

MÁSTER EN BIOLOGÍA VEGETAL APLICADA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

TÍTULO DEL TRABAJO: Optimización del proceso de germinación para la obtención de derivados saludables de avena.

AUTOR/A: Raquel Martínez Peña

TUTOR/A: Luisa Martín Calvarro

DIRECTORAS DEL TRABAJO: Elena Peñas Pozo

Cristina Martínez Villaluenga

Juana Frías Arevalillo

CURSO ACADÉMICO: 2015/2016

CONVOCATORIA: Julio

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

Isaac Newton

ÍNDICE

RESUMEN.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Avena (<i>Avena sativa</i> L.).....	1
1.2. Producción mundial de avena.....	1
1.3. Composición nutricional, fitoquímicos y efectos saludables de la avena.....	2
1.4. Proceso de germinación.....	8
1.5. Modificación de los constituyentes de la avena durante la germinación.....	9
1.6. Desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales derivados de la avena germinada.....	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
3.1. Material vegetal.....	15
3.2. Germinación.....	15
3.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	16
3.4. Preparación de extractos metanólicos.....	18
3.5. Preparación de extractos alcalinos.....	19
3.6. Determinación del contenido de compuestos fenólicos (totales y libres).....	19
3.7. Determinación de la actividad antioxidante.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1. Efecto de la temperatura y el tiempo en el porcentaje de germinación de la avena.....	23
4.2. Efecto de la temperatura y el tiempo de germinación en el contenido de compuestos fenólicos de la avena.....	27
4.2.1 Compuestos fenólicos totales (CFT).....	27
4.2.2 Compuestos fenólicos libres (CFL).....	30
4.2.3 Compuestos fenólicos no extraíbles (CFNE).....	34
4.3. Efecto de la temperatura y el tiempo de germinación en la actividad antioxidante de la avena.....	35
5. CONCLUSIONES.....	41
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43

RESUMEN

La avena ha ganado gran popularidad entre los consumidores en los últimos años debido a su elevado valor nutricional y a sus efectos beneficiosos sobre la salud. La germinación produce una mejora del valor nutricional y un aumento del contenido de compuestos bioactivos en los cereales, si bien las modificaciones de éstos dependen de las condiciones de germinación empleadas. El objetivo de la presente memoria ha sido la optimización del tiempo (24-216 h) y la temperatura (12-20 °C) de germinación mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con el fin de maximizar el contenido de compuestos fenólicos totales y libres, así como la actividad antioxidante de la avena. Los resultados revelaron que las condiciones de germinación óptimas correspondían a tiempos en el rango 160-216 h y temperaturas de 12-20 °C ya que causaron el mayor aumento de compuestos fenólicos totales y libres, así como la mayor actividad antioxidante en la avena. Los modelos de regresión generados mostraron altos coeficientes de determinación ($R^2 > 0.85$), indicando su idoneidad para explicar la variación de los datos experimentales, con la excepción del contenido de compuestos fenólicos no extraíbles en que el modelo cuadrático no mostró un buen ajuste a los datos experimentales. En conclusión, la germinación en las condiciones óptimas establecidas en el presente trabajo puede ser considerada una estrategia innovadora para diversificar la utilización de la avena por la industria agroalimentaria proporcionando, al mismo tiempo, germinados con un elevado contenido de compuestos fenólicos biodisponibles y mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: *Avena sativa* L., avena, germinación, compuestos fenólicos, actividad antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Avena (*Avena sativa* L.).

La avena común (*Avena sativa* L.) (**Figura 1**) es una especie fanerógama perteneciente a la familia *Poaceae*. Se trata de una planta herbácea anual y alohexaploide ($2n=6x=42$), ampliamente cultivada para utilizarla como alimento y como forraje en los países templados y subtropicales, pero también es posible cultivarla en las zonas tropicales de gran altitud. El origen silvestre de la especie *Avena sativa* L. es desconocido, se cree que deriva principalmente de la hibridación de otras dos especies del género *Avena*: la avena loca (*Avena fatua* L.) y la avena roja silvestre (*A. sterilis* L.) (FAO).



Figura 1. *Avena sativa* L. Foto tomada por S. Reynolds (FAO).

1.2. Producción mundial de avena.

La avena es el séptimo cereal más cultivado a nivel mundial con 1,13 millones de toneladas y el quinto en España (FAO, 2014). Los últimos datos recogidos por la FAO en el año 2014 indican que los cinco mayores productores de avena a nivel mundial son: Rusia (5,3 millones de toneladas), Polonia (1,5 millones de toneladas), Australia (1,2 millones de toneladas), Estados Unidos (1 millón de toneladas) y Reino

Unido (828.000 toneladas), encontrándose España en la sexta posición con una producción de 670.500 toneladas en 2014 (**Figura 2**).

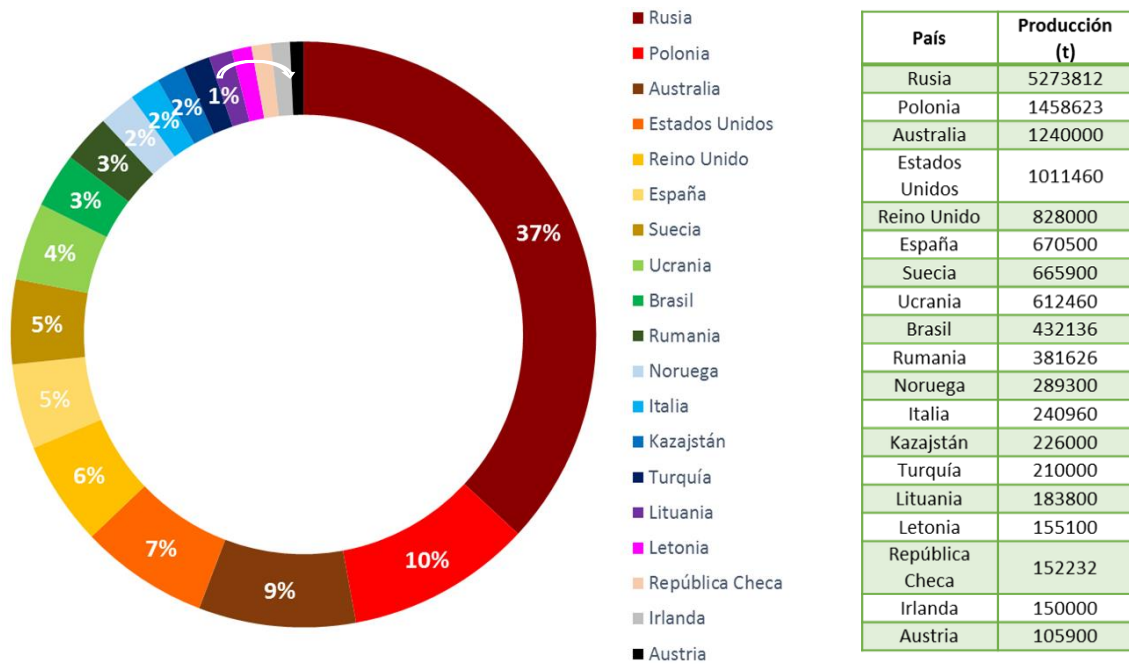


Figura 2. Producción mundial de Avena en el año 2014 (FAOSTAT, 2014).

1.3. Composición nutricional, fitoquímicos y efectos saludables de la avena.

La avena ha recibido un gran interés en los últimos años debido a su composición nutricional característica así como por su elevado contenido de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud. La avena es una fuente rica de hidratos de carbono, principalmente almidón (60%), fibra dietética (10-20%) y proteínas (11-15%). Además, presenta un elevado contenido de lípidos (5-9%), especialmente ácidos grasos poliinsaturados, junto con minerales, vitaminas E y del grupo B y fitoquímicos (compuestos fenólicos) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Composición nutricional y contenido de fitoquímicos de la avena.

Compuesto	Contenido
Almidón (g/100g)	60
Proteína (g/100 g)	11-15
Lípidos (g/100 g)	5-9
Fibra dietética soluble (g/100 g)	4,5
β-glucano (g/100 g)	2,3-8,5
Fibra dietética insoluble (g/100 g)	4,9
Minerales (g/100g)	2,02-2,37
Calcio (g/100 g)	0,54
Hierro (g/100 g)	0,05
Fosforo (g/100 g)	0,34
Magnesio (g/100 g)	0,13
Potasio (g/100 g)	0,35
Vitamina E (mg/100 g)	0,70-0,99
Vitaminas del grupo B	
Tiamina (mg/100 g)	0,3-0,77
Riboflavina (mg/100 g)	0,1-0,3
Niacina (mg/100 g)	32
Acido pantoténico (mg/100 g)	0,57-1
Nicotinamida (mg/100 g)	0,9-6,0
Piridoxina (mg/100 g)	0,22-2,3
Ácido fítico (g/100 g)	0,79-1,01
Compuestos fenólicos totales (mg/100g)	27,5-32,3
Ácido ferúlico (soluble + unido) (mg/100g)	36,01
Ácido cafeico (mg/100 g)	0,16
Ácido sinápico (mg/100 g)	0,04
Ácido p-cumárico (mg/100 g)	0,16
Ácido vanílico (mg/100 g)	0,27
Ácido 4-hidroxibenzoico (mg/100 g)	0,45
Avenantramida 2c (mg/100 g)	3,85
Avenantramida 2f (mg/100 g)	2,65
Avenantramida 2p (mg/100 g)	2,70
Aventramida K (mg/100 g)	1,95
4-Hidroxibenzaldehido	0,12
Vanillina	0,21
Lignanós totales (mg/100 g)	0,84
GABA (mg/100g)	0,54-1,41

Algunos estudios indican que el consumo de avena puede reducir el riesgo de algunas enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares (Anderson, 2003), la diabetes tipo II (Venn, 2004) y el cáncer (Boffetta y col. 2014). Estos beneficios parecen estar ligados a la presencia en este vegetal de altas concentraciones

de proteína, ácidos grasos (Gangopadhyay y col. 2015), compuestos fenólicos (Slavin, 2003), así como vitamina E, β -glucano y esteroides (Gani y col. 2012).

La fibra de la avena incluye una fracción insoluble (celulosa, hemicelulosas, arabinosilanos y lignina), así como una fracción soluble compuesta principalmente por β -glucano (Drzikova y col., 2005). La avena destaca frente a otros cereales por su contenido en β -glucano (**Figura 3**), polisacárido compuesto por residuos de glucosa unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4) que se sintetiza en las paredes del endospermo de la semilla (Gangopadhyay y col. 2015) y cuyo contenido puede variar de 2 a 8,5% del peso del grano entero dependiendo de la variedad (Flander y col., 2007). La actividad biológica del β -glucano depende del grado de polimerización y proporción de unidades celotriosil y celotetraosil cuya variabilidad está condicionada al genotipo, condiciones de cultivo y procesado del grano de avena (Zhao y col., 2014). Numerosas investigaciones en humanos han demostrado que el β -glucano disminuye la tensión arterial, reduce los niveles sanguíneos de glucosa e insulina (Juvonen y col., 2011), de colesterol total y unido a LDL (Thongoun y col., 2013) y activa el sistema inmune, jugando un papel protector contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Momenizadeh y col., 2014) y diabetes (Zhao y col., 2014). Más recientemente, se ha demostrado el potencial del β -glucano para estimular la saciedad y contribuir a la reducción del peso corporal en individuos con sobrepeso (Dong y col., 2014), así como para prevenir ciertos tipos de cáncer (Choromanska y col., 2015). Así mismo, el β -glucano tiene importantes propiedades prebióticas, estimulando la proliferación de bacterias intestinales beneficiosas (Arena y col., 2014). A la vista de las numerosas evidencias científicas sobre el efecto beneficioso para la salud del β -glucano, en Europa se permite realizar alegaciones de salud del tipo “reduce el colesterol” y “disminuye el riesgo de enfermedades coronarias” en alimentos que contienen una cantidad de este polisacárido igual o superior a 1 g, siendo necesario indicar al consumidor que este efecto beneficioso se obtiene con el consumo diario de 3 g de β -glucano procedente de avena (Thongoun y col., 2013).

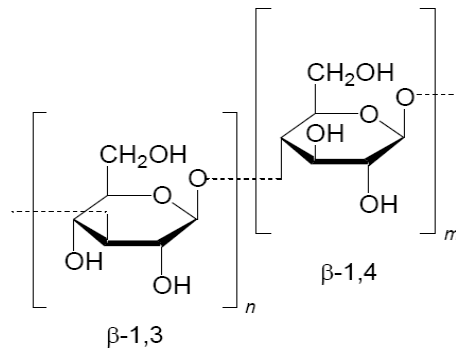


Figura 3. Estructura química del β -glucano (Gangopadhyay y col., 2015).

El efecto hipoglucemiante de la avena ha sido atribuido no solo a la presencia de β -glucano sino también a su elevado contenido de almidón resistente (25%), que presenta una lenta tasa de digestibilidad, lo que permite controlar los niveles de glucosa en sangre (Ovando-Martínez y col., 2013).

Los beneficios saludables de la avena también se han atribuido a la presencia de varios compuestos antioxidantes como los tocoles (vitamina E) (72,1 mg/kg peso seco) y compuestos fenólicos (275-323 mg/kg peso seco). Dentro del grupo de los tocoles se incluyen los tocoferoles y los tocotrienoles (**Figura 4**). Hay cuatro homólogos de tocoferoles y tocotrienoles (α , β , γ y δ) que difieren en el número y en la posición de los grupos metilo en el anillo aromático, llamado cromano, con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide (Peterson y col., 2007). La estructura química de los tocoles determina la actividad de la vitamina E. Estudios en animales, así como ensayos clínicos han demostrado que los tocotrienoles presentan actividades antioxidante y anticolesterolémica (Peterson y Wood, 1997).

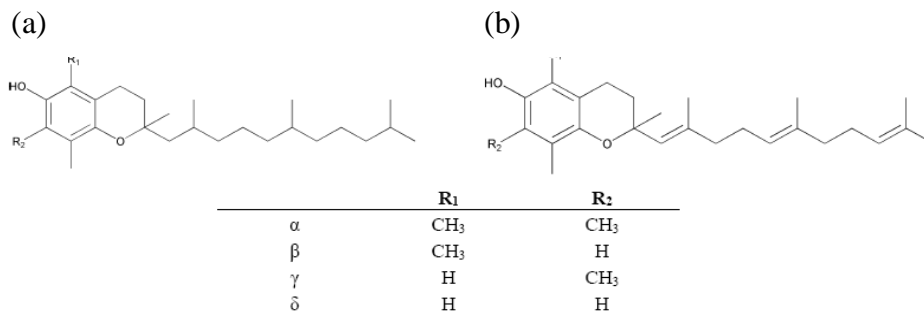


Figura 4. Estructura química de los tocoles. (a) tocoferoles; (b) tocotrienoles (Gangopadhyay y col., 2015).

Los compuestos fenólicos están formados por al menos un grupo fenol y un anillo aromático y contienen uno o más grupos hidroxilos. Generalmente se clasifican en función del número y de la disposición de los átomos de carbono en flavonoideos (flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, antocianidinas, flavanonas, e isoflavonas, entre otros) y no flavonoideos (ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos y estilbenos, entre otros). Los compuestos fenólicos se pueden encontrar libres como agliconas o conjugados con azúcares y ácidos orgánicos (Crozier y col., 2006; Cartea y col., 2011) o unidos a polisacáridos de la pared celular y proteínas por enlaces éster o éter (Acosta-Estrada y col., 2014). Los compuestos fenólicos más abundantes en la avena son los ácidos hidroxicinámicos (**Tabla 1**), encontrándose en forma soluble (25%) o insoluble unidos a los componentes de la pared celular (75%). El ácido hidroxicinámico más abundante en la avena es el ácido ferúlico que se encuentra principalmente unido a los polisacáridos de la pared celular. Las avenantramidas, compuestos exclusivos de este cereal, constituyen el segundo grupo más abundante de ácidos hidroxicinámicos solubles (Emmons y col., 1999; Hitayezu y col., 2015). Los compuestos fenólicos de la avena pueden ejercer un efecto antioxidante bien de forma directa, mediante la donación de átomos de hidrógeno por parte de estos compuestos a los radicales libres (radicales superóxido y peróxido), evitando así la oxidación de lípidos y de otras moléculas en el organismo (Porter, 2012) o quelando iones metálicos (Yang y col., 2014), o bien indirecta aumentando la expresión y actividad de enzimas implicadas en la detoxificación celular como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión S-transferasa y la NADPH quinona oxidoreductasa 1 (Dinkova-Kostova y col., 2007). Además, los compuestos fenólicos juegan un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares debido a sus propiedades antiaterogénicas (Nie y col., 2006) y antiinflamatorias (Guo y col., 2008), habiéndose descrito otras actividades beneficiosas para la salud de estos compuestos, como son propiedades anticancerígenas, antienvjecimiento y antitrombóticas (Oh y Rajashekar, 2009). Por otra parte, se ha descrito que las avenantramidas poseen propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas, ya que inhiben la liberación de moléculas proinflamatorias por parte de los macrófagos y la adhesión de los monocitos a las células endoteliales de la aorta (Liu y col., 2004). Así mismo, mejoran la producción de óxido nítrico en el endotelio vascular, compuesto que causa la dilatación de los vasos sanguíneos, contribuyendo de este modo a la disminución de la presión arterial (Nie y col., 2006).

La avena presenta, además, pequeñas concentraciones de ácido γ -aminobutírico (GABA), aminoácido libre no proteico de cuatro átomos de carbono, que se sintetiza a través de la α -descarboxilación irreversible del ácido glutámico por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (**Figura 5**). El contenido de GABA en la avena oscila entre 0,54 y 1,41 mg/100 g, cantidades que dependen de la variedad de avena y de las condiciones de cultivo (Xu y col., 2010). En las plantas, el GABA está involucrado en el crecimiento y defensa contra insectos fitófagos. A este compuesto se le atribuyen efectos beneficiosos para la salud humana por sus propiedades antihipertensivas (Yoshimura, 2010), así como por su efecto positivo en la mejora de los procesos cognitivos (Wu y col., 2012; Diana y col., 2014) y en la inhibición de la proliferación de células cancerígenas (Oh y Oh., 2004).

La avena contiene también compuestos no nutricionales como el ácido fítico, compuesto consistente en un anillo inositol esterificado con 6 grupos fosfato. Debido a su carga negativa, este compuesto forma complejos con los iones minerales, disminuyendo su biodisponibilidad (Zhou y Erdman, 1995). Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que el ácido fítico presenta una elevada actividad antioxidante y está relacionado con la prevención de ciertos tipos de cáncer, probablemente debido a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales prooxidantes (Hübner y col., 2010).

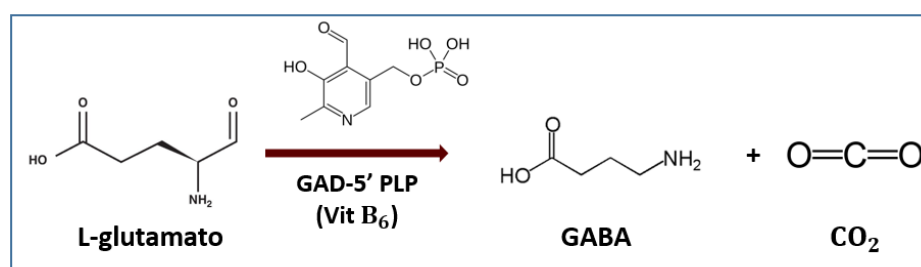


Figura 5: Síntesis de GABA por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Xu y col., 2010).

1.4. Proceso de germinación.

La germinación es un proceso metabólico complejo en el que la semilla pasa de un estado quiescente a una fase metabólica activa responsable de proporcionar la energía y los nutrientes necesarios para el desarrollo de la nueva planta (Paucar-Menacho y col., 2010). Este proceso implica una gran variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos en la semilla que incluyen la síntesis, transformación y degradación de compuestos (Rumiyati y col., 2013). La germinación comienza con la absorción de agua por parte de la semilla y finaliza con la emergencia de la plántula a través de las cubiertas. Para que la germinación tenga lugar, es necesario que coexistan varios factores: humedad favorable responsable de la hidratación de la semilla, disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada para que se inicien los procesos metabólicos que darán lugar al desarrollo de la nueva planta (Nonogaki y Bassel, 2010).

El proceso de germinación comprende tres fases: imbibición, activación y crecimiento post-germinación. Durante la fase de imbibición se produce la hidratación de la semilla, fenómeno que causa la reactivación del metabolismo y la hidrólisis de proteínas y carbohidratos de reserva, por la activación de las enzimas amilolíticas, lipolíticas y proteolíticas, a la vez que se sintetizan y acumulan nuevos metabolitos, algunos de ellos beneficiosos para la salud (Nonogaki y Bassel, 2010). Por lo tanto, durante la germinación se modifican las características nutritivas, bioactivas y organolépticas de las semillas, cambios que van a depender de las condiciones de germinación.

Durante siglos, las semillas de cereales se han germinado con el fin de ablandar la estructura del grano, mejorar su valor nutricional, reducir los compuestos no nutritivos (Tian y col., 2010) y mejorar la funcionalidad de las proteínas (Kaukovirta-Norja y col., 2004). En los últimos años, sin embargo, la germinación se está empleando para maximizar el contenido de compuestos bioactivos en los cereales, contribuyendo a potenciar las propiedades saludables de estos vegetales. Los germinados vegetales han ganado gran popularidad entre los consumidores de los países occidentales al considerarse alimentos saludables de alto valor nutritivo, que pueden ser consumidos crudos o cocinados. A pesar de su alto valor nutricional y elevado contenido de compuestos bioactivos, la avena no ha sido aún explotada por la industria

agroalimentaria para la obtención de germinados vegetales. La producción de germinados de avena constituiría una estrategia novedosa para incrementar el cultivo y el consumo de este cereal, y tendría gran interés para el consumidor por sus beneficios nutricionales y sobre la salud.

1.5. Modificación de los constituyentes de la avena durante la germinación.

Diversos estudios han demostrado que la germinación mejora la calidad nutricional del grano de avena. Durante la germinación, las proteínas de la semilla de avena son degradadas, incrementando el contenido de proteína soluble y de aminoácidos libres, especialmente de lisina, treonina y valina (Tian y col., 2010; Xu y col., 2010), debido a la activación de proteasas endógenas (Klose y col., 2009; Hübner y Arendt, 2013). La germinación, además, causa una disminución del contenido de ácido fítico en la avena, ya que incrementa la actividad de la enzima fitasa responsable de su hidrólisis (Centeno y col., 2001; Hübner y col., 2010). El contenido de hidratos de carbono también se modifica durante la germinación, habiéndose observado que los niveles de almidón disminuyen cerca del 40% tras la germinación de avena durante 144 h a 16 °C, condiciones en las que la actividad de la enzima α -amilasa aumenta 6 veces con respecto a la semilla no germinada incrementándose, de este modo, el contenido de azúcares libres entre 3 y 4 veces (Tian y col., 2010). El aumento de actividad amilásica tras la germinación de avena en diferentes condiciones ha sido también observado por otros autores (Mäkinen y col., 2013). La fibra dietética, tanto soluble como insoluble, también experimenta cambios significativos durante la germinación de este cereal. En este sentido, se ha observado que los germinados de avena presentan mayor contenido de fibra total, debido al aumento del contenido de fibra insoluble durante este proceso. En cambio, el contenido de fibra soluble disminuyó en germinados de avena obtenidos a 15°C durante periodos de tiempo comprendidos entre 62 y 96 h, no observándose cambios en periodos de tiempo más cortos (48 h) (Hübner y col., 2010). La disminución de fibra soluble durante la germinación se ha atribuido al descenso del contenido de β -glucano, debido al aumento de la actividad de la enzima β -glucanasa endógena (Peterson y col., 1998), responsable de la hidrólisis de este compuesto. Así, tiempos de germinación prolongados causan la degradación casi total de este compuesto. Sin

embargo, tiempos de germinación cortos ocasionan una mayor retención del β -glucano, ya que la enzima β -glucanasa no se activa completamente (Ellis y col., 1997). En este sentido, Wilhelmson y col. (2001) pusieron de manifiesto que la germinación durante un corto periodo de tiempo (72 h) a baja temperatura (15 °C) causó una retención del 55-60 % del contenido de β -glucano.

La inducción del metabolismo en las semillas de avena durante la germinación también afecta al contenido y composición de compuestos fenólicos, siendo este efecto dependiente de la variedad considerada y de las condiciones de germinación. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la germinación durante periodos de 12 a 120 h a temperaturas en el rango 16-20 °C incrementan significativamente el contenido de compuestos fenólicos totales y libres en la avena (Xu y col., 2009; Tian y col., 2010). Este aumento se debe a la activación de enzimas que hidrolizan los enlaces entre los compuestos fenólicos y polisacáridos de la pared celular, incrementando el contenido de compuestos fenólicos libres, así como la síntesis *de novo* de compuestos fenólicos durante el proceso de germinación (Kaukovirta-Norja y col., 2004; Skoglund y col., 2008). Así mismo, algunos autores han observado el incremento del contenido de avenantramidas después del remojo y de la germinación de la avena, debido a la activación de enzimas implicadas en la síntesis de estos compuestos. En particular, la germinación aumenta la actividad de la enzima hidroxicinamoil-CoA:hidroxiantranilato N-hidroxicinamoil transferasa que cataliza la condensación de los ácidos antranílicos y los ésteres de hidroxicinamoil-coenzima A (Bryngelsson y col., 2003; Matsukawa y col., 2000; Skoglund y col., 2008). El incremento en el contenido de compuestos fenólicos libres durante el proceso de germinación de la avena se refleja en las propiedades antioxidantes de los germinados resultantes. Un estudio realizado con *Avena nuda* L. demostró que el remojo de los granos a 16 °C entre 8 y 24 h y su posterior germinación en oscuridad a 20 °C entre 24 y 48 h mejoró la capacidad de neutralizar radicales libres mediante la reducción del radical DPPH y del ión férrico (III) (Xu y col., 2009). Sin embargo, es de destacar que se observaron diferencias en el grado de respuesta dependiendo del tiempo de remojo y germinación.

Por otro lado, Xu y colaboradores observaron una acumulación de GABA tras el remojo y posterior germinación de la avena durante 48 h a 16 °C, debido a la síntesis de su precursor, el ácido glutámico, por hidrólisis de las proteínas de la avena, así como

por la activación de la enzima GAD, que cataliza la conversión de ácido glutámico a GABA (Xu y col., 2010).

El contenido de ácido fítico también sufre modificaciones durante la germinación de la avena, disminuyendo entre un 15 y un 35%, dependiendo de las condiciones de germinación, como consecuencia de la activación de la enzima fitasa responsable de su hidrólisis (Hübner y col., 2010; Tian y col., 2010; Kaukovirta y col., 2014). El descenso de ácido fítico se ha relacionado con una mejora de la absorción de hierro y calcio en la avena (Rossander-Hulten y col., 1990; Sandström y col., 1990).

Por todo lo expuesto, se puede deducir que la selección de las condiciones óptimas de germinación es crucial para maximizar el valor nutritivo y el contenido de compuestos bioactivos de la avena. Este hecho, junto con las connotaciones de alimentos nutritivos, saludables y sus características organolépticas, hacen que los germinados de avena sean alimentos tremendamente atractivos para los consumidores concienciados por el binomio dieta-salud.

1.6. Desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales derivados de la avena germinada.

El aumento del uso del trigo, arroz y maíz en la dieta humana ha conducido a una disminución en el consumo de avena en los últimos años. Sin embargo, la avena se ha continuado cultivando con intensidad, siendo el tercer cereal cultivado en Europa tras el trigo y la cebada (Eurostat, 2014) empleándose también para alimentación animal (Biel y col. 2009).

En los últimos años, sin embargo, el desarrollo de productos alimenticios a base de avena como panes, galletas, bebidas probióticas, copos de desayuno y alimentos para lactantes está ganando cada vez mayor consideración (Rasane y col., 2013), debido a la calidad nutricional y efectos saludables de este cereal. La avena presenta la ventaja de que se emplea habitualmente como ingrediente en el desarrollo de diversos alimentos como grano entero o integral, denominada avena desnuda, que contiene el salvado, el endospermo y el germen y está considerada como un “alimento saludable”. En cambio, otros cereales como el arroz y el trigo se emplean como granos refinados, en los que el salvado y el germen se eliminan durante el proceso de molienda (Rasane y col., 2013).

La avena presenta altos niveles de antioxidantes que contribuyen a la protección frente al enranciamiento de los alimentos que la contienen, preservando, al mismo tiempo, su color y sabor. Además, el empleo de avena como ingrediente en el desarrollo de nuevos alimentos es muy atractivo para el consumidor, cada vez más preocupado por el empleo de aditivos químicos alimentarios. Esta preocupación está impulsando a la industria alimentaria hacia la producción de nuevos alimentos que contengan una mayor proporción de antioxidantes naturales, mediante la aplicación de estrategias tecnológicas que eviten la degradación de los nutrientes y compuestos biológicamente activos (Skoglund y col., 2008). En este sentido, la germinación representa una alternativa efectiva y viable desde el punto de vista económico para la consecución de estos objetivos. Los germinados de avena podrían consumirse, no sólo como alimentos frescos formando parte de ensaladas y platos preparados, sino que podrían emplearse para la obtención de harinas para la elaboración de productos tales como galletas, panes, pasta, productos de bollería y snacks, entre otros, con la ventaja de que al no contener gluten pueden ser consumidos también por la población celíaca (la avena es un alimento certificado como libre de gluten por el Reglamento de la Comisión Europea, nº 41/2009). Así, la producción de germinados de avena contribuiría a diversificar el mercado de los alimentos libres de gluten destinados a éstas personas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los alimentos ricos en antioxidantes son de gran interés debido a la evidencia científica acumulada que demuestra que su consumo está asociado a la reducción del riesgo de desarrollar ciertas enfermedades no transmisibles (enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer, entre otras). Por este motivo, el mercado internacional ha incrementado la presencia de los denominados alimentos funcionales ricos en antioxidantes. Previo a su comercialización con esta alegación sanitaria, en Europa debe demostrarse que los alimentos contienen una cantidad del compuesto bioactivo en una dosis fisiológicamente activa. El grano de avena es una fuente rica de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes. Al igual que en otros cereales, la mayoría de los compuestos fenólicos del grano de avena se encuentran unidos covalentemente a los componentes de la fibra del salvado siendo, por tanto, no biodisponibles una vez ingeridos, hecho que limita que puedan ejercer su efecto antioxidante en el organismo.

El proceso de germinación permite mejorar el valor nutricional de los cereales y su contenido en compuestos bioactivos con beneficios para la salud incluyendo antioxidantes de distinta naturaleza. La germinación de cereales activa el metabolismo, la solubilización y la movilización de los compuestos fenólicos modificando, a su vez, la relación entre compuestos fenólicos solubles y unidos en el grano, su biodisponibilidad y su actividad antioxidante. Estos efectos dependen de las condiciones ambientales (temperatura, tiempo, luz, etc) en las que transcurre el proceso de germinación. Por tanto, nuestra hipótesis de partida es que la germinación en condiciones óptimas de tiempo y temperatura permitirá maximizar el contenido de compuestos fenólicos tanto totales como solubles y la actividad antioxidante de la avena.

A partir de esta hipótesis de partida, el presente estudio tiene como objetivo general optimizar la temperatura y el tiempo de germinación para maximizar el contenido de compuestos fenólicos (totales y solubles) y la actividad antioxidante de la avena. Para abordar el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar la influencia de la temperatura y tiempo de germinación en el porcentaje de germinación, contenido de compuestos fenólicos totales, solubles e insolubles y la actividad antioxidante del grano de avena desnuda.

2. Optimizar la temperatura y tiempo de germinación para obtener germinados de avena desnuda con el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y solubles y actividad antioxidante

La consecución de los objetivos propuestos permitirá obtener alimentos e ingredientes con propiedades saludables y potenciar la producción y el consumo de avena.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal.

En este estudio se han empleado semillas de avena (*Avena sativa* L. var. Ivory) desnuda, que han sido suministradas por la empresa Emilio Esteban S.A. (Valladolid). Las semillas se conservaron en contenedores de polietileno a temperatura ambiente en oscuridad hasta su uso.

3.2. Germinación.

Para llevar a cabo el proceso de germinación, se pesaron 20 g de semillas de avena y se lavaron con agua del grifo para eliminar la suciedad. Posteriormente, las semillas se remojaron en una solución de hipoclorito sódico al 0,1% (proporción 1:6 p/v) durante 30 min para conseguir su higienización y así evitar la proliferación de microorganismos. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, las semillas se lavaron abundantemente con agua del grifo hasta obtener un pH neutro. A continuación, las semillas se remojaron en agua estéril (proporción 1:6 p/v) durante 4 h. Este tiempo se seleccionó mediante la realización de una curva en la que se representó el porcentaje de ganancia de peso de la semilla frente al tiempo de remojo (**Figura 6**), observándose una rápida absorción de agua por parte de la semilla durante las primeras 4 h, aumentando, en consecuencia, el peso de la semilla un 38%, no observándose cambios significativos posteriores.

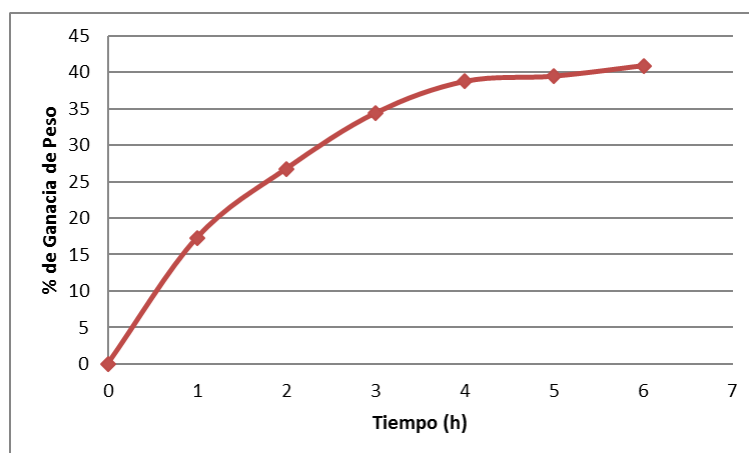


Figura 6. Porcentaje de ganancia de peso del grano de avena tras 6 horas de remojo en agua.

Después del periodo de remojo, las semillas se dispusieron en unas rejillas cubiertas con papel de filtro esterilizado, colocadas sobre unas bandejas de plástico y cubiertas, a su vez, con papel de filtro esterilizado húmedo, con el fin de que la hidratación de las semillas durante la germinación sea homogénea. La germinación se llevó a cabo en una cámara de germinación (modelo G-120, ASL Snijders International S. L., Holanda), equipada con un sistema de circulación de agua que proporciona una humedad relativa > 90%. La germinación se llevó a cabo en oscuridad a temperaturas comprendidas entre 12-20 °C y tiempos en el rango 24-216 h. Los experimentos de germinación para cada condición estudiada se realizaron por duplicado. La **figura 7** ilustra los pasos realizados en el proceso de germinación. Los germinados de avena obtenidos se liofilizaron y se molieron empleando un molinillo de café (Moulinex). Las harinas obtenidas se almacenaron al vacío en bolsas de plástico en oscuridad a -20 °C hasta su análisis.



Figura 7. Procedimiento de germinación llevado a cabo en las semillas de avena.

3.3. Diseño experimental y análisis estadístico.

La influencia de la temperatura y el tiempo de germinación en el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los germinados de avena se estudió empleando la **Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)**. La MSR es una estrategia de modelización basada en el ajuste de los datos experimentales a una ecuación polinómica, que describirá la influencia de diferentes factores sobre diversas variables respuesta, con el objeto de realizar previsiones estadísticas. Es una estrategia estadística útil en procesos en los que las variables de interés están influenciadas por

diversos factores. Estudiar el efecto de cada factor separadamente requiere mucho tiempo y no tiene en cuenta la posible interacción entre los factores. La MSR permite estudiar el efecto de diferentes factores y sus interacciones simultáneamente, con el fin de optimizar las condiciones de operación de un proceso y mejorar significativamente su resultado en cuanto a eficiencia, productividad, calidad, etc (Bezerra y col., 2008).

Para la MSR, en este trabajo se ha empleado un modelo compuesto central de tipo rotacional que emplea ecuaciones polinómicas de segundo grado. Las variables independientes consideradas fueron el tiempo y la temperatura de germinación, considerándose 5 niveles para cada una de las variables, denominados $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ y $+\alpha$ (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de las variables independientes consideradas en el diseño experimental.

Codificadas	Variables independientes		Niveles				
	Reales		$-\alpha$	-1	0	$+1$	$+\alpha$
X ₁	Tiempo de germinación (h)		24	60	96	156	216
X ₂	Temperatura de germinación (°C)		12	14	16	18	20

De acuerdo con el modelo empleado, se estudiaron 11 combinaciones de las variables tiempo y temperatura durante la germinación, como se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Combinaciones de las variables tiempo y temperatura de germinación empleadas en el diseño experimental.

Experimento	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
1	60 (-1)	14 (-1)
2	156 (+1)	14 (-1)
3	60 (-1)	18 (+1)
4	156 (+1)	18 (+1)
5	24 ($-\alpha$)	16 (0)
6	216 ($+\alpha$)	16 (0)
7	96 (0)	12 ($-\alpha$)
8	96 (0)	20 ($+\alpha$)
9	96 (0)	16 (0)
10	96 (0)	16 (0)
11	96 (0)	16 (0)

La siguiente ecuación polinómica de segundo grado se empleó para expresar las variables respuesta en función de las variables independientes (**Ecuación 1**). Mediante esta ecuación se determinaron los efectos lineales (X_1 , X_2), cuadráticos (X_1^2 , X_2^2) y las interacciones de las variables temperatura y tiempo (X_1X_2) de germinación para una determinada variable respuesta (Y).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad \boxed{\text{Ecuación 1}}$$

Donde Y representa la variable respuesta que se va a modelizar, β_0 es una constante, β_i es el coeficiente lineal, β_{ii} es el coeficiente cuadrático, β_{ij} es el coeficiente de interacción, X_i y X_j son las variables independientes, tiempo y temperatura, respectivamente.

La bondad del ajuste de los modelos obtenidos a los datos experimentales se evaluó tras la obtención de los coeficientes de determinación múltiple (R^2) y el análisis de la varianza (ANOVA) de los coeficientes de las ecuaciones polinómicas obtenidas para cada variable respuesta, empleando para ello el software Statistica 5.0 (Statsoft, USA), donde los valores de probabilidad al 95 % ($P < 0,05$) indican que los términos de la ecuación son significativos. Se obtuvieron, así mismo, gráficos de superficie de respuesta tridimensionales con el fin de ilustrar los efectos de las variables independientes en las variables respuesta.

3.4. Preparación de extractos metanólicos.

Se prepararon extractos metanólicos de las diversas muestras de germinados de avena así como del grano no germinado. Para ello, se pesaron 0,5 g de la muestra molida (harina) y se añadieron 10 mL de una solución (MeOH:HCl)/H₂O en la proporción [(1000:1)80]/20, incubándose durante 16 h en continua agitación a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm a 5 °C durante 5 min y se filtraron a través de papel de filtro (Whatman n°1). La extracción se realizó por duplicado para cada muestra. El extracto metanólico se empleó para la determinación de la actividad antioxidante y del contenido de compuestos fenólicos libres.

3.5. Preparación de extractos alcalinos.

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales se prepararon extractos alcalinos del grano de avena y de los diferentes germinados obtenidos. Para ello, se pesaron 0,5 g de la muestra molida (harina) y se añadieron 10 mL de una solución de NaOH 2M, incubándose durante 16 h en continua agitación a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente, las muestras se diluyeron con agua destilada hasta un volumen de 25 mL y se centrifugaron a 5.000 rpm a 5 °C durante 5 min filtrándose, posteriormente, a través de papel de filtro (Whatman nº1). La extracción se realizó por duplicado para cada muestra.

3.6. Determinación del contenido de compuestos fenólicos (totales y libres).

El contenido de compuestos fenólicos tanto totales (CFT) como libres (CFL) se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu en los extractos alcalinos o metanólicos, respectivamente. Este método colorimétrico se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, que contiene molibdato y tungstato sódico, a pH básico, formándose complejos cromógenos de color azul intenso que presentan un máximo de absorción a 739 nm (Peterson, 1979). La absorbancia es proporcional al número de grupos hidroxilo del compuesto fenólico (Julkunen-Tiito, 1985).

En este ensayo se utilizaron los siguientes reactivos:

1. Solución de carbonato sódico al 7,5% (p/v).
2. Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma).
3. Solución stock de ácido gálico (450 µg/mL) (Sigma). Esta solución se emplea como patrón del ensayo, siendo estable a -20 °C un máximo de 2 semanas. En el momento de uso, se realizó una batería de diluciones en un rango de concentraciones 0-225 µg/mL.

La determinación de CFL y CFT se realizó en tubos eppendorf añadiendo a 100 µL del extracto metanólico o alcalino obtenido para cada muestra, patrón o blanco, 625

μL de agua bidestilada, 250 μL de Na_2CO_3 al 7,5% y 25 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N. Los tubos eppendorf se agitaron y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se determinó la absorbancia a 739 nm en un lector de placas multipocillo (Synergy HT, Biotek), adicionándose 200 μL de las mezclas de reacción en cada pocillo. La determinación de los CFL y CFT se realizó por triplicado para cada muestra. El contenido de compuestos fenólicos no extraíbles (CFNE) se calculó restando a la concentración de los CFT la de los CFL. Los resultados se expresaron como mg ácido gálico equivalentes/100 g peso seco (mg GAE/100 g p.s.).

3.7. Determinación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se determinó mediante el método ORAC, que evalúa la capacidad de atrapar radicales de oxígeno. Este método se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno por parte de los antioxidantes contenidos en la muestra a los radicales libres presentes en el medio. Para que tenga lugar esta reacción se emplea como radical iniciador el reactivo AAPH que, en condiciones aerobias, reacciona con el oxígeno rápidamente perdiendo 1 mol de nitrógeno, dando lugar a dos radicales peroxilo más estables (ROO^\cdot) (**Reacción 1, Figura 8**). En la reacción se añade fluoresceína, compuesto que emite fluorescencia cuando se excita con luz azul (465-490 nm) y que es oxidada por los radicales ROO^\cdot presentes, perdiendo fluorescencia (**Reacción 2, Figura 8**). La pérdida de fluorescencia de la fluoresceína es el indicador de la extensión de la oxidación por el radical peroxilo.

Al añadir la muestra problema, los antioxidantes (AH) presentes cederán un átomo de hidrógeno a los radicales peroxilo, ralentizando el descenso de la fluorescencia (**Reacción 3, Figura 8**). La protección de la fluoresceína por el antioxidante se mide a partir del área bajo la curva obtenida al representar el descenso de la fluorescencia en el tiempo en la muestra problema en comparación con la obtenida en el blanco, donde el antioxidante no está presente.

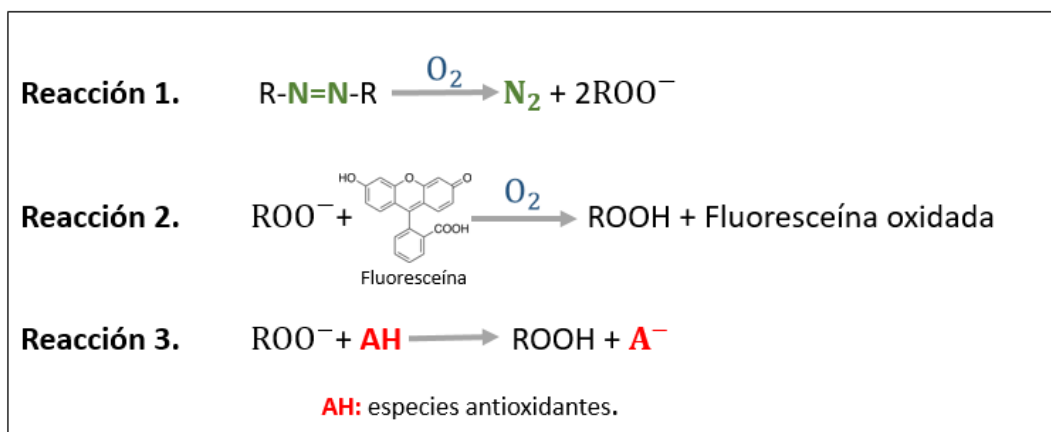


Figura 8. Reacciones químicas que tienen lugar durante el ensayo ORAC.

En este ensayo se utilizaron los siguientes reactivos:

1. Tampón fosfato sódico (Sigma) 75 mM, pH 7,4.
2. Solución de fluoresceína sódica (Sigma) 116,9 nM en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4. Se preparó previamente una solución de fluoresceína stock (1 mM) que se diluyó en el momento del uso. Se hicieron alícuotas de 1 mL de esta solución stock que se mantuvieron a -20 °C, siendo estable durante un máximo de 2 semanas.
3. Solución de 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH) (Sigma) 40 mM en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4.
4. Solución de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico (Trolox) (Sigma) 4 mM en tampón fosfato 75 mM, pH 7,4. Esta solución stock de Trolox se emplea como patrón en el ensayo, y es estable a -20 °C durante un máximo de 2 semanas. En el momento de uso se realizó una curva patrón con una batería de diluciones (en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7,4) en un rango de concentraciones 0-160 µM.

La determinación de la actividad antioxidante de las muestras se realizó en placas multipocillo, añadiendo a los pocillos 30 µL de Trolox (patrón), tampón fosfato 75 mM pH 7,4 (blanco) o extracto metanólico correspondiente a cada muestra diluido en tampón fosfato 75 mM, pH 7,4 y 180 µL de la solución de fluoresceína 116,9 nM. La determinación de la actividad antioxidante de cada muestra se realizó por triplicado, empleando un lector de placas multipocillo (Synergy HT, Biotek). El protocolo del

ensayo incluyó una preincubación a 37 °C durante 15 min en la placa multipocillo, una dosificación automática de 90 µL de la solución del reactivo AAPH 40 mM, agitación automática de la placa y lectura de la fluorescencia cada 2 min a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 528 nm, respectivamente, durante 2 h y 30 min.

Se realizó una curva patrón representando los valores del área bajo la curva de los patrones de Trolox frente a su concentración expresada en µM. Por último, se utilizó la ecuación de la recta patrón obtenida para calcular la capacidad de atrapar radicales de oxígeno de las muestras, expresando los resultados en mg de Trolox equivalentes/100 g peso seco (mg TE/100 g p.s.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la temperatura y el tiempo en el porcentaje de germinación de la avena.

El tiempo y la temperatura de germinación influyeron significativamente en la capacidad germinativa de la avena. El porcentaje de germinación varió desde una ausencia total de germinación cuando el proceso se realizó a 16 °C durante 24 h hasta un 65% cuando se llevó a cabo a 20°C durante 96 h (**Tabla 4**).

El modelo de regresión obtenido para el porcentaje de germinación en función del tiempo (X_1) y la temperatura (X_2) se muestra en la **Ecuación 2**.

Todos los términos de la ecuación polinómica de segundo grado tuvieron una influencia significativa en el porcentaje de germinación de la avena. Los términos lineales y cuadráticos relativos al tiempo y la temperatura mostraron un efecto altamente significativo ($P \leq 0,01$) sobre la capacidad germinativa de la avena, siendo el efecto positivo en el caso de los términos lineales y negativo en el caso de los términos cuadráticos. La interacción entre ambos factores fue también significativa ($P \leq 0,05$), observándose un efecto negativo sobre el porcentaje de germinación (**Tabla 5**). Como se aprecia en esta tabla, el modelo de regresión obtenido fue significativo en los rangos de tiempo y temperatura estudiados, ya que se obtuvo un valor del coeficiente de determinación elevado ($R^2 = 0,92$). En términos generales, solamente valores de R^2 superiores a 0,75 indican la adecuación del modelo matemático para explicar los datos experimentales (Peñas y col., 2008). La bondad del ajuste del modelo se puede observar también en la **Figura 9**, que representa los valores experimentales del porcentaje de germinación en las diferentes condiciones frente a los valores predictivos.

Tabla 4. Porcentaje de germinación de las semillas de avena en las diferentes condiciones de germinación (tiempo y temperatura) obtenidas mediante la Metodología de Superficie de Respuesta.

Experimento	Tiempo (X ₁) (h)	Temperatura (X ₂) (°C)	Germinación (%)
1	-1 (60)	-1 (14)	31,0±0,7
2	+1 (156)	-1 (14)	62,0±0,7
3	-1 (60)	+1 (18)	43,3±3,5
4	+1 (156)	+1 (18)	58,5±0,5
5	-α (24)	0 (16)	NG
6	+α (216)	0 (16)	48,0±2,8
7	0 (96)	-α (12)	25,0±2,2
8	0 (96)	+α (20)	65,0±4,2
9	0 (96)	0 (16)	57,5±0,5
10	0 (96)	0 (16)	63,0±5,0
11	0 (96)	0 (16)	50,5±2,5

NG: no germinada

$$\text{PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (\%)} = 60,88 + 15,21 X_1 - 9,72 X_1^2 + 6,50 X_2 - 2,86 X_2^2 - 4,86 X_1 \cdot X_2$$

Ecuación 2

Tabla 5. Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo grado obtenida mediante la Metodología de Superficie de Respuesta para el porcentaje de germinación de la avena.

Coeficientes	Germinación (%)
β_0 (constante)	60,88**
Términos lineales	
β_1 (Tiempo)	15,21**
β_2 (Temperatura)	6,50**
Términos cuadráticos	
β_{11}	-9,72**
β_{22}	-2,86**
Interacción	
β_{12}	-4,86*
Coefficiente de determinación (R^2)	0,91578

*Valores de los coeficientes de regresión significativos ($P \leq 0,05$).

**Valores de los coeficientes de regresión altamente significativos ($P \leq 0,01$).

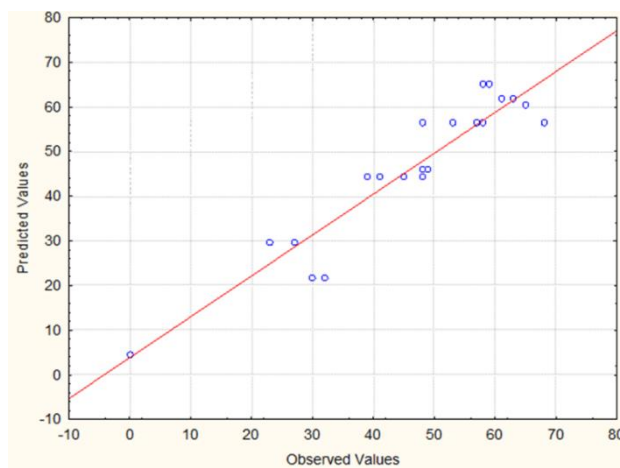


Figura 9. Representación de los valores experimentales del porcentaje de germinación de la avena frente a los valores predictivos.

Los efectos de las condiciones de procesado sobre la capacidad germinativa de las semillas de avena también se pueden observar en el gráfico de superficie de respuesta (**Figura 10**). Como resulta evidente en la figura, el porcentaje de germinación aumentó al incrementarse el tiempo y la temperatura de germinación hasta aproximadamente 140 h y 18 °C, respectivamente, disminuyendo posteriormente. Las condiciones óptimas obtenidas mediante MSR para maximizar el porcentaje de germinación de la avena correspondieron a 140-180 h y 15-19 °C.

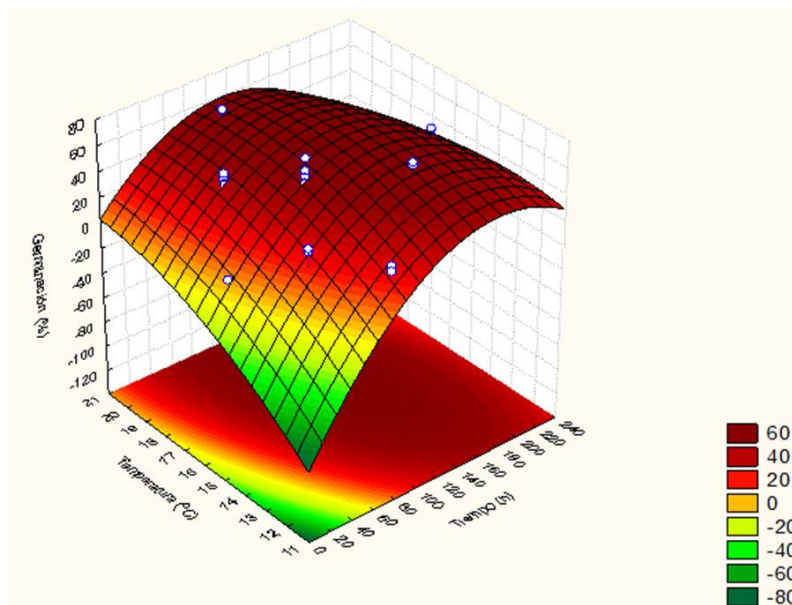


Figura 10. Superficie de respuesta del porcentaje de germinación de la avena en función del tiempo y la temperatura.

No existe ningún estudio en la bibliografía encaminado a evaluar la influencia de diversas condiciones de germinación en la capacidad germinativa de la avena. Sin embargo, la mayoría de estudios de germinación dirigidos a aumentar el contenido de compuestos bioactivos en la avena se han llevado a cabo a temperaturas comprendidas entre 10 y 20 °C durante periodos de tiempo entre 48-144 h (Hübner y col., 2010; Skoglund y col., 2008; Tian y col., 2010; Xu y col., 2009, 2010). Estos estudios, por tanto, se han realizado durante periodos de germinación más cortos a los empleados en este trabajo.

A pesar de que no existen estudios de optimización de las condiciones de germinación para aumentar la capacidad germinativa de la avena, un estudio realizado en avena salvaje (*A. fatua*) mostró que temperaturas de germinación de 17 ± 2 °C dieron

lugar a porcentajes de germinación en el rango 65-72,5 % (Almaghrabi, 2012), si bien en el estudio no se indica el tiempo de germinación empleado. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en el presente trabajo con temperaturas de germinación de 16-20 °C aplicadas durante 96-156 h.

4.2. Efecto de la temperatura y el tiempo de germinación en el contenido de compuestos fenólicos de la avena.

4.2.1 Compuestos fenólicos totales (CFT).

La avena no germinada presentó un contenido de CFT de $805,82 \pm 16,67$ mg GAE/100 g p.s. En general, la germinación tuvo una influencia positiva en los niveles de CFT, que variaron entre 680,62 y 1641,85 mg GAE/100 g p.s., dependiendo de las condiciones de germinación (**Tabla 6; Figura 11**).

El modelo predictivo obtenido para el contenido de CFT se muestra en la **Ecuación 3**. Tanto los términos lineales como cuadráticos del tiempo y la temperatura tuvieron efectos altamente significativos ($P \leq 0,01$) sobre el contenido de CFT en los germinados de avena, presentando los términos lineales una influencia positiva y los cuadráticos negativa. La interacción entre ambos factores también influyó significativamente ($P \leq 0,05$) y de manera negativa sobre la concentración de estos compuestos (**Tabla 7**).

El valor del coeficiente de determinación obtenido para el modelo (**Tabla 7**) indica la bondad del ajuste de dicho modelo cuadrático, que explica más del 91% de las variaciones de los datos experimentales relativos al contenido de CFT. La adecuación del modelo de regresión a los datos experimentales también se observa en la **Figura 12**, donde se aprecia que los valores predictivos del modelo están muy próximos a los valores experimentales (observados).

Las condiciones de germinación óptimas según el MSR para maximizar el contenido de CFT en los germinados de avena correspondieron a tiempos entre 160 y 216 h y a temperaturas de 20 °C.

Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), libres (CFL) y no extraíbles (CFNE) de los germinados de avena en las diferentes condiciones (tiempo y temperatura) obtenidas mediante la Metodología de Superficie de Respuesta.

Experimento	Tiempo (X ₁) (h)	Temperatura (X ₂) (°C)	Compuestos fenólicos (mg GAE /100 g p.s.)		
			CFT	CFL	CFNE
1	-1 (60)	-1 (14)	1142,20±89,63	669,42±36,63	430,83±12,15
2	+1 (156)	-1 (14)	1507,36±49,86	1004,09±47,81	506,12±69,95
3	-1 (60)	+1 (18)	1002,48±66,70	517,03±32,27	479,84±67,10
4	+1 (156)	+1 (18)	1641,85±41,47	688,04±16,36	819,37±78,47
5	-α (24)	0 (16)	680,62±47,66	385,14±14,93	348,59±6,38
6	+α (216)	0 (16)	1379,93±18,38	857,78±75,80	514,20±27,47
7	0 (96)	-α (12)	1036,97±4,12	864,81±66,62	233,30±1,61
8	0 (96)	+α (20)	1319,51±31,20	930,94±20,70	388,57±14,91
9	0 (96)	0 (16)	926,96±0,70	542,87±34,68	180,61±8,87
10	0 (96)	0 (16)	933,04±4,70	723,33±22,90	187,54±4,90
11	0 (96)	0 (16)	911,48±5,16	690,71±38,75	198,21±7,54

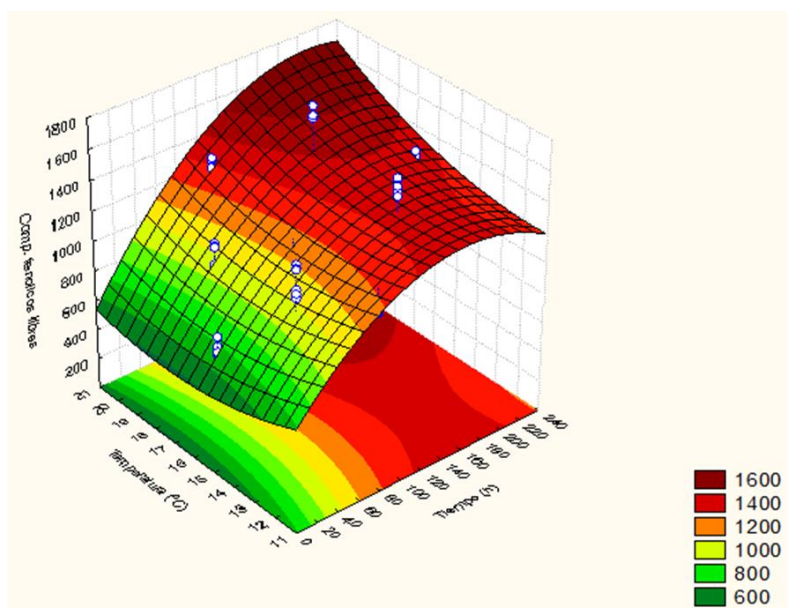


Figura 11. Superficie de respuesta del contenido de CFT (mg GAE/ 100 g p.s.) de los germinados de avena en función del tiempo y la temperatura de germinación.

$$\text{CFT} = -343,735 + 2,028 X_1 - 0,004 X_1^2 + 31,499 X_2 - 0,714 X_2^2 - 0,050 X_1 \cdot X_2$$

Ecuación 3

Tabla 7. Coeficientes de regresión de la ecuación de segundo grado polinómica obtenida mediante la Metodología de Superficie de Respuesta para el contenido de CFT.

Coeficientes	CFT (mg GAE/100 g p.s.)
β_0 (constante)	-343,735**
Términos lineales	
β_1 (Tiempo)	2,028**
β_2 (Temperatura)	31,499**
Términos cuadráticos	
β_{11}	-0,004**
β_{22}	-0,714**
Interacción	
β_{12}	-0,050*
Coefficiente de determinación (R^2)	0,91578

*Valores de los coeficientes de regresión significativos ($P \leq 0,05$).

**Valores de los coeficientes de regresión altamente significativos ($P \leq 0,01$).

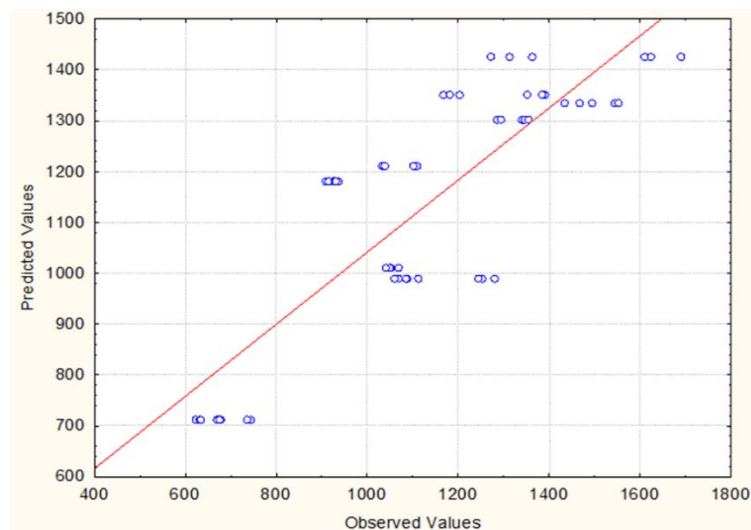


Figura 12. Representación de los valores experimentales del contenido de CFT de los germinados de avena frente a los valores predictivos.

El aumento de CFT durante la germinación de la avena a 16-20 °C durante 48-144 h ha sido puesto previamente de manifiesto por otros autores (Oksman-Caldentey y col., 2001; Skoglund y col., 2008; Xu y col., 2009; Tian y col., 2010). La síntesis *de novo* de compuestos fenólicos durante la germinación debido a la activación de enzimas responsables de su síntesis, parece ser responsable del aumento de CFT en la avena germinada. En este sentido, Skoglund y col. (2008) observaron un aumento de avenantramidas entre 29 y 125% durante la germinación de la avena por activación de la enzima hidroxicinamoil-CoA:hidroxiantranilato *N*-hidroxicinamoil transferasa, implicada en su síntesis, así como por la liberación de precursores de las avenantramidas unidos a la pared celular. Estos hallazgos apoyan nuestros resultados, indicando un aumento de CFT en todas las condiciones de germinación empleadas, con la excepción de 16 °C y 24 h, probablemente debido a que el tiempo de germinación es muy corto para que se activen enzimas responsables de la síntesis o liberación de compuestos fenólicos.

4.2.2 Compuestos fenólicos libres (CFL).

El contenido de CFL de la semilla de avena fue $463,61 \pm 6,52$ mg GAE/ 100 g p.s. La germinación causó un aumento notable de los niveles de CFL, con la excepción

del proceso llevado a cabo a 16 °C durante 24 h en el que el contenido de CFL fue significativamente ($P \leq 0,05$) inferior debido a que en estas condiciones las semillas de avena no germinaron. El contenido de CFL en los germinados de avena varió entre 385,14 y 1004,09 mg GAE/100g p.s., dependiendo de las condiciones de germinación (**Tabla 6**). Con el fin de visualizar gráficamente los efectos del tiempo y la temperatura sobre los niveles de CFL en los germinados de avena se generó el gráfico de superficie de respuesta correspondiente (**Figura 12**).

El valor de los coeficientes de regresión del modelo predictivo obtenidos aplicando la MSR indicó que la influencia de la temperatura fue muy superior al del tiempo de germinación en la concentración de CFL, ya que tuvo un efecto tanto lineal como cuadrático, mientras que el tiempo sólo influyó de manera lineal, no siendo significativo el efecto del término cuadrático. La interacción entre ambos factores también tuvo una influencia altamente significativa y negativa en los niveles de CFL (**Tabla 8**).

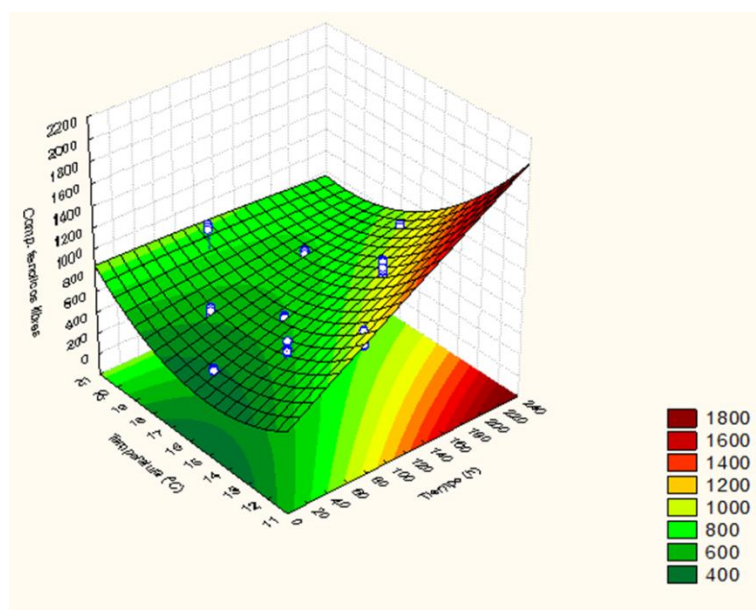


Figura 12. Superficie de respuesta del contenido de CFL (mg GAE/ 100 g p.s.) de los germinados de avena en función del tiempo y la temperatura de germinación.

Tabla 8. Coeficientes de regresión de la ecuación de segundo grado polinómica obtenida mediante la Metodología de Superficie de Respuesta para el contenido de CFL.

Coeficientes	CFL (mg GAE/100 g p.s.)
β_0 (constante)	624,79**
Términos lineales	
β_1 (Tiempo)	132,22**
β_2 (Temperatura)	-77,35**
Términos cuadráticos	
β_{11}	-2,65**
β_{22}	62,56**
Interacción	
β_{12}	-59,69*
Coefficiente de determinación (R^2)	0,77012

*Valores de los coeficientes de regresión significativos ($P \leq 0,05$).

**Valores de los coeficientes de regresión altamente significativos ($P \leq 0,01$)

El modelo de regresión obtenido para el contenido de CFL (mg GAE/100 g p.s.) se muestra en la **Ecuación 4**.

$$\text{CFL} = 624,79 + 132,22 X_1 - 2,65 X_1^2 - 77,35 X_2 + 62,56 X_2^2 - 59,69 X_1 \cdot X_2$$

Ecuación 4

El modelo cuadrático obtenido para la concentración de CFL presentó un buen ajuste a los datos experimentales, como se aprecia en la **Figura 13**, de acuerdo con el valor del coeficiente de determinación obtenido ($R^2 = 0,8575$) (**Tabla 8**). Las condiciones de germinación óptimas para incrementar el contenido de CFL según el modelo de regresión obtenido en los germinados de avena fueron 12 °C y 180-216 h.

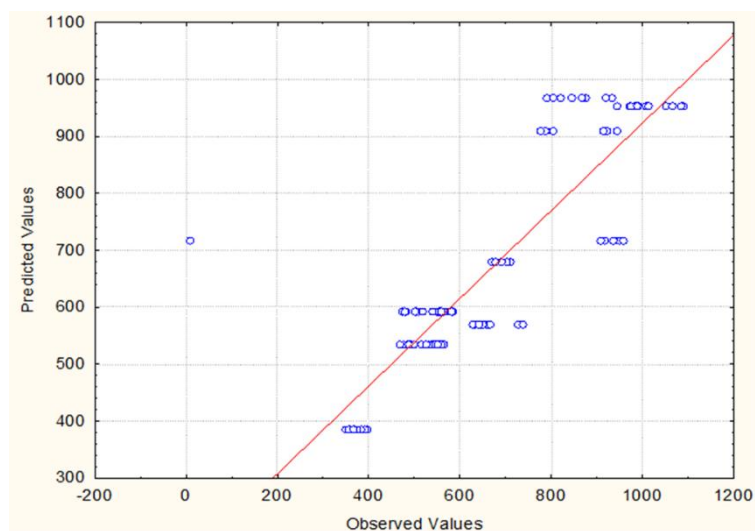


Figura 13. Representación de los valores experimentales del contenido de CFL de los germinados de avena frente a los valores predictivos.

El contenido de CFL observado en los germinados de avena fue muy superior al de la avena cruda, a excepción de las semillas incubadas a 16 °C durante 24 h que no germinaron. Nuestros resultados fueron similares a los de otros estudios en los que se observó un mayor contenido de CFL y CFT en granos germinados de trigo, arroz y sorgo (Nelson y col., 2013). Tian y col. (2010) encontraron un aumento del contenido de CFL de más de 3,5 veces en las semillas de avena germinadas durante 144 h. Por el contrario, condiciones de temperatura de germinación de 16 °C durante 24 h disminuyeron el contenido de CFL con respecto a las semillas sin germinar. El descenso de CFL durante la germinación a 16 °C durante 24 h coincide con los resultados observados en cebada por Lu y col. (2007), quienes encontraron un descenso de CFL por la degradación de ácidos fenólicos solubles tras la germinación de este cereal durante cortos periodos de tiempo. Diversos estudios han mostrado que la mayor parte de los compuestos fenólicos de la avena son ácidos fenólicos que se encuentran ligados a través de una unión covalente (enlaces tipo éter o éster) a polisacáridos o proteínas de la pared celular (Peterson, 2001; Adom y col., 2002; Xu y col., 2009). Tanto el proceso de remojo como el de germinación de los cereales produce un ablandamiento de las paredes celulares, así como la síntesis y activación de enzimas esterasas capaces de hidrolizar estos enlaces, liberando compuestos libres, fenómeno que ocasiona un aumento de los CFL (Kaukovirta-Norja y col., 2004; Dvoráková y col., 2008). Este

aumento durante la germinación puede atribuirse, por otro lado, a la síntesis de nuevos compuestos fenólicos durante el proceso, como se ha comentado anteriormente. En general, se observó que el aumento de CFL contribuyó significativamente al aumento de CFT en los germinados de avena.

4.2.3 Compuestos fenólicos no extraíbles (CFNE).

El contenido de CFNE, es decir, aquellos compuestos fenólicos unidos a polisacáridos o proteínas de la pared celular, en el grano de avena fue $332,21 \pm 17,16$ mg GAE/100 g p.s. Los niveles de estos compuestos sufrieron modificaciones significativas durante el proceso de germinación, aumentando o disminuyendo en función de las condiciones de germinación empleadas (**Tabla 6**).

El modelo de regresión obtenido para la concentración de CFNE presentó un valor del coeficiente de determinación inferior a 0,75 ($R^2 = 0,39$), indicando que este modelo no se ajusta a los datos observados en los rangos de tiempo y temperatura estudiados, no apreciándose, por tanto, efectos lineales o cuadráticos significativos del tiempo y la temperatura de germinación sobre el contenido de estos compuestos. La falta de ajuste del modelo a los datos experimentales se puede también observar gráficamente en la **Figura 14**. A pesar de que el modelo predictivo obtenido no fue significativo, la **Tabla 6** muestra que la germinación a 12 y 16 °C durante 96 h causó una disminución significativa de los CFNE, mientras que cuando el proceso se realizó a 16 °C durante un periodo de tiempo superior (216 h) se observó un aumento de los niveles de estos compuestos. Temperaturas de 14, 18 y 20 °C aplicadas durante 60-156 h causaron también un aumento de la concentración de CFNE.

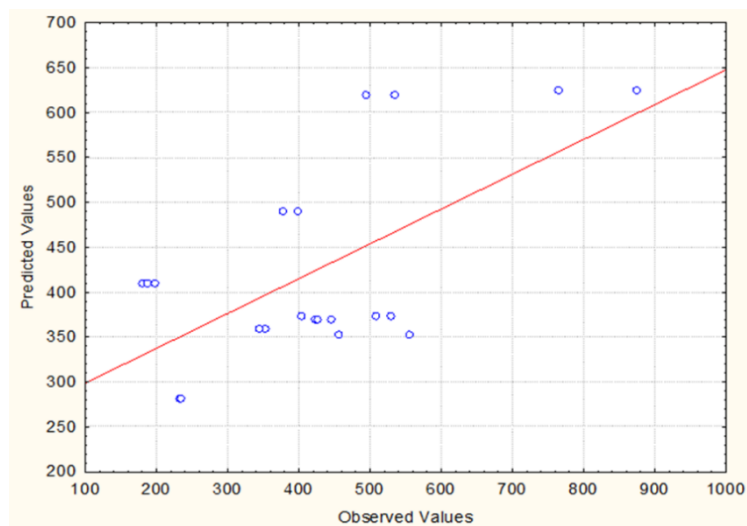


Figura 14. Representación de los valores experimentales del contenido de CFNE de los germinados de avena frente a los valores predictivos.

Nuestros resultados están en concordancia con estudios anteriores que demuestran que el contenido de CFNE varía con el tiempo de germinación. Se ha descrito que durante la germinación de alpiste (*Phalaris canariensis* L.) los compuestos fenólicos unidos disminuyen hasta las 24 h y, posteriormente, aumentan de forma gradual hasta un 120% a las 120 h (Chen y col., 2016). Ti y col. (2014) también observaron una tendencia similar en la que el contenido de compuestos fenólicos unidos en el arroz integral aumentaba gradualmente con el tiempo de germinación de un 22.5% a un 44.6%. Sin embargo, algunos estudios realizados en avena describen resultados opuestos observándose que tiempos de germinación de 48 h reducen gradualmente el contenido de compuestos fenólicos unidos (Xu y col., 2009).

4.3. Efecto de la temperatura y el tiempo de germinación en la actividad antioxidante de la avena.

La avena no germinada presentó una actividad antioxidante, determinada por el método ORAC-FL, de $617,53 \pm 61,20$ mg TE/100 g p.s. Durante la germinación, la actividad antioxidante de la avena sufrió modificaciones significativas, obteniéndose valores de ORAC de los germinados en el rango comprendido entre 790,04 y 3091,68 mg TE/100 g p.s., dependiendo de las condiciones de germinación (**Tabla 9**). Los germinados de avena obtenidos a 16 °C durante 216 h presentaron la mayor actividad

antioxidante ($3091,68 \pm 308,13$ mg TE/100 g p.s.), que fue 5 veces superior a la de la avena cruda.

La temperatura presentó una mayor influencia que el tiempo de germinación en la actividad antioxidante de los germinados de avena, siendo altamente significativos ($P \leq 0,01$) tanto el término lineal como el cuadrático, si bien el efecto del primero fue negativo y del segundo positivo. En cambio, en el caso del tiempo de germinación, si bien éste parámetro presentó efectos lineales altamente significativos ($P \leq 0,01$), el efecto cuadrático no fue significativo ($P > 0,05$). La interacción entre ambos factores también influyó de modo muy significativo sobre la actividad antioxidante de los germinados de avena ($P \leq 0,01$) (**Tabla 10**), siendo el efecto negativo.

El efecto del tiempo y la temperatura de germinación sobre la actividad antioxidante de los germinados de avena también se observa en el gráfico de superficie de respuesta (**Figura 15**), que muestra que a mayor temperatura y tiempo de germinación se observan los mayores valores de actividad antioxidante en los germinados de avena.

Tabla 9. Actividad antioxidante de la avena germinada en las diferentes condiciones (tiempo y temperatura) obtenidas mediante la Metodología de Superficie de Respuesta.

Experimento	Tiempo (X₁) (h)	Temperatura (X₂) (°C)	Actividad antioxidante (mg TE/ 100 g p.s.)
1	-1 (60)	-1 (14)	1247,79±87,83
2	+1 (156)	-1 (14)	2551,92±188,07
3	-1 (60)	+1 (18)	1522,71±110,24
4	+1 (156)	+1 (18)	2484,56±91,22
5	- α (24)	0 (16)	790,04±57,11
6	+ α (216)	0 (16)	3091,68±308,13
7	0 (96)	- α (12)	1812,62±161,28
8	0 (96)	+ α (20)	2245,33±169,68
9	0 (96)	0 (16)	1592,88±128,96
10	0 (96)	0 (16)	1616,89±153,92
11	0 (96)	0 (16)	1653,95±196,40

Tabla 10. Coeficientes de regresión de la ecuación de segundo grado polinómica obtenida mediante la Metodología de Superficie de Respuesta para la actividad antioxidante de los germinados de avena.

Coeficientes	Actividad antioxidante (mg TE/100 g p.s.)
β_0 (constante)	4238,507**
Términos lineales	
β_1 (Tiempo)	29,504**
β_2 (Temperatura)	-623,342**
Términos cuadráticos	
β_{11}	0,003
β_{22}	24,495**
Interacción	
β_{12}	-1,136**
Coefficiente de determinación (R^2)	0,92708

*Valores de los coeficientes de regresión significativos ($p \leq 0.05$).

**Valores de los coeficientes de regresión altamente significativos ($p \leq 0.01$).

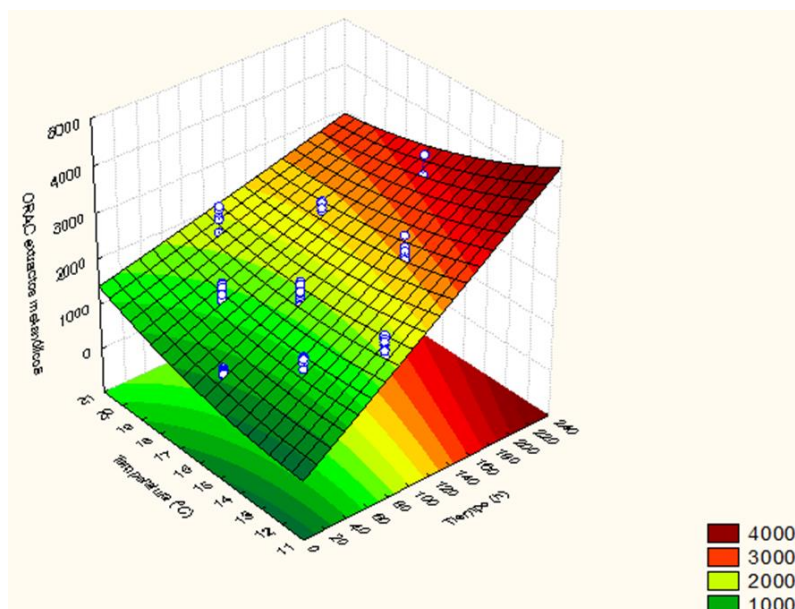


Figura 15. Superficie de respuesta de la actividad antioxidante de los germinados de avena en función del tiempo y la temperatura de germinación.

El modelo de regresión obtenido para la actividad antioxidante de los germinados de avena en función del tiempo y la temperatura de germinación se muestra en la **Ecuación 5**, donde se ha eliminado el coeficiente cuadrático del tiempo por no mostrar efectos significativos, como se ha comentado con anterioridad.

$$\text{Activ. Antiox.} = 4238,507 + 29,504X_1 - 623,342X_2 + 24,495X_2^2 - 1,136 X_1.X_2$$

Ecuación 5

El ajuste del modelo obtenido a los datos experimentales fue muy alto ($R^2=0,92708$), indicando que este modelo explica el 93% de la variabilidad en los datos experimentales. La eliminación del término cuadrático del tiempo debido a su falta de significación aumentó ligeramente el coeficiente de determinación ($R^2=0,93041$). La bondad del ajuste del modelo se puede observar gráficamente en la **Figura 16**.

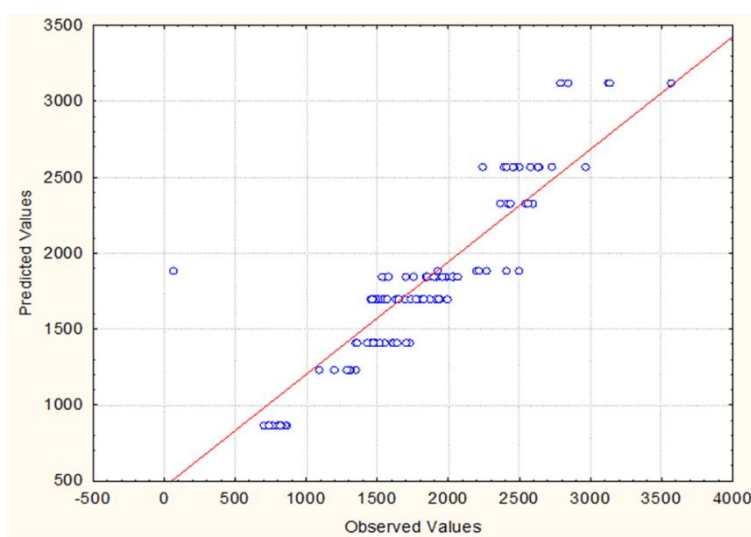


Figura 16. Representación de los valores experimentales de la actividad antioxidante de los germinados de avena frente a los valores predictivos.

Las condiciones más favorables, de acuerdo al modelo de regresión, para maximizar la actividad antioxidante de los germinados de avena fueron 18-20 °C y 200-216 h, condiciones en las que el valor de actividad antioxidante estimada es de 3030,506 mg TE/100 g p.s.

Los compuestos fenólicos y los tocoles son considerados los principales responsables de la actividad antioxidante de la avena (Hammond, 1983; Forssell, 1990). En este sentido, Emmons y col. (1999) encontraron que el contenido de CFT de la avena se correlacionaba significativamente con la actividad antioxidante de este cereal. Diversos estudios han observado un aumento de la actividad antioxidante de la avena tras su germinación debido al aumento del contenido de CFT (Kaukovirta-Norja y col., 2001, Oksman-Caldentey y col. 2001). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por estos autores, ya que hemos observado un aumento de la actividad antioxidante durante la germinación, obteniéndose los valores de actividad antioxidante más elevados en aquellas condiciones en las que los germinados presentaban mayor contenido de CFT (14 y 18 °C durante 156 h y 16 °C durante 216 h). Xu y col. (2009), observaron que la actividad antioxidante de los germinados de avena se correlacionaba positivamente con el contenido de CFL, mientras que existía una correlación negativa con el contenido de CFNE. Este grupo también observó que la actividad antioxidante de los germinados de avena se atribuía principalmente a los cambios del contenido de algunos ácidos fenólicos con alta actividad antioxidante, como el ácido ferúlico y las avenantramidas, especialmente la 2f. La liberación de estos compuestos durante la germinación explicaría también el aumento de CFL y la mayor actividad antioxidante de la avena tras su germinación encontrada en el presente trabajo. Esta hipótesis se sustenta por la correlación positiva encontrada entre la actividad antioxidante y el contenido de CFL en los germinados de avena ($r=0,7518$). Los valores de actividad antioxidante de los germinados de avena observados en cada estudio presentan diferencias, debido, sin duda, a la diferente variedad de avena empleada, que contendrá diferente concentración endógena de compuestos antioxidantes, así como al diverso método para determinar la actividad antioxidante usado en cada estudio (ORAC o DPPH). Xu y col. (2009) observaron que el aumento del tiempo de germinación de 36 a 48 h no causaba un aumento de la actividad antioxidante, resultados contrarios a los observados en el presente trabajo, donde tiempos de germinación superiores causaron la mayor actividad antioxidante en los germinados de avena.

No se puede descartar, sin embargo, que otros compuestos antioxidantes sintetizados durante la germinación estén contribuyendo a la actividad antioxidante observada en los germinados de avena.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La Metodología de Superficie de Respuesta es una herramienta útil para establecer condiciones de germinación óptimas con el fin de aumentar el contenido y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y mejorar la actividad antioxidante de la avena.
2. Los modelos de regresión generados mostraron un elevado ajuste ($R^2 > 0,85$), presentando los valores predictivos obtenidos con estos modelos una alta correlación con los datos experimentales.
3. La capacidad germinativa de la avena depende del tiempo y la temperatura de germinación. El mayor porcentaje de germinación de la avena se alcanzó a temperaturas entre 15 y 19 °C e intervalos de tiempo entre 140 y 180 h.
4. La germinación aumentó el contenido de compuestos fenólicos totales y libres en la avena. Las condiciones óptimas para maximizar el contenido de estos compuestos es de 20 °C durante 160-216 h, y 12 °C durante 180-216 h, respectivamente.
5. Las condiciones de germinación afectaron al contenido de compuestos fenólicos no extraíbles. Temperaturas de germinación de 12 y 16 °C y tiempos de 96 h disminuyeron los niveles de estos compuestos.
6. La germinación aumentó la actividad antioxidante de la avena. Temperaturas de 18 a 20°C y tiempos de 200-216 h dieron lugar a los máximos valores de actividad antioxidante.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Estrada, B. A.; Gutiérrez-Urbe, J. A.; Serna-Saldívar, S. O. 2014. Bound phenolics in food, a review. *Food Chemistry*, **152**, 46-55.
- Adom, K. K.; Liu, R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 6182–6187.
- Almaghrabi, O. A. 2012. Control of wild oat (*Avena fatua*) using some phenolic compounds I – Germination and some growth parameters. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**, 17–24.
- Anderson, J. W. 2003. Whole grains protect against atherosclerotic cardiovascular disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, **62**, 135–142.
- Arena, M. P.; Caggianiello, G.; Fiocco, D.; Russo, P.; Torelli, M.; Spano, G.; Capozzi, V. 2014. Barley β -glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 3025-3039.
- Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escaleira, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, **76**, 965–977.
- Biel, W.; Bobko, K.; Maciorowski, R. 2009. Chemical composition and nutritive value of husked and naked oats grain. *Journal of Cereal Science*, **49**, 413–418.
- Boffetta, P.; Thies, F.; Kris-Etherton, P. 2014. Epidemiological studies of oats consumption and risk of cancer and overall mortality. *British Journal of Nutrition*, **112**, S14-S18.
- Bryngelsson, S.; Ishihara, A.; Dimberg, L. H. 2003. Levels of avenanthramides and activity of hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyl transferase (HHT) in steeped or germinated oat samples. *Cereal Chemistry*, **80**, 356–360.
- Cartea, M. E.; Francisco, M.; Soengas, P.; Velasco, P. 2011. Phenolic compounds in *Brassica* Vegetables. *Molecules*, **16**, 251-280.

- Centeno, C.; Viveros, A.; Brenes, A.; Canales, R.; Lozano, A.; De La Cuadra, C. 2001. Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in rye and barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3208-3215.
- Chen, Z.; Yu, L.; Wang, X.; Gu, Z.; 2016. Changes of phenolic profiles and antioxidant activity in canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) during germination. *Food Chemistry*, **194**, 608–618.
- Choromanska, A.; Kulbacka, J.; Rembialkowska, N.; Pilat, J.; Oledzki, R.; Harasym, J.; Saczko, J. 2015. Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan. An *in vitro* study. *International Journal of Biological Macromolecules*, **80**, 23–28.
- Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. 2006. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing Ltd.
- Diana, M.; Quílez, J.; Rafecas, M. 2014. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of Functional Foods*, **10**, 407-420.
- Dinkova-Kostova, A. T.; Cheah, J.; Samouilov, A.; Zweier, J. L.; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P. 2007. Phenolic Michael reaction acceptors: Combined direct and indirect antioxidant defenses against electrophiles and Oxidants. *Medicinal Chemistry*, **3**, 261-268.
- Dong, J-L.; Zhang, W-L.; Lin, J.; Shen, R-L.; Si, J-L.; Wang, Y. 2014. The gastrointestinal metabolic effects of oat product based- β -glucan in mice. *Food Science and Biotechnology*, **23**, 917-924.
- Drzikova, B.; Dongowski, G.; Gebhardt, E. 2005. Dietary fibre-rich oat-based products affect serum lipids, microbiota, formation of short-chain fatty acids and steroids in rats. *British Journal of Nutrition*, **94**, 1012-1025.
- Dvorakova, M.; Moreira, M. M.; Dostalek, P.; Skulilova, Z.; Guido, L. F.; Barros, A. A. 2008. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1189**, 398-405.

- Ellis, P. R.; Swanston, J. S.; Rubio, A.; Perez-Vendrell, A. M.; Romagosa, I.; Molina-Cano, J. L. 1997. The development of β -glucanase and degradation of β -glucan in barley grown in Scotland and Spain. *Journal of Cereal Science*, **26**, 75-82.
- Emmons, C. L.; Peterson, D. M. 1999. Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. *Cereal Chemistry*, **76**, 902–906.
- Emmons, C. L.; Peterson, D. M.; Paul, G. L. 1999. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4894–4898.
- EUROSTAT, 2014. Datos de la producción Anual. Disponible online: <http://ec.europa.eu/eurostat/data/database> (acceso el 15 de Mayo del 2016).
- FAO. *Avena sativa* L. Disponible online: <http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/GBASE/Data/pf000466.HTM> (acceso el 15 de Mayo del 2016).
- FAOSTAT, 2014. Datos de la producción mundial de la Avena. Disponible online: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S> (acceso el 15 de Mayo del 2016).
- Flander, L.; Salmenkallio-Marttila, M.; Suortti, T.; Autio, K. 2007. Optimization of ingredients and baking process for improved wholemeal oat bread quality. *LWT - Food Science and Technology*, **40**, 860–870.
- Forssell, P.; Cetin, M.; Wirtanen, G.; Mälkki, Y. 1990. Antioxidative effects of oat oil and its fractions. *Fat Science and Technology*, **8**, 319–321.
- Gangopadhyay, N.; Hossain, M. B.; Rai, D. K.; Brunton, N. P. 2015. A review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies. *Molecules*, **20**, 10884-10909.
- Gani, A.; Wani, S. M.; Masoodi, F. A.; Hameed, G. 2012. Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: A review. *Journal of Food Processing & Technology*, **3**, 146.
- Guo, W.; Wise, M. L.; Collins, F. W.; Meydani, M. 2008. Avenanthramides, polyphenols from oats, inhibit IL-1 β -induced NF- κ B activation in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **44**, 415–429.

- Hammond, E. G. 1983. Lipids in cereal technology. Oat lipids. En: Academic Press Inc. London. Barnes, P. J.(ed.), pp. 331–352.
- Hitayezu, R.; Baakdah, M. M.; Kinnin, J.; Henderson, K.; Tsopmo, A. 2015. Antioxidant activity, avenanthramide and phenolic acid contents of oat milling fractions. *Journal of Cereal Science*, **63**, 35–40.
- Hübner, F.; Arendt, E. K. 2013. Germination of cereal grains as a way to improve the nutritional value: A review. *Food Science and Nutrition*, **53**, 853-861.
- Hübner, F.; O’Neil, T.; D. Cashman, K.; K. Arendt. E. 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**, 27–35.
- Julkunen-Tiito, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**, 213-217.
- Juvonen, K. R.; Salmenkallio-Marttila, M.; Lyly, M.; Liukkonen, K-H.; Lähteenmäki, L.; Laaksonen, D. E.; Uusitupa, M. I.; Herzig, K. H.; Poutanen, K. S.; Karhunen, L. J. 2011. Semisolid meal enriched in oat bran decreases plasma glucose and insulin levels, but does not change gastrointestinal peptide responses or short-term appetite in healthy subjects. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **21**, 748-756.
- Kaukovirta-Norja, A.; Oksman-Caldentey, K. M.; Heiniö, R. L.; Lehtinen, P.; Pihlava, J. M.; Poutanen, P. 2001. Germination increased bioactivity and stability of whole grain oats. En: International symposium on whole grain and human health. Liukkonen, K. y col. (eds.), pp. 96.
- Kaukovirta-Norja, A.; Wilhelmson, A.; Poutanen, K. 2004. Germination: a means to improve the functionality of oat. A review. *Agricultural and Food Science*, **13**, 100–112.
- Klose, C.; Schehl, B.; Arendt, E. 2009. Fundamental study on protein changes taking place during malting of oats. *Journal of Cereal Science*, **49**, 83-91.

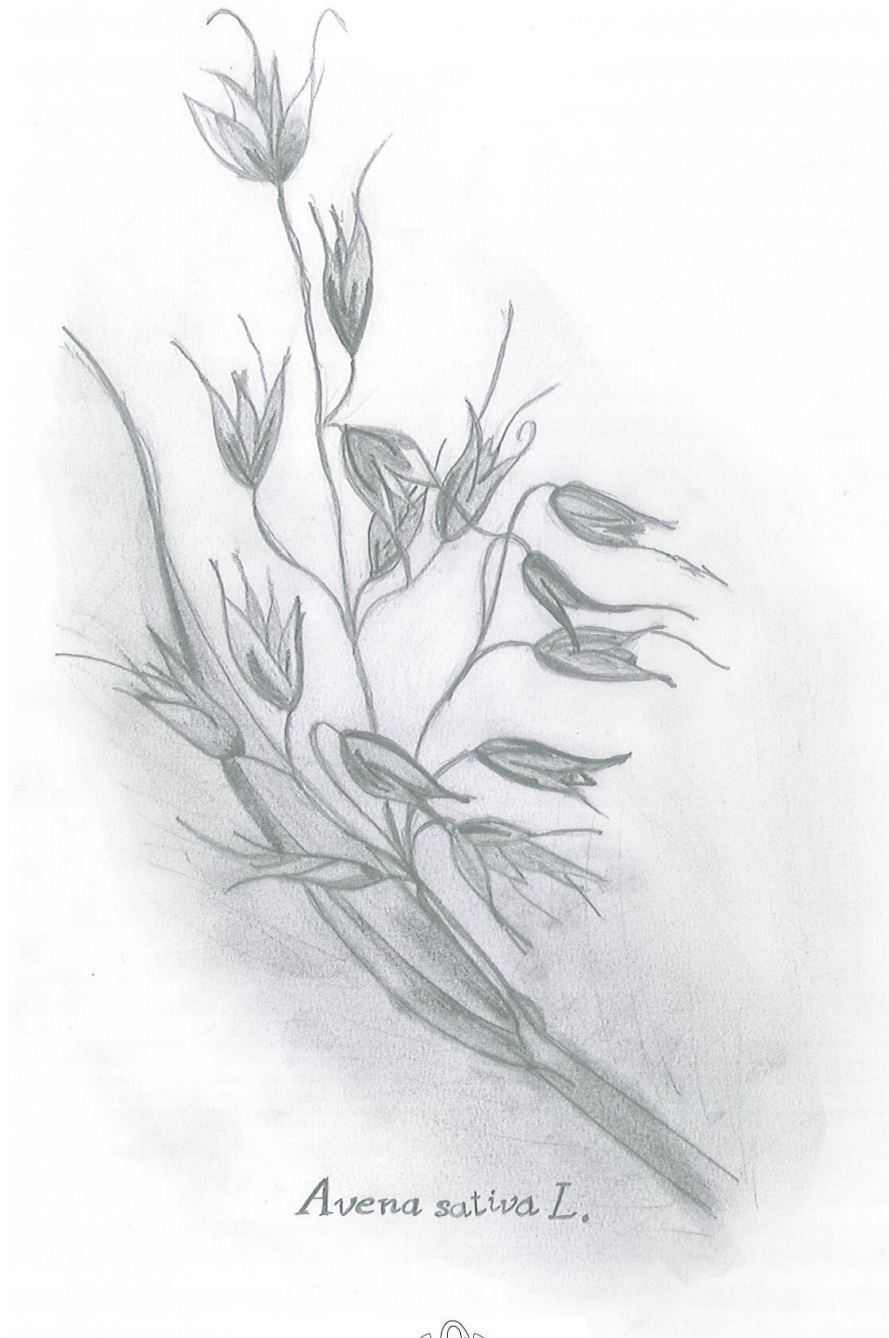
- Liu, L.; Zubik, L.; Collins, F. W.; Marko, M.; Meydani, M. 2004. The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis*, **175**, 39-49.
- Lu, J.; Zhao, H.; Chen, J.; Fan, W.; Dong, J.; Kong, W.; Sun, J.; Cao, Y.; Cai, G. 2007. Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. *Journal of agricultural and food chemistry*, **55**, 10994-11001.
- Mäkinen, O. E.; Zannini, E.; Arendt, E. K. 2013. Germination of oat and quinoa and evaluation of the malts as gluten free baking ingredients. *Plant foods for human nutrition*, **68**, 90-95.
- Martinez-Flores, H. E.; Chang, Y. K.; Bustos, F. M.; Sinencio, F. S. 1999. Extrusion-cooking of cassava starch with different fiber sources: effect of fibers on expansion and physicochemical properties. International seminar on advanced extrusion technology in food applications; 271-278.
- Matsukawa, T.; Isobe, T.; Ishihara, A.; Iwamura, H. 2000. Occurrence of avenanthramides and hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyltransferase activity in oat seeds. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **55**, 30-36.
- Momenizadeh, A.; Heidari, R.; Sadeghi, M.; Tabesh, F.; Ekramzadeh, M.; Haghghatian, Z.; Golshahi, J.; Baseri, M. 2014. Effects of oat and wheat bread consumption on lipid profile, blood sugar, and endothelial function in hypercholesterolemic patients: A randomized controlled clinical trial. *ARYA Atherosclerosis*, **10**, 259–265.
- Nelson, K.; Stojanovska, L.; Vasiljevic, T.; Mathai, M. 2013. Germinated grains: a superior whole grain functional food. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **91**, 429-441.
- Nie, L.; Wise, M. L.; Peterson, D. M.; Meydani, M. 2006. Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. *Atherosclerosis*, **186**, 260-266.
- Nonogaki, H.; Bassel, G. W. 2010. Germination-still a mystery. *Plant Science*, **179**, 574-581.

- Oh, C. H.; Oh, S. H. 2004. Effect of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *Journal of Medicinal Food*, **7**, 19–23.
- Oh, M. M.; Rajashekar, C. B. 2009. Antioxidant content of edible sprouts: effects of environmental shocks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 2221-2227.
- Oksman-Caldentey, K. M.; Kaukovirta-Norja, A.; Heiniö, R. L.; Kleemola, T.; Mikola, M.; Sontag-Strom, T.; Lehtinen, P.; Pihlava, J. M.; Poutanen, P. 2001. Kauran biotekninen prosessointi uusiksi elintarvikkeiksi. (Biotechnical processing of oat for novel food ingredients). En: Kaurasta elinvoimaa. EKT-sarja 1221. Helsingin yliopisto, Elintarviketeknologian laitos. Salovaara, H. & Sontag-Strom, T. (eds.), pp. 85–108.
- Ovando-Martinez, M.; Whitney, K.; Reuhs, B. L.; Doehlert, A. C.; Simsek, S. 2013. Effect of hydrothermal treatment on physicochemical and digestibility properties of oat starch. *Food Research International*, **52**, 17–25.
- Paucar-Menacho, L. M.; Berhow, M. A.; Gontijo Mandarino, J. M.; Chang, Y. K.; Gonzalez de Mejia, E. 2010. Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. *Food Research International*, **43**, 1856–1865.
- Peñas, E.; Gómez, R.; Frías, J.; Vidal-Valverde, C. 2008. Application of high-pressure treatment on alfalfa (*Medicago sativa*) and mung bean (*Vigna radiata*) seeds to enhance the microbiological safety of their sprouts. *Food Control*, **19**, 698–705.
- Peterson, D. M. 1998. Malting oats: effects on chemical composition of hull-less and hulled genotypes. *Cereal Chemistry*, **75**, 230–234.
- Peterson, D. M. 2001. Oat antioxidants. *Journal of Cereal Science*, **33**, 115–129.
- Peterson, D. M.; Jensen, C. M.; Hoffman, D. L.; Mannerstedt-Fogelfors, B. 2007. Oat tocots: Saponification vs. direct extraction and analysis in high-oil genotypes. *Cereal Chemistry*, **84**, 56–60.
- Peterson, D. M.; Wood, D. F. 1997. Composition and structure of high-oil oat. *Journal of Cereal Science*, **26**, 121-128.

- Peterson, G. L. 1979. Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*, **100**, 201-220.
- Pihlava, J. M.; Oksman-Caldentey, K. M. 2001. Effect of biotechnical processing on phenolic compounds and antioxidant activity in oats. In *Biologically Active Phytochemicals in Food: Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function*. En: The Royal Society of Chemistry. Pfannhauser, W.; Fenwick, G. R.; Khokhar, S. (eds.), pp. 515-518.
- Porter, Y. 2012. Antioxidant properties of green broccoli and purple-sprouting broccoli under different cooking conditions. *Bioscience Horizons*, **5**, 1-11.
- Rasane, P.; Jha, A.; Sabikhi, L.; Kumar, A.; Unnikrishnan, V.S. 2015. Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *Journal of Food Science and Technology*, **52**, 662–675.
- Rossander-Hulten, L.; Gleerup, A.; Hallberg, L. 1990. Inhibitory effect of oat products on non-haem iron absorption in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, **44**, 783–791.
- Rumiyati, Jayasena, V.; James, A. P. 2013. Total phenolic and phytosterol compounds and the radical scavenging activity of germinated Australian sweet lupin flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, **68**, 352–357.
- Sandström, B.; Cederblad, A.; Stenquist, B.; Andersson, H. 1990. Effect of inositol hexaphosphate on retention of zinc and calcium from the human colon. *European Journal of Clinical Nutrition*, **44**, 705-708.
- Skoglund, M.; Peterson, D. M.; Andersson, R.; Nilsson, J.; Dimberg, L. H. 2008. Avenanthramide content and related enzyme activities in oats as affected by steeping and germination. *Journal of Cereal Science*, **48**, 294-303.
- Slavin, J. 2003. Why whole grains are protective: Biological mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, **62**, 129–134.
- Thongoun, P.; Pavadhgul, P.; Bumrungpert, A.; Satitvipawee, P.; Harjani, Y.; Kurilich, A. 2013. Effect of oat consumption on lipid profiles in hypercholesterolemic adults. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **96**, S25-S32.

- Ti, H.; Zhang, R.; Zhang, M.; Li, Q.; Wei, Z.; Zhang, Y.; Tang, X.; Deng, Y.; Liu, L.; Ma, Y. 2014. Dynamic changes in the free and bound phenolic compounds and antioxidant activity of brown rice at different germination stages. *Food Chemistry*, **161**, 337-344.
- Tian, B.; Xie, B.; Shi, J.; Wu, J.; Cai, Y.; Xu, T.; Xue, S.; Deng, Q. 2010. Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chemistry*, **119**, 1195–1200.
- Venn, B.J.; Mann, J. I. 2004. Cereal grains, legumes and diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, **58**, 1443–1461.
- Wilhelmson, A.; Oksman-Caldentey, K. M.; Laitila, A.; Suortti, T.; Kaukovirta-Norja, A.; Poutanen, K.; 2001. Development of a germination process for producing high β -glucan, whole grain food ingredients from oat. *Cereal Chemistry*, **78**, 715–720.
- Wu, F.; Yang, N.; Touré, A.; Jin, Z.; Xu, X. 2012. Germinated brown rice and its role in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **53**, 451-463.
- Xu, J. G.; Hu, Q. P.; Duan, J. L.; Tian, C. R. 2010. Dynamic Changes in γ -aminobutyric acid and glutamate decarboxylase activity in oats (*Avena nuda* L.) during Steeping and Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 9759–9763.
- Xu, J. G.; Tian, C. R.; Hu, P. Q.; Luo, Y. J.; Wang, X. D.; Tian, X. D. 2009. Dynamic changes in phenolic compounds and antioxidant activity in oats (*Avena nuda* L.) during steeping and germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 10392-10398.
- Yang, J.; Ou, B.; Wise, M. L.; Chu Y. F. 2014. *In vitro* total antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of three common oat-derived avenanthramides. *Food Chemistry*, **160**, 338–345.
- Yoshimura, M.; Toyoshi, T.; Sano, A.; Izumi, T.; Fujii, T.; Konishi, C.; Inai, S.; Matsukura, C.; Fukuda, N.; Ezura, H.; Obata, A. 2010. Antihypertensive effect of a γ -aminobutyric acid rich tomato cultivar “DG03-9” in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 615–619.

- Zhao, Q.; Hu, X.; Guo, Q.; W.Cui, S.; Xian, Y.; You, S.; Chen, X.; Xu, C.; Gao, X. 2014. Physicochemical properties and regulatory effects on db/db diabetic mice of β -glucans extracted from oat, wheat and barley. *Food Hydrocolloids*, **37**, 60-68.
- Zhou, J. R.; Erdman, J.W. 1995. Phytic acid in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **35**, 495–508.
- Zwer, P. K. 2004. Oats. En: Encyclopedia of grain science. Elsevier Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA. Wrigley, C.; Corke, H.; Walker, C. E. (eds.), pp. 365–375.



Avena sativa L.



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ICTAN

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN