración de 20 mg equivalentes de quercetina (100g muestra seca⁻¹); aunque cabe destacar que dentro de su trabajo también menciona que para obtener un mejor rendimiento en cuanto a la concentración de flavonoides, no es recomendable una operación de remojo, debido a que muchos de los flavonoides poseen un gran número de grupos hidroxilos formando glicósidos, cuya polaridad los hace ligeramente más solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetato de etilo o agua.

2.5 Actividad antioxidante

En nuestro cuerpo, las moléculas y células que nos componen cambian y se degradan día con día, formando múltiples especies reactivas que al cabo del tiempo nos pueden generar alguna enfermedad; a dichas especies se les conoce como radicales libres (Gonzalo & col., 2002).

Los radicales libres son moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón impar, necesitado de otro electrón para poseer una configuración electromagnética estable. Es por ello que los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para eliminar este orbital incompleto, pero a expensas de desestabilizar la configuración electrónica de las moléculas

con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo desencadenar reacciones en cadena. Algunos ejemplos de éstas especie altamente reactivas en los sistemas biológicos es el oxígeno singlete $O_2\cdot$, $OH\cdot$, $NO\cdot$ y los radicales libres alquilperoxilo (Mareček & col., 2017).

De manera general, dentro del metabolismo, se puede decir que los radicales libres son los responsables de dañar las estructuras de lípidos, proteínas y ADN, además, pueden intervenir en procesos de patogénesis y envejecimiento (Fogarasi & col., 2015).

Dado este fenómeno, el metabolismo humano es incapaz de generar los compuestos necesarios para neutralizar el efecto de los radicales libres. Es por eso que se vuelve necesaria la ingesta de diversos productos de origen vegetal que ayuden a contrarrestar el efecto del daño ocasionado. En este sentido, los compuestos bioactivos con efectos antioxidantes incluidos en cereales y legumbres principalmente, se vuelven indispensables (Fogarasi & col., 2015).

Los antioxidantes son cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con los de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de ese sustrato. Los antioxidantes actúan de varias maneras, incluyendo la complejación de iones metálicos redox-catalíticos, la eliminación de radicales libres y la descomposición de peróxidos. La intensidad de estos efectos depende de la estructura química y la concentración de dichos antioxidantes (Fogarasi & col., 2015).

Los antioxidantes naturales pueden proteger el ADN, las proteínas y las membranas lipídicas de daños oxidativos en los sistemas biológicos; además, son potencialmente efectivos en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas que actualmente están en crecimiento. De igual manera, los antioxidantes juegan un papel importante en la vida útil de los alimentos, inhibiendo o previniendo la oxidación de lípidos y protegen los componentes valiosos de los alimentos como las proteínas y vitaminas (Ragaei & col., 2006).

Los principales compuestos con perfiles antioxidantes se pueden clasificar en tres grandes grupos: terpenoides (carotenoides y esteroides), compuestos fenólicos (que incluye flavonoides) y compuestos azufrados (Carbajal, 2011). Aunque, la principal clasificación está dada en tres categorías dependiendo su mecanismo de acción:

1. Antioxidantes, que previenen la formación de radicales libres.
2. Antioxidantes captadores de radicales libres, que inhiben la iniciación del proceso oxidativo o bien interfieren en el proceso de propagación.

3. Antioxidantes, que actúan revirtiendo el proceso de oxidación.

(Gonzalo & col., 2002)

En los cereales se ha encontrado que al germinar un grano, éste aumenta su contenido vitamínico y antioxidante, principalmente, además de que algunos factores anti-nutricionales disminuyen, y es por ésta razón que durante los últimos años se comenzaron a estudiar sus caracteres funcionales (Hübner & col., 2010; Liu & col., 2007). Los compuestos antioxidantes más estudiados en cereales germinados, debido a su alta concentración y alta capacidad antioxidante, son los compuestos fenólicos. En la cebada se incluye una amplia gama de antioxidantes fenólico como ácidos fenólicos (derivados del ácido benzoico y cinámico) como proantocianidinas, quinonas, flavonoles, chalconas, flavonas, flavononas y compuestos amino-fenólicos (Fogarasi & col., 2015; Mareček & col., 2017).

La actividad antioxidante de un compuesto fenólico en general puede evaluarse *in vitro* por medio de experimentos sencillos que examinan directamente dicha habilidad y que a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas. Los métodos de cuantificación antioxidante están basados en la desactivación de radicales mediante la transferencia de hidrógeno o transferencia de un solo electrón. Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuesto (Martínez, 2007). Para propósito de éste trabajo, nos enfocaremos a tres técnicas de cuantificación de actividad antioxidante, descritas a continuación.

2.5.1 Método del radical catiónico ABTS^{•+}:

El método del radical catiónico ABTS^{•+} se fundamenta en la cuantificación de la decoloración de radical catiónico ABTS^{•+} debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones, o bien la interacción con compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica. El radical ABTS^{•+} se genera a partir de su precursor el ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS^{•+}) y persulfato de potasio. El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, no muy estable y con un espectro de absorción en el UV-visible a 734 nm (Mesa & col., 2011).

Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación *in vivo*, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el (0.68V), pudiendo así reaccionar con muchos compuestos fenólicos con un potencial más bajo. El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada (reactivo limitante), fijando tiempos necesarios,

no muy cortos o muy elevados ya que pueden interferir en los resultados finales (Medina, 2010).

2.5.2 Ensayo del radical libre DPPH[•]:

Brand-Williams & col. (1995) evaluaron la actividad de compuestos específicos antirradicales utilizando la reducción del radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) en una solución metanólica. El DPPH[•] es un radical que puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares. Generalmente, el radical tiene una mayor afinidad con polifenoles (catequinas, proantocianidinas), pero no con ácidos fenólicos (Mareček & col., 2017).

El método se basa en adicionar el electrón no apareado del DPPH[•] a una solución metanólica que contenga algún compuesto susceptible de atrapar radicales libres, como es el caso de los compuestos antioxidantes. En solución, el radical DPPH[•] presenta una coloración violeta fuerte y su máxima absorbancia se obtiene una longitud de onda de 520 nm. Una vez iniciada la reacción de reducción, se presenta una decoloración en la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados. La reducción del DPPH[•] se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de 520 nm y cuando sufre la completa reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. Por lo tanto, la desaparición del radical libre DPPH[•] proporciona un índice para estimar la capacidad de un compuesto de atrapar radicales libres (Martínez, 2007).

2.5.3 Análisis FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

El análisis FRAP fue introducido por Benzie (1996) para medir la actividad antioxidante total de un compuesto. Se basa en la capacidad o poder reductor de los antioxidantes, principalmente polifenoles, para oxidar el ion férrico (Fe³⁺) al ion ferroso (Fe²⁺), formando un complejo de color azul que puede ser monitoreado por un espectro de absorción en el UV-visible a 593 nm. Las lecturas de absorción están relacionadas con la potencia reductora de los antioxidantes donadores de electrones presentes en el ensayo; por lo tanto, el ensayo FRAP puede clasificar la potencia reductora y el potencial antioxidante de una amplia gama de compuestos (Martínez, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe un amplio interés por el estudio de alimentos con un alto contenido en antioxidantes naturales y cuyo consumo se ha asociado con la disminución en la aparición de enfermedades cardiovasculares, así como también el cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas que están en crecimiento en nuestro país.

En el estado de Hidalgo, así como en muchos otros estados en México, existe un gran suministro de cereales, que pueden ser fuentes potenciales de antioxidantes. El proceso de germinación puede ser una vía alterna de potenciar la presencia de compuestos bioactivos con actividad antioxidante. Dada ésta circunstancia, éste proyecto está dirigido a la cuantificación de compuestos bioactivos en cebada germinada y a la actividad antioxidante ligada a estos. Así mismo, al estudio del comportamiento de cada una de las diferentes variedades de cebada utilizadas (Esmeralda, Perla y Cleopatra); debido a que presentan distintas características fisiológicas entre sí.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto sobre la cuantificación de compuestos bioactivos y su actividad antioxidante en diferentes variedades de cebada, durante el proceso de germinación.

Objetivos específicos

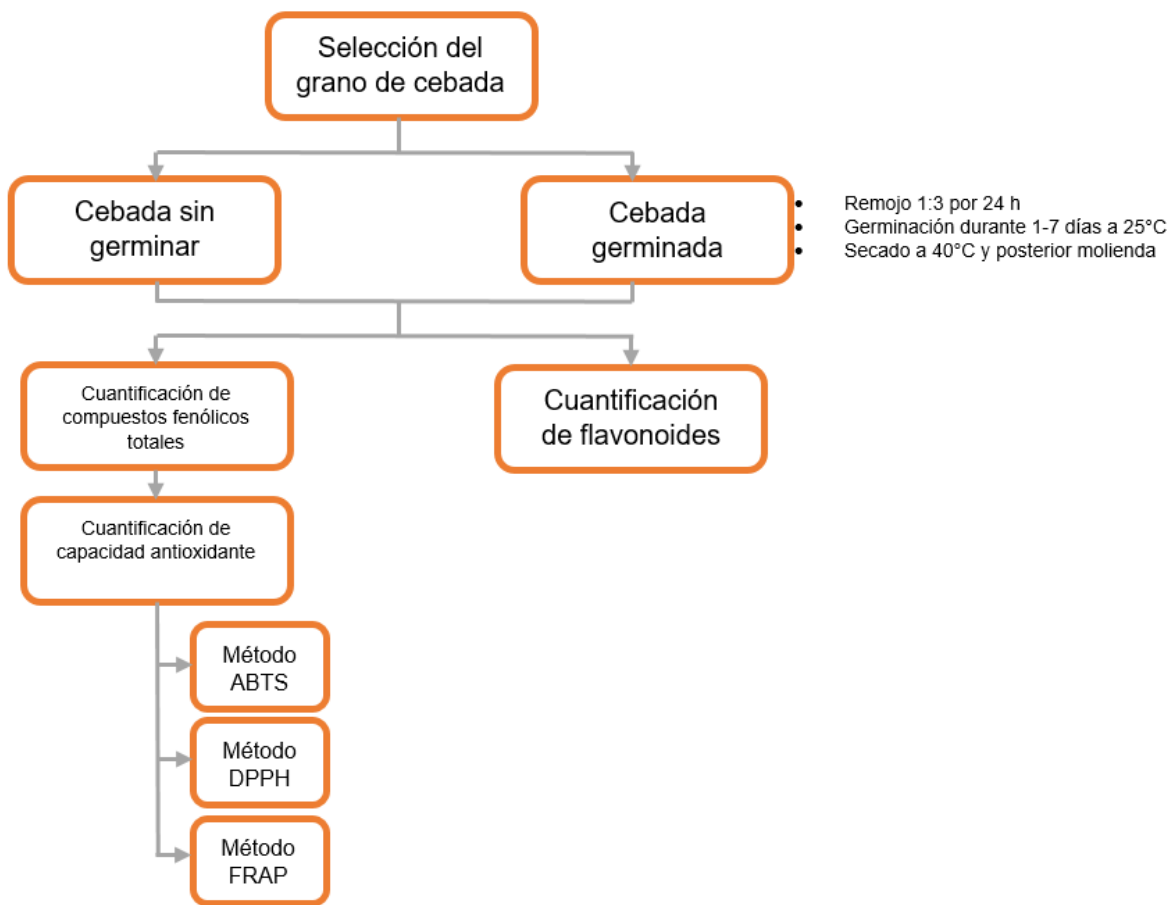
- Germinar diferentes variedades de cebada (Esmeralda, Perla y Cleopatra) por siete días, bajo condiciones específicas, para cuantificar la concentración de compuestos fenólicos.
- Cuantificar la concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides en las diferentes variedades de cebada germinada y sin germinar, a través de técnicas colorimétricas, para determinar su actividad antioxidante.

- Determinar la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos de la cebada germinada y sin germinar, a través de las técnicas de ABTS, DPPH y FRAP, para determinar su actividad biológica.

5. HIPÓTESIS

El proceso de germinación, en las diferentes variedades de cebada, produce un incremento en la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante en comparación con cebada sin germinar.

6. DISEÑO METODOLÓGICO



7. METODOLOGÍA

7.1 Proceso de germinación

El proceso de transformación de la cebada mediante germinación inició con una previa clasificación de granos de cada una de las variedades de cebada Esmeralda, Perla y Cleopatra, provenientes de Apan, Hgo.; con el fin de eliminar impurezas, otros granos o granos dañados. Se prosiguió a lavar y desinfectar los granos con agua y una solución de hipoclorito de sodio al 0.007%. Posteriormente, se realizó una etapa de remojo, la cual consistió en colocar los granos de cebada en recipientes plásticos con agua hervida (1:3) durante 24 h.

Una vez realizado el remojo, se germinó durante 7 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en una incubadora a completa oscuridad, en recipientes plásticos con una cobertura de papel filtro húmedo. El papel filtro utilizado se humedeció diariamente y se cambió al 3er día, con el fin de evitar proliferación de hongos.

El tamaño de las radículas fue medido en cada día de germinación a partir que esta comenzó a emerger del grano; midiendo 20 granos tomados al azar. Además, se tomó otra muestra diariamente de 500 g, a partir de los granos sin germinar y hasta los granos germinados durante 7 días, para llevarla a proceso de secado.

El proceso de germinación fue monitoreado mediante la apariencia visual del grano (sin puntos blancos o negros, formación de hongos, etc.), además de la ausencia de malos olores (pútridos); características de un proceso de germinación exitoso.

Posteriormente los granos de cebada germinados se sometieron a un proceso de secado en una estufa a $40 \pm 2^\circ\text{C}$, para después ser molidos con ayuda de una licuadora y obtener harina de cebada útil para posteriores análisis.

7.2 Cuantificación de fenoles totales

7.2.1. *Extracción de compuestos fenólicos totales*

La extracción de compuestos fenólicos totales se realizó conforme al método desarrollado por Abdel-Aal & col. (1999). Se pesaron 0.5 g de harina de cebada, de cada una de las diferentes variedades germinadas y sin germinar, y se colocaron en tubos para centrifuga de 50 mL, posteriormente se adicionaron 10 mL de metanol al 80% V/V y se agitaron inmediatamente para lograr homogeneidad en la muestra.

Los tubos se colocaron en posición vertical en un agitador orbital y se agitaron durante 18 h a temperatura ambiente y protegiéndolos de la luz. Concluido el tiempo de agitación, las muestras con el extracto se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Finalmente se recolectó el sobrenadante de cada muestra en tubos de vidrio con tapa, los cuales también se protegieron de la luz; en lo que respecta a los sólidos, éstos se desecharon.

7.2.2. Preparación de la curva estándar y tratamiento de la muestra

Se preparó una solución estándar de ácido gálico pesando 0.05 g de ácido gálico y disolviéndolo en 1 mL de etanol, posteriormente se llevó a un volumen de 10 mL con agua destilada (concentración 5 mg/mL de ácido gálico); enseguida se preparó una disolución 1:10 de ésta solución para obtener una concentración de 0.5 mg/mL de ácido gálico y a partir de ésta se preparó una curva tipo con las siguientes proporciones, indicadas en la Tabla 1:

Tabla 1. Preparación de la curva tipo de ácido gálico.

No. de tubo	Concentración (mg/mL de ácido gálico)	µL de solución de ácido gálico (0.5 mg/mL de ácido gálico)	µL de agua destilada
Blanco	0	0	1000
1	0.1	200	800
2	0.2	400	600
3	0.3	600	400
4	0.4	800	200
5	0.5	1000	0

Posteriormente se tomaron 20 µL de cada una de las soluciones que se prepararon indicadas en la Tabla 1 y se colocaron en tubos de vidrio. Para las muestras (extractos de harina de cebada) de igual manera se tomaron 20 µL de cada una de ellas. Finalmente se adicionaron 1.58 mL de agua destilada, 300 µL de carbonato de sodio al 10% P/V y 100 µL de reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1:2, para después mezclarlos con ayuda de un vortex. Todas las mezclas (soluciones de la curva estándar y muestras evaluadas) se mantuvieron a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 2 h exactas (tiempo de reacción), finalizado este tiempo se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm.

7.2.3. Cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales

Los valores obtenidos de las absorbancias para cada muestra se interpolaron en la curva estándar de ácido gálico para obtener los mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cada mL y finalmente los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de muestra. Los cálculos se realizaron conforme a la Ecuación 1.

$$\frac{\text{mg EAG}}{100 \text{ g de muestra}} = \frac{\text{mg de ácido gálico}}{\text{mL}} \times \frac{1}{\text{peso de la muestra}} \times 10 \text{ mL} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo de mg equivalentes de ácido gálico (100 g de muestra⁻¹)

(Abdel-Aal & col., 1999)

7.2.4. Preparación de reactivos

Metanol al 80% (V/V): en un matraz aforado de 50 mL se añadieron 40.0 mL de metanol y posteriormente se adicionó agua destilada hasta la marca del aforo.

Carbonato de sodio al 10% (P/V): en un matraz aforado de 100 mL se añadieron 10 g de carbonato de sodio monohidratado y posteriormente se adicionó agua destilada hasta la marca del aforo.

Reactivo de Folin Ciocalteu: en un matraz aforado de 10 mL se añadieron 5 mL del reactivo de Folin Ciocalteu y posteriormente se adicionó 5 mL de agua destilada hasta la marca del aforo. Este reactivo se mantuvo protegido de la luz para evitar su degradación.

7.3 Cuantificación de flavonoides

7.3.1. Extracción de flavonoides

La cuantificación y extracción de flavonoides fue determinada mediante el método descrito por Žilić & col. (2011) y Eberhardt & col. (2000). Se pesó 1 g de harina de cebada, de cada una de las diferentes variedades germinadas y sin germinar, y se colocaron en tubos para centrifuga de 50 mL, posteriormente se adicionaron 10 mL de etanol al 40% V/V y se agitaron inmediatamente para lograr homogeneidad en la muestra.

Los tubos se colocaron en posición vertical en un agitador orbital y se agitaron durante 30 min, a temperatura ambiente y protegiéndolos de la luz. Concluido el

tiempo de agitación, las muestras con el extracto se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min. Finalmente se recolectó el sobrenadante de cada muestra en tubos de vidrio con tapa, los cuales también se protegieron de la luz; en lo que respecta a los sólidos, éstos se desecharon.

7.3.2. Procedimiento para la cuantificación de flavonoides

Se diluyó cada uno de los extractos de harina de cebada en 1 mL de agua. Posteriormente se tomaron 0.5 mL del extracto y se mezclaron con 0.075 mL de NaNO₂ al 5% en tubos de vidrio protegidos de la luz. Después de 6 minutos, se añadieron 0.15 mL de AlCl₃ al 10% y la mezcla se dejó en reposo durante otros 5 minutos. Finalmente se añadieron 0.5 mL de NaOH 1 M y el volumen se completó hasta 2.5 mL con agua destilada. La absorbancia se midió a 510 nm inmediatamente después de mezclar el NaOH.

7.3.3. Cálculo de la concentración de flavonoides

Los valores obtenidos de las absorbancias para cada muestra se interpolaron en la curva estándar para obtener los mg equivalentes de quercetina (EQ) por cada mL y finalmente los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina por cada 100 g de muestra. Los cálculos se realizaron conforme a la Ecuación 2.

$$\frac{mg\ EQ}{100\ g\ de\ muestra} = \frac{mg\ de\ quercetina}{mL} \times \frac{1}{peso\ de\ la\ muestra} \times 10\ mL \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo de mg equivalentes de quercetina (100 g de muestra⁻¹)

(Eberhardt & col., 2000; Žilić & col., 2011)

7.3.4. Preparación de reactivos

NaNO₂ al 5% (P/V): en un matraz aforado de 10 mL se añadieron 0.5 g de metanol y posteriormente se adicionó agua destilada hasta la marca del aforo.

AlCl₃ al 10% (P/V): en un matraz aforado de 10 mL se añadieron 1 g de AlCl₃ y posteriormente se adicionó agua destilada hasta la marca del aforo.

NaOH 1 M: en un matraz aforado de 250 mL se añadieron 10 g de NaOH y posteriormente se adicionó agua destilada hasta la marca del aforo.

7.4 Determinación de actividad antioxidante mediante ABTS

Se utilizaron los extractos de compuestos fenólicos totales, obtenidos a partir de la metodología descrita por Abdel-Aal & col. (1999).

El tratamiento de estas muestra se realizó conforme a la metodología descrita por Pastrana-Bonilla & col. (2003). Se preparó una solución de ABTS⁺ 7 mM, 2.4 mM con persulfato de potasio (KSO₈, Sigma Aldrich St. Louis MO, USA, 216224) y se llevó a un aforo de 10 mL con agua (solución madre), la solución se dejó en reposo por un periodo de 12 h en refrigeración y protegida de la luz, posteriormente se tomó una alícuota de 550 µL y se aforó a 50 mL con etanol puro (solución, 2), la solución se protegió de la luz y se mantuvo en hielo durante su uso. Se tomó la lectura de la solución 2 a 734 nm, la cual debe estar en 0.7 ± 0.02 A. Esta absorbancia fue ajustada con etanol o solución madre.

Para analizar las muestras se tomaron 990 µL de la solución ajustada a 0.7 A y se colocaron 10 µL de la muestra; ésta dilución se leyó en el espectrofotómetro a 734 nm, se tomaron lecturas a partir de minuto 0 al minuto 5.

7.4.1. Cálculo del porcentaje de inhibición

Se realizaron conforme a la Ecuación 3.

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{\text{Abs muestra } t_0 - \text{Abs muestra } t_5}{\text{Abs muestra } t_0 - \left(\frac{\text{Abs disolvente } t_0 - \text{Abs disolvente } t_5}{\text{Abs disolvente } t_0} \right)} \right] \times 100$$

Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de inhibición del catión ABTS⁺

Donde:

Abs = Absorbancia

T0 = Tiempo inicial

T5 = Tiempo de 5 min

(Eberhardt & col., 2000; Žilić & col., 2011)

Por último se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de Trolox (Sigma Aldrich St. Louis MO, USA, 238813) de 0 a 25 µM, y los resultados fueron expresados como µmol equivalentes de Trolox (ET)/g de muestra.

7.5 Determinación de actividad antioxidante mediante DPPH

Se utilizaron los extractos de compuestos fenólicos totales, obtenidos a partir de la metodología descrita por Abdel-Aal & col. (1999).

El ensayo de DPPH se realizó siguiendo la metodología de Brand-Williams & col. (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una solución madre del radical DPPH (Sigma Aldrich St. Louis MO, USA, D9132) disolviendo 2.5 mg del radical con 40 mL de metanol, posteriormente se aforó la solución a 50 mL con metanol y se protegió de la luz (solución madre). Se tomó un alícuota y se midió su absorbancia a 520 nm, se ajustó la absorbancia de la solución a 0.5 ± 0.02 A, esta absorbancia fue ajustada con metanol o solución madre. Una vez ajustada la absorbancia de la solución se colocaron 200 μ L de las muestras extraídas en tubos previamente protegidos y 2000 μ L de la solución de DPPH, se midió la absorbancia de cada muestra a los 30 y 60 minutos de reacción.

7.5.1. Cálculo del porcentaje de actividad antirradical

Se realizaron conforme a la Ecuación 4.

$$\% \text{ Actividad Antirradical} = 1 - \left[\frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

Ecuación 4. Cálculo del porcentaje de actividad antirradical en el análisis de DPPH

(Brand-Williams & col., 1995)

Por último se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de Trolox (Sigma Aldrich St. Louis MO, USA, 238813) de 0 a 25 μ M, y los resultados fueron expresados como μ mol equivalentes de Trolox (ET)/g de muestra.

7.6 Determinación de actividad antioxidante mediante FRAP

Se utilizaron los extractos de compuestos fenólicos totales, obtenidos a partir de la metodología descrita por Abdel-Aal & col. (1999).

El ensayo FRAP se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Benzie & col. (1996) y Jagtap & col. (2010) con ligeras modificaciones. El reactivo FRAP fue preparado mezclando 2.5 mL de solución TPTZ 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM con 2.5 mL de solución FeCl_3 20 mM y 25 mL de tampón de acetato 0.3 M (pH 3,6). La solución de ensayo consistió en una mezcla de 20 μ L del extracto, 30 μ L

de agua y 300 μL del reactivo FRAP. La absorbancia fue medida después de 30 minutos de reacción a 593 nm. Se utilizaron 20-100 μM de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) para trazar una curva estándar. Los resultados se expresaron como micromoles de Fe (II) por 100 g.

7.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos para todos los análisis anteriores se reportaron como media \pm desviación estándar. Se aplicó el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple Tukey para probar todas las diferencias entre medias de tratamientos; utilizando niveles en la misma variedad y niveles en el mismo día de germinación.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Proceso de germinación

Los granos de cebada de las variedades Esmeralda, Perla y Cleopatra presentaron viabilidad para germinar. La aparición de la radícula se presentó al primer día de germinación, en cada una de las variedades. Las Figuras 10, 11 y 12 muestran el crecimiento de los granos germinados de cada una de las variedades (Esmeralda, Perla y Cleopatra, respectivamente) desde el primer hasta el séptimo día de germinación. Destacando que a partir del séptimo día las primera hojas comenzaron a brotar.

González Aguilar & col. (2012) y Zhou & col. (2013) en estudios de cereales y Murcia & col. (2006) al evaluar semillas de girasol, describieron que un germinado comienza su elongación de radícula entre el primer y segundo día, actuando siempre a condiciones adecuadas de temperatura, humedad, iluminación, oxigenación, entre otras. Curtis (2013), reportó que el proceso de germinación de un grano se detiene aproximadamente a los 6 días de germinación, tiempo a partir del cual la radícula comienza a mostrar los primeros brotes de hojas y recibe el nombre de plántula.



Figura 10. Crecimiento de radícula de cebada Esmeralda durante 1-7 días de germinación



Figura 11. Crecimiento de radícula de cebada Perla durante 1-7 días de germinación



Figura 12. Crecimiento de radícula de cebada Cleopatra durante 1-7 días de germinación

De acuerdo a los resultados obtenidos de elongación de radícula para cada una de las variedades de cebada estudiadas (Figura 13), se observó una variación de longitud de 1.3 hasta 75.1 mm a lo largo de los 7 días de germinación. La variedad que presentó mayor elongación fue la variedad Perla, alcanzando 75.1 mm de longitud a los 7 días de germinación. Por lo contrario, la variedad que presentó menor elongación, en el mismo periodo de tiempo, fue la variedad Esmeralda con 30.1 mm de longitud. Dicha variación de longitudes puede ser atribuida a las diferentes composiciones nutrimentales de cada una de las variedades de cebada estudiadas; así mismo, la absorción de dichos nutrientes para generar el crecimiento de radícula es diferente en cada una de las variedades (Hübner & col., 2010; Rao & col., 2004; Zhou & col., 2013). Al tratarse de un proceso biológico, dependiente de muchas variables internas y externas, es casi imposible determinar un promedio base en la elongación de radículas, independientemente del grano o la variedad a germinar.

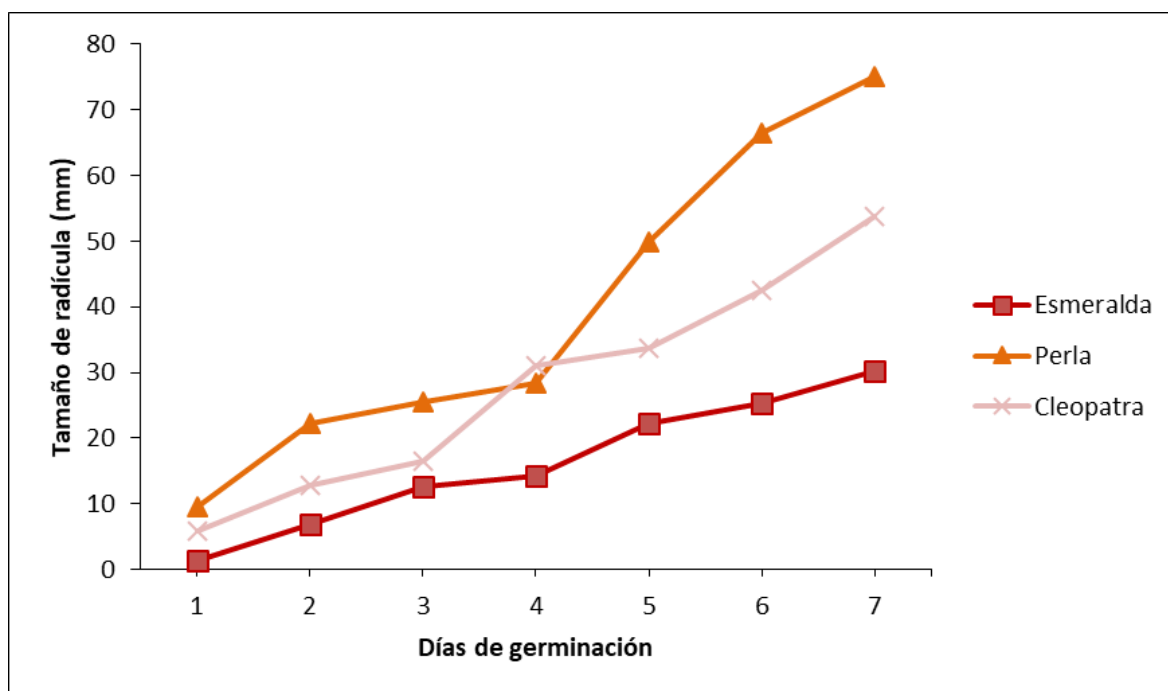


Figura 13. Elongación de radícula para cada una de las variedades de cebada estudiadas

En comparación con lo reportado en la literatura, el promedio de elongación de radícula entre especies germinadas y sin germinar, en las diferentes variedades en estudio, fue similar. Zhou & col. (2013) reportaron que el crecimiento de radícula de un grano de cereal, en general, va desde los 20 mm hasta los 60 mm

de longitud en un periodo de 5 – 6 días de germinación. Tian & col (2010) por su parte, mencionaron un crecimiento de radícula de 65 mm para avena germinada durante 6 días; y Murcia & col. (2006) reportaron que en una germinación estándar de cultivares de girasol la elongación de radícula se encuentra entre 21 mm de longitud.

Algunos autores como Hübner & col. (2010) y Rao & col. (2004) en estudios con cebada germinada, y Chinma & col. (2015) en estudios con arroz germinado, coinciden con el hecho de que el tamaño de radícula no tiene ninguna relación directa con el aumento o disminución de la concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante que estos representan; no así su composición química, la viabilidad de los granos a germinar y las condiciones de germinación. Tian & col. (2010) reportó en estudios con avena, que un grano en germinación ira aumentando su concentración de compuestos fenólicos (y otros compuestos bioactivos en general) conforme al paso de la germinación, siempre y cuando éste crezca en condiciones adecuadas y tenga la capacidad para desarrollarse. Mareček & col. (2017) por su parte, complementa la idea de que la composición del grano esta más estrechamente relacionada con la concentración de compuestos fenólicos que el crecimiento o la viabilidad del grano a germinar, ya que, en sus estudios de malteo de cebada reporta que la concentración de compuestos fenólicos disminuye en los granos que presentan una mayor composición proteica, y conforme avanza el proceso de malteo, las proteínas se degradan dejando libres algunos compuestos fenólicos ligados.

8.2 Cuantificación de fenoles totales

La concentración de compuestos fenólicos totales obtenida mediante los germinados de las variedades de cebada estudiadas, presentaron valores de 117.15 ± 8.54 hasta 1371.87 ± 77.55 mg EAG (100g muestra seca⁻¹) a partir del primer hasta el séptimo día de germinación.

La variedad Perla presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos al día 7 de germinación la cual es significativamente diferente ($p < 0.05$) a las demás variedades, con un valor de 1371.87 ± 77.55 mg EAG (100g muestra seca⁻¹); mientras que las variedades Esmeralda y Cleopatra presentaron concentraciones de 831.18 ± 14.92 y 883.01 ± 28.64 mg EAG (100g muestra seca⁻¹) respectivamente al mismo tiempo de germinación, siendo así estadísticamente iguales ($p > 0.05$) estas últimas (Figura 14).

Se observó una disminución de concentración de fenoles totales del 41, 15 y 7% para la variedad Esmeralda, Perla y Cleopatra, respectivamente, dentro del día 1

de germinación, en comparación con la concentración de cebada sin germinar. Dicha concentración decreciente permaneció hasta los días 2, 3 y 5 de germinación para la variedad Esmeralda, Perla y Cleopatra, respectivamente. Sin embargo, fue hasta los días 6, 5 y 7 de germinación cuando la concentración de fenoles totales tuvo un incremento significativo ($p < 0.05$) en comparación con la concentración de cebada sin germinar.

Este fenómeno puede ser explicado como resultado de los efectos de movilización de reservas nutritivas y estrés a los que está sometido el grano de cebada durante su proceso de germinación; ya que, cuando la etapa de germinación comienza, la nueva plántula tiene recursos limitados para satisfacer sus procesos fisiológicos y solo cuando su crecimiento está restringido por diversos factores (fisiológico y/o ecológico), incluyendo el estrés, se activa la desviación de carbono hacia la producción de metabolitos secundarios, como lo son los compuestos fenólicos (Cornejo & col., 2015). Tian & col. (2010) mencionan que el desgaste energético de una radícula de un grano de cereal, generalmente es más vigoroso entre las primeras 96 h de crecimiento.

Además, el incremento en la concentración de compuestos fenólicos durante los últimos días de germinación de los granos de cebada, puede ser atribuido a que la radícula absorbió la mayor parte de nutrientes esenciales para su crecimiento y su desarrollo se tornó constante; todo esto con el fin de crear un mecanismo de defensa solo en caso de posibles afecciones (Rao & col., 2004).

Algunos estudios sobre germinación en cebada, describen concentraciones de compuestos fenólicos totales similares a las obtenidas en este estudio. Chen & col. (2017) en estudios comparativos de perfiles fenólicos y actividades enzimáticas durante la germinación en diferentes variedades de cebada china utilizando diversos métodos de extracción y Fogarasi & col. (2015) en estudios con diferentes condiciones de remojo de cebada para una posterior germinación, reportaron una concentración de alrededor de 200 y 180 mg EAG (100g muestra seca⁻¹) en cebada germinada durante 2 y 4 días, respectivamente. Tian & col. (2010) por su parte, en estudios con avena germinada, reportaron una concentración de compuestos fenólicos totales de 450 mg EAG (100g muestra seca⁻¹) en granos sin germinar y 870 mg EAG (100g muestra seca⁻¹) en granos germinados durante 5 días.

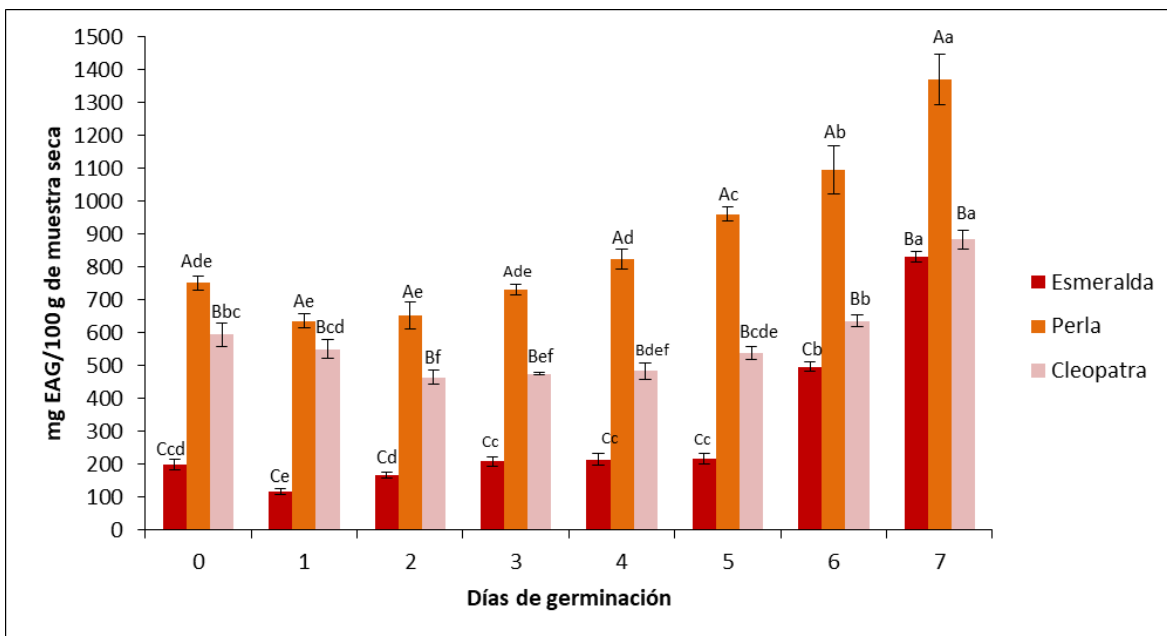


Figura 14. Concentración de fenoles totales

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de determinaciones por triplicado. Se aplicó el análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples Tukey. Las barras verticales representan la desviación estándar de cada uno de los datos. a:f - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en la misma variedad. A:C - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en el mismo día de germinación

8.3 Cuantificación de flavonoides

En la Figura 15 se muestran las concentraciones de flavonoides obtenidas para las 3 variedades de cebada germinada en estudio. Los valores obtenidos presentaron una variación de 7.01 ± 0.29 hasta 16.43 ± 0.27 mg EQ ($100\text{g muestra seca}^{-1}$), a partir del primer hasta el séptimo día de germinación. Sin embargo, la mayor concentración de flavonoides fue de 29.24 ± 0.65 mg EQ ($100\text{g muestra seca}^{-1}$) para variedad Perla en los granos sin germinar.

Ninguna de las concentraciones de flavonoides durante los 7 días de germinación pudo rebasar la concentración inicial de la cebada sin germinar, en las 3 variedades de cebada. No obstante, en los granos de cebada sin germinar de la variedad Cleopatra, la concentración de flavonoides no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$) en comparación con las muestras germinadas durante 3 y 4 días de la misma variedad.

La mayor disminución en la concentración de flavonoides fue de 32, 72 y 37% para la variedad Esmeralda, Perla y Cleopatra, respectivamente, dentro del día 2 de germinación. Dichos valores no muestran diferencia significativa ($p > 0.05$) en cuanto a los días 1 y 3 de germinación para la variedad Esmeralda y en el día 4 de germinación para la variedad Perla. En el caso de la variedad Cleopatra, el

porcentaje de disminución en la concentración de flavonoides muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto a los demás días de estudio.

Esta disminución en la concentración de flavonoides durante el proceso de germinación de cebada puede atribuirse a que muchos de estos compuestos, contenidos principalmente en las capas más superficiales del grano, poseen un gran número de grupos hidroxilos formando glicósidos. La polaridad de dichos grupos los hace ligeramente más solubles en disolventes polares, como lo es el agua, siendo posible que dicha concentración disminuya significativamente, en comparación con los granos sin germinar, una vez que los granos a germinar son colocados en contacto con el agua de remojo, o bien, durante el proceso de acondicionamiento de muestras (extracción de compuestos) (Pérez Trueba, 2003).

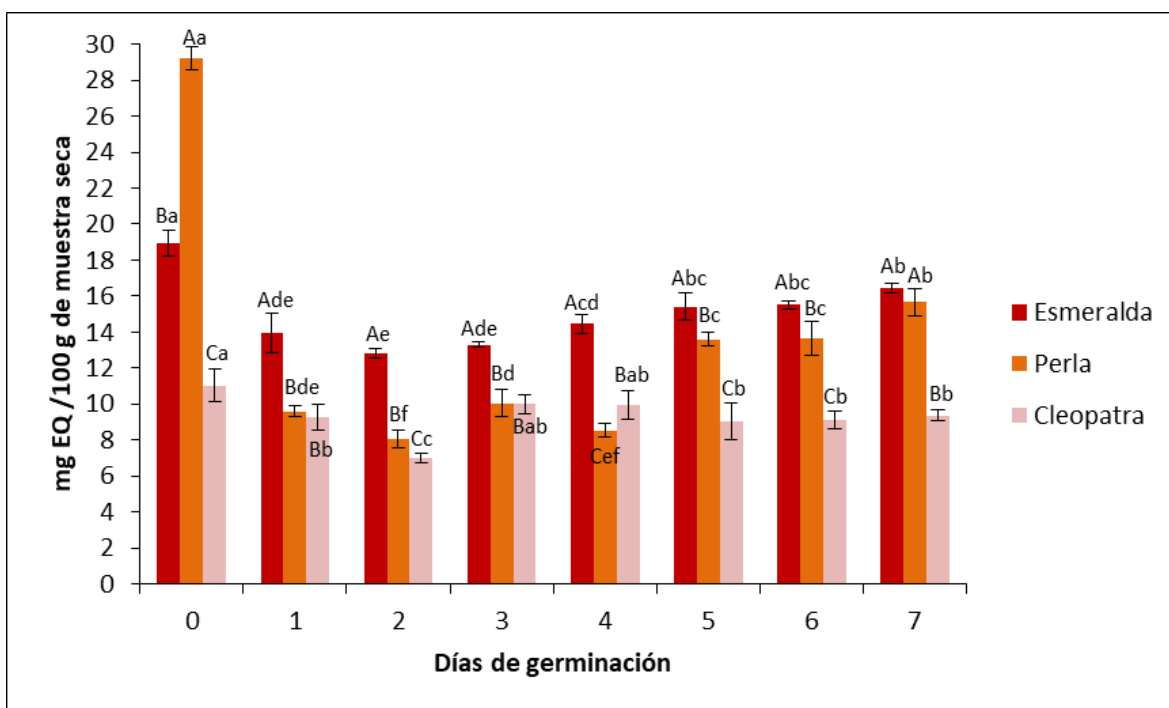


Figura 15. Concentración de flavonoides

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de determinaciones por triplicado. Se aplicó el análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples Tukey. Las barras verticales representan la desviación estándar de cada uno de los datos. a:f - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en la misma variedad. A:C - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en el mismo día de germinación

La concentración de flavonoides dentro de la germinación de cereales en general es considerable (Martínez-Flórez & col., 2002), pero también es uno de los compuestos que más se pierden, principalmente durante la etapa de remojo o acondicionamiento de granos. Muchos de los estudios se enfocan a la

cuantificación de compuestos fenólicos totales, con el fin de englobar la mayor cantidad posible de estos compuestos (Pérez Trueba, 2003). Sin embargo, Nava (2013) en su trabajo con harina de granos de maíz y soya germinados durante 3 días, reportó una concentración de flavonoides de 15.95 mg EQ (100g muestra seca⁻¹); la mezcla de granos utilizada en dicho estudio se realizó con el fin de obtener una harina con mayor concentración proteica. Gonzalo & col. (2002) en estudios con guisantes y judías verdes germinadas hasta la aparición del primer brote de radícula, reportaron una concentración de 25 y 48 mg EQ (100g muestra seca⁻¹) mayor a la muestra control sin germinar. Pérez Trueba (2003) en su trabajo con cebada germinada durante 48 h, reportó una concentración de 20 mg EQ (100g muestra seca⁻¹), mayor a la muestra sin germinar, sin embargo dichas concentraciones no mostraron diferencia significativa entre sí. Dichas contribuciones concuerdan con lo analizado en este trabajo.

8.3 Análisis ABTS

La actividad antioxidante medida a partir del método del radical catiónico ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS), mostró un incremento conforme el paso de la germinación en las 3 variedades de cebada estudiadas. La variedad Perla presentó la mayor actividad antioxidante significativamente diferente ($p < 0.05$) a las demás variedades al día 7 de germinación, con un valor de $56.75 \pm 0.60 \mu\text{Mol ET}$ (100g muestra seca⁻¹). La menor actividad nuevamente fue observada en la variedad Perla al día 1 de germinación, con un valor de $4.44 \pm 0.52 \mu\text{Mol ET}$ (100g muestra seca⁻¹), siendo estadísticamente igual ($p > 0.05$) al valor de la concentración de los días 0 y 2 de germinación (Figura 16).

Al igual que en la cuantificación de fenoles totales, la actividad antioxidante determinada mediante ABTS presentó una disminución dentro del día 1 de germinación en comparación con la cebada sin germinar de cada una de las tres variedades de cebada. La variedad Esmeralda mostró una disminución del 44%, significativamente igual ($p > 0.05$) a la actividad del día 4 de germinación de la misma variedad. Para la variedad Perla, la disminución en la actividad al día 1 de germinación no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$) en comparación con la cebada sin germinar y el día 2 de germinación. Por último, la variedad Cleopatra mostró una disminución del 62% al día 1 de germinación significativamente diferente ($p < 0.05$) a la muestra sin germinar, pero significativamente igual a las muestras germinadas durante los días 2 y 3, de la misma variedad.

Este comportamiento en la actividad antioxidante puede ser atribuido nuevamente a que el grano se encuentra en estado de estrés causado por el efecto de movilización de reservas nutritivas que dan paso al crecimiento de la radícula (Rao

& col., 2004; Tian & col., 2010). Además, Fogarasi & col (2015) mencionan que la actividad antioxidante, al estar relacionada directamente con la concentración de compuesto fenólicos, se comporta de manera similar a dicha concentración.

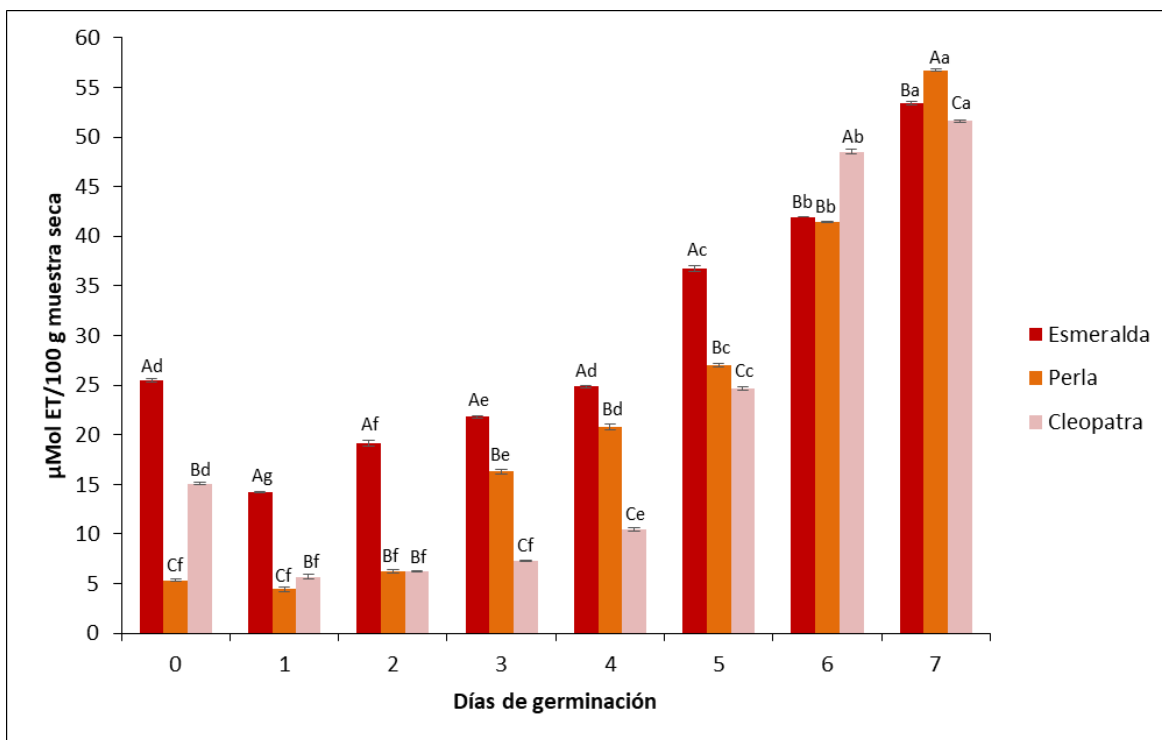


Figura 16. Capacidad de captación del radical ABTS

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de determinaciones por triplicado. Se aplicó el análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples Tukey. Las barras verticales representan la desviación estándar de cada uno de los datos. a:f - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en la misma variedad A:C - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en el mismo día de germinación

Algunos estudios sobre germinación describen concentraciones de actividad antioxidante mediante el método ABTS similares a las obtenidas en este estudio. Ragaee & col. (2006) en estudios con cebada sin germinar reportó una concentración de $14.9 \pm 0.61 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$. Fogarasi & col. (2015) en estudios con cebada germinada mediante diversos métodos y condiciones de remojo reportó una concentración de $6.4 \text{ ET (100g muestra seca}^{-1})$ en cebada sin germinar, y $9.6 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$ en cebada germinada durante 5 días. Mareček & col. (2017) en estudios de malteo de cebada y su evaluación enzimática reportó una concentración de $5.1 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$ en cebada sin germinar, y $8.7 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$ en cebada germinada durante 42 h.

8.4 Análisis DPPH

La actividad antioxidante medida a partir del método del radical DPPH mostró un incremento conforme el paso de la germinación, al igual que en el método ABTS. Las tres variedades de cebada en estudio mostraron la mayor actividad antioxidante durante el séptimo día de germinación, siendo la variedad Perla la que presentó la mayor actividad significativamente diferente ($p < 0.05$) a las demás variedades, con un valor de $17.00 \pm 0.10 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$. Por otro lado, la menor actividad antioxidante nuevamente fue observada en la variedad Perla al día 1 de germinación, con un valor de $12.73 \pm 0.20 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$ siendo estadísticamente igual ($p > 0.05$) al valor reportado en el día 2 de germinación (Figura 17).

A diferencia del método ABTS, la actividad antioxidante cuantificada por DPPH no presentó disminución durante el primer día de germinación. Dicho acontecimiento puede ser atribuido a que el radical DPPH no tiene una amplia afinidad de compuestos con los cuales reaccionar como es el caso del radical ABTS. Generalmente, su mayor afinidad se da con polifenoles y no con ácidos fenólicos, cuya concentración en los granos de cebada va en aumento conforme el paso de la germinación según los estudio de Mareček & col. (2017).

En las tres variedades de cebada estudiadas el valor de actividad antioxidante es significativamente diferente ($p < 0.05$) al resto de los días de análisis para cada una de estas variedades. Destacando el hecho de que las variedades Perla y Cleopatra en los días 3 y 4 de germinación no presentan diferencia significativa ($p > 0.05$) entre sí; así mismo, en los días 5 y 6 para las variedades Esmeralda y Cleopatra no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$) entre sí.

Algunos estudios sobre germinación describen concentraciones de actividad antioxidante mediante el método DPPH similares a las obtenidas en este estudio. Ragaee & col. (2006) en estudios con cebada sin germinar reportó una concentración de $21.01 \pm 0.83 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$. Fogarasi & col. (2015) en estudios con cebada germinada mediante diversos métodos y condiciones, reportó una concentración de $20 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$ en cebada sin germinar, y $28 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$ en cebada germinada durante 5 días. Mareček & col. (2017) en estudios de malteo de cebada reportó una concentración de $12.7 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$ en cebada sin germinar, y $21.4 \mu\text{Mol ET (100g muestra seca}^{-1})$ en cebada germinada durante 42 h.

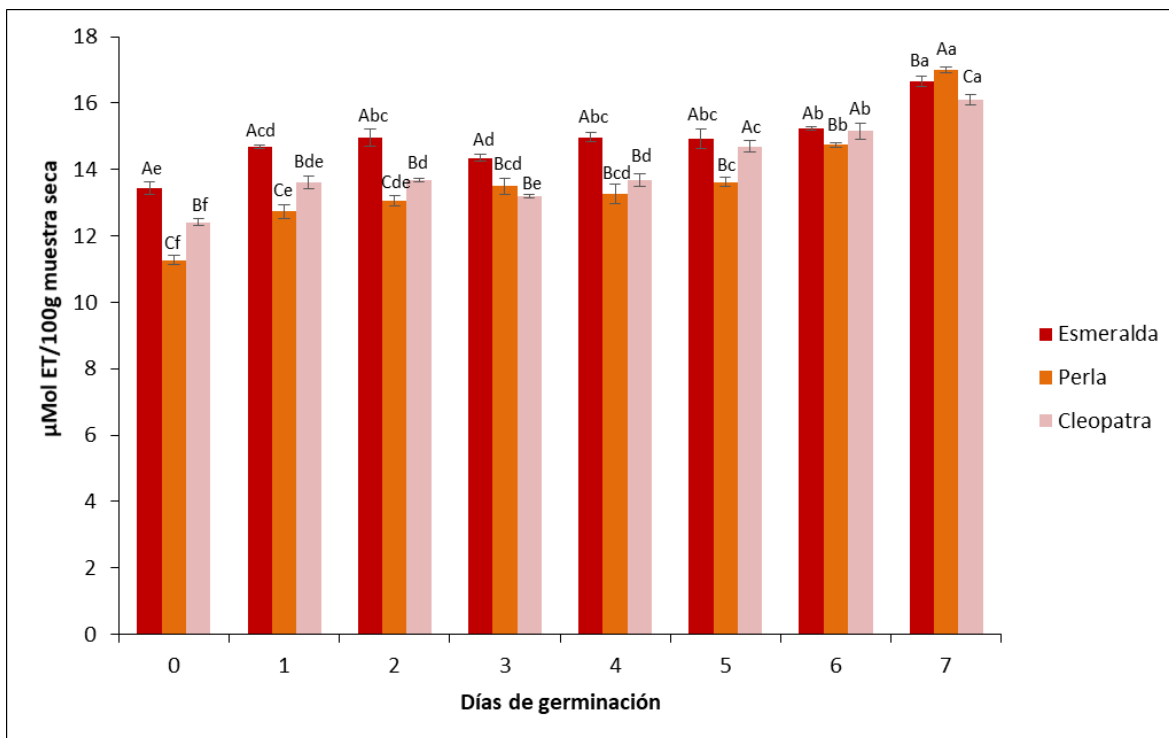


Figura 17. Capacidad de captación del radical DPPH

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de determinaciones por triplicado. Se aplicó el análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples Tukey. Las barras verticales representan la desviación estándar de cada uno de los datos. a:f - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en la misma variedad. A:C - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en el mismo día de germinación

8.5 Análisis FRAP

La Figura 18 muestra los resultados de las concentraciones de ion ferroso (Fe^{2+}) obtenidas para las 3 variedades de cebada germinada en estudio. A diferencia de los 2 métodos de cuantificación de actividad antioxidante anteriores, el método FRAP presentó una mayor actividad antioxidante durante el primer día de germinación en las variedades Perla y Cleopatra. Para la variedad Perla, la actividad mostró un aumento del 19% en comparación con la cebada sin germinar, significativamente igual ($p > 0.05$) a la actividad de los días 2, 3 y 7 de germinación de la misma variedad. En la variedad Cleopatra, el aumento en la actividad al primer día de germinación fue del 22% en comparación con la cebada sin germinar, significativamente diferente ($p < 0.05$) a las demás muestras germinadas y sin germinar. Por otro lado, la variedad Esmeralda mostró la mayor actividad antioxidante al día 7 de germinación, con un aumento del 11% en comparación con la cebada sin germinar, significativamente igual ($p > 0.05$) a la actividad de los días 1 y 5 de germinación de la misma variedad.

En las variedades Esmeralda y Perla, la menor actividad antioxidante se presentó en las muestras sin germinar, con valores de 7.15 ± 0.11 y 10.21 ± 0.68 mmol Fe

(II) ($100\text{g muestra seca}^{-1}$), respectivamente; siendo significativamente igual ($p>0.05$) a la actividad de los días 2, 3, 4 y 5 de germinación en la variedad Esmeralda, y a la actividad de los días 2, 3, 4, 5 y 6 de germinación en la variedad Perla. Para la variedad Cleopatra la menor actividad antioxidante se presentó en el día 4 de germinación, con un valor de 7.45 ± 0.46 mmol Fe (II) ($100\text{g muestra seca}^{-1}$), significativamente igual ($p>0.05$) a la actividad de los días 2, 3 y 5 de germinación de la misma variedad.

Este comportamiento desigual en la actividad antioxidante cuantificada mediante el método FRAP, en comparación con los otros 2 métodos estudiados, puede ser atribuido a los complejos formados por el ion Fe^{2+} , ya que, este compuesto no solo puede unirse a una amplia gama de compuestos antioxidantes (principalmente polifenoles), sino que también puede unirse a otros compuestos que presenten algún poder reductor. Y durante la movilización de nutrientes, principalmente observada durante las primeras 96 h de germinación, es más probable que algún otro compuesto pueda reaccionar, no solo los polifenoles (Martínez, 2007).

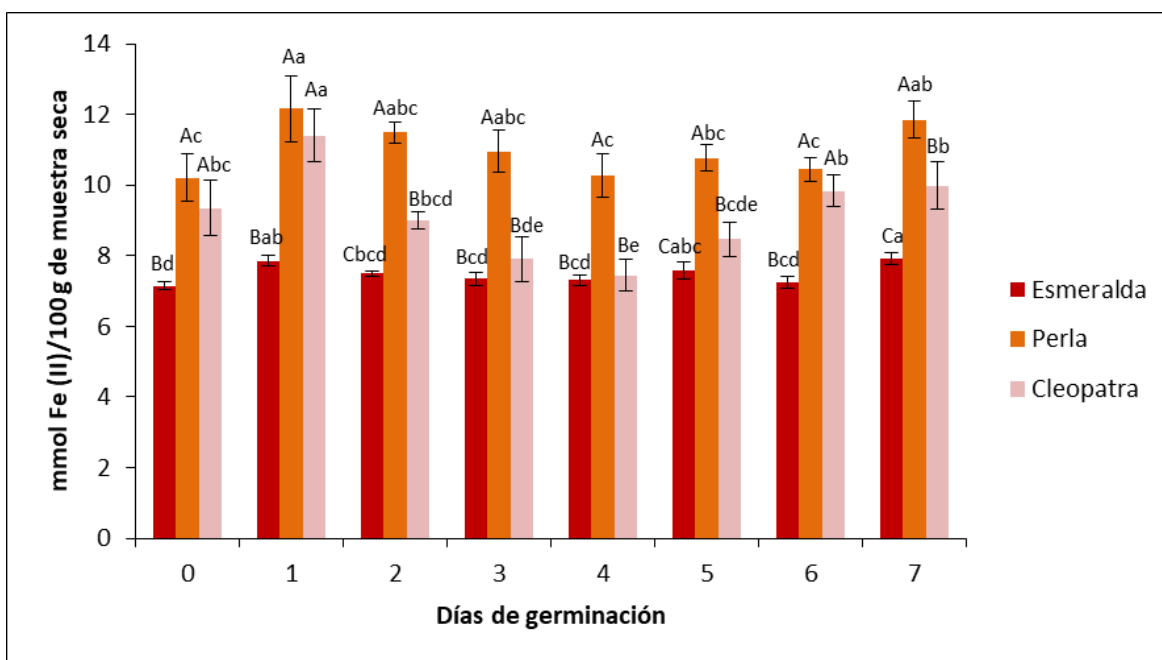


Figura 18. Capacidad de oxidación del ión Fe^{+2}

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de determinaciones por triplicado. Se aplicó el análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples Tukey. Las barras verticales representan la desviación estándar de cada uno de los datos. a:f - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en la misma variedad. A:C - Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los niveles en el mismo día de germinación

La metodología de cuantificación mediante FRAP, cuenta con algunos reportes en cereales dentro de la literatura, cuyas concentraciones son similares a las

obtenidas en este estudio. Fogarasi & col. (2015) en estudios con cebada germinada mediante diversos métodos y condiciones, reportó una concentración de 6 mmol Fe⁺² (100g muestra seca⁻¹) en cebada sin germinar, y 14 mmol Fe⁺² (100g muestra seca⁻¹) en cebada germinada durante 5 días. Liu & col. (2007) en estudios con cebada humedecida, reportó una concentración de 22 mmol Fe⁺² (100g muestra seca⁻¹).

9. CONCLUSIONES

La concentración de fenoles totales incrementa conforme el paso de la germinación. Presentando su óptima cuantificación al 7mo día de germinación.

La concentración de flavonoides no incrementa conforme el paso de la germinación.

La actividad antioxidante mediante el método ABTS y DPPH incrementa conforme el paso de la germinación; dicho aumento está directamente relacionado con la concentración de compuesto fenólicos totales. Por el contrario, la actividad antioxidante mediante el método FRAP no mostró incremento conforme el paso de la germinación; su óptima cuantificación se observó al 1er día y fue disminuyendo hasta el 7mo día de germinación.

El proceso de germinación de la cebada para las variedades Esmeralda, Perla y Cleopatra, favorece el incremento de la concentración de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.

REFERENCIAS

- Abdel-Aal, E. S., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal chemistry*, 76(3), 350-354.
- Badui Dergal, S., & Cejudo Gómez, H. R. T. (2006). *Química de los alimentos*. Pearson educación.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Chen, Z., Wang, P., Weng, Y., Ma, Y., Gu, Z., & Yang, R. (2017). Comparison of phenolic profiles, antioxidant capacity and relevant enzyme activity of different Chinese wheat varieties during germination. *Food Bioscience*, 20, 159-167.
- Chinma, C. E., Anuonye, J. C., Simon, O. C., Ohiare, R. O., & Danbaba, N. (2015). Effect of germination on the physicochemical and antioxidant characteristics of rice flour from three rice varieties from Nigeria. *Food chemistry*, 185, 454-458.
- Cornejo, F., Caceres, P. J., Martínez-Villaluenga, C., Rosell, C. M., & Frias, J. (2015). Effects of germination on the nutritive value and bioactive compounds of brown rice breads. *Food chemistry*, 173, 298-304.
- Courtis, A. C. (2013). *Germinación de semillas, cátedra y fisiología vegetal*. FaCENA. UNNE: México
- Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., & Liu, R. H. (2000). Nutrition: Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405(6789), 903.
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2005. <http://www.fao.org/>
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2008). Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. *Food Chemistry*, 111(3), 622-630.

- Fogarasi, A. L., Kun, S., Tankó, G., Stefanovits-Bányai, É. & Hegyesné-Vecseri, B. (2015). A comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts. *Food chemistry*, 167, 1-6.
- González Aguilar, G. A., Robles Sánchez, R. M., Plascencia Jatomea, M., Cortez Rocha, M. O., & Burgos Hernández, A. (2012). *Nuevas tendencias en ciencia y tecnología de alimentos: Tópicos selectos*. Universidad de Sonora, Sonora (México).
- Gonzalo, J. R., & Alonso, M. G. (2002). Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimentación Nutrición y Salud*, 9(2), 31-38.
- Herrera, M. D.; Reveles-Torres, L. R.; Velásquez-Valle, R. (2016). Cambios en el metabolismo de los fenilpropanoides en plantas de chile tipo mirasol infectadas por fitoplasma. *Folleto Técnico* 79, 34
- Hübner, F., O'Neil, T., Cashman, K. D., & Arendt, E. K. (2010). The influence of germination conditions on beta-glucan, dietary fibre and phytate during the germination of oats and barley. *European Food Research and Technology*, 231(1), 27-35.
- Jagtap, U. B., Panaskar, S. N., & Bapat, V. A. (2010). Evaluation of antioxidant capacity and phenol content in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) fruit pulp. *Plant foods for human nutrition*, 65(2), 99-104.
- Liu, Q., & Yao, H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food chemistry*, 102(3), 732-737.
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 73, 40-45.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Martínez, J. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Helicarpus terebinthinaceus* (Doctoral dissertation, Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Oaxaca, México).
- Medina, L. A. (2010). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Revista electrónica autodidacta*.

- Mesa, A. M., Rincón, D. C., Toro, J. F., Tamayo, A., Blair, S., & Rojano, B. A. (2011). Actividad antioxidante de *Piper piedecuestanum* trel. & Yunck. y *Piper subpedale* trel. & Yunck. *Revista latinoamericana de química*, 39(3), 91-99.
- Murcia, M., del Longo, O., Argüello, J. U. A. N., Perez, M. A., & Peretti, A. N. N. A. (2006). Evaluación del crecimiento de plántulas de cultivares de girasol con diferentes proporciones de ácidos oleico/linoleico en respuesta a la baja temperatura. *Revista Brasileira de Sementes*, 28(2), 95-101.
- Navas, H. (2013). Quantification of polyphenols, total flavonoids and isoflavones in arepas made with the partial addition of defatted soybean flour (*Glycine max*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(2), 237-249.
- Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C. C., Sellappan, S., & Krewer, G. (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(18), 5497-5503.
- Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 48-57.
- Pita, V. J. M. y Pérez, G. F. (1998). Germinación de semillas. Ministerio de agricultura pesca y alimentación: España.
- Porrás-Loaiza, A., & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 3(1), 121-124.
- Ragaei, S., Abdel-Aal, E. S. M., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food chemistry*, 98(1), 32-38.
- Ramos Gamiño, F. (2013). Maíz, trigo y arroz: los cereales que alimentan al mundo. Dirección de publicaciones de la UANL.
- Rao, R. S. P., & Muralikrishna, G. (2004). Non-starch polysaccharide-phenolic acid complexes from native and germinated cereals and millet. *Food Chemistry*, 84(4), 527-531.
- Robles, S. R. (1990) Producción de granos y forrajes. Dirección de publicaciones de la UAA (4ª edición).
- SAGARPA, SIAP. 2014. Cebada grano. México. <http://www.siap.gob.mx/cebada-grano/>

- SAGARPA. 2014. Mejora INIFAP variedad de cebada malteada tolerante a la roya y con mayor rendimiento. México. <http://sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B006.aspx>
- Sampietro, D. A. (2009). Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. CRC Press.
- Serna, S. S. R. O. 2001. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT Editor: México.
- Sharma, P., Gujral, H. S., & Singh, B. (2012). Antioxidant activity of barley as affected by extrusion cooking. *Food Chemistry*, 131(4), 1406-1413.
- Tian, B., Xie, B., Shi, J., Wu, J., Cai, Y., Xu, T., & Deng, Q. (2010). Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chemistry*, 119(3), 1195-1200.
- Tzin, V., & Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 8, 1-18.
- Zhou, K., Slavin, M., Lutterodt, H., Whent, M., Eskin, N. M., & Yu, L. (2013). Cereals and legumes. In *Biochemistry of Foods (Third Edition)* (pp. 3-48).
- Žilić, S., Šukalović, V. H. T., Dodig, D., Maksimović, V., Maksimović, M., & Basić, Z. (2011). Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 417-424.