

Del 2 al 5 de mayo de 2023

CENTRO UNIVERSITARIO
SANTA ANA
ALMENDRALEJO



Joaquín Sorolla Bastida. Comiendo uvas, 1898. Acualera sobre papel. Museo Sorolla, n° inv. 00427

XLV JORNADAS
DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
TIERRA DE BARROS
V CONGRESO AGROALIMENTARIO
DE EXTREMADURA

XLV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
DE LA TIERRA DE BARROS
V CONGRESO AGROALIMENTARIO DE EXTREMADURA

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
[http//www.univsantana.com](http://www.univsantana.com)

Colabora: Cajalmendralejo

Ilustración de portada:

Joaquín Sorolla Bastida. "Comiendo uvas". 1898. Acuarela sobre papel.
Museo Sorolla. n: inv. 00427. © Fundación Museo Sorolla

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: María Sabater

ISBN: 84-7930-113-9

D.L.: BA-000169-2024

Imprime: Impresal

Optimización de la extracción de los compuestos fenólicos presentes en la cebada y determinación de su capacidad antioxidante

VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.

ÁLVAREZ-ROMERO, M.

GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A.V.

RUÍZ-RODRÍGUEZ, A.

BARBERO, G.F.

PALMA, M.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz.

RESUMEN

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es considerada uno de los cereales más cultivados a nivel mundial debido a sus importantes usos tanto en la alimentación humana como animal. Su grano es una gran fuente de compuestos fenólicos, particularmente interesantes para la salud por poseer propiedades antioxidantes, entre otras. Se ha empleado un diseño de Box-Behnken con una metodología de superficie de respuesta para la optimización de la extracción asistida por ultrasonidos de los compuestos fenólicos presentes en la cebada. Las condiciones óptimas fueron: 0,5 gramos de muestra en 20 mL de MeOH 71% en agua a 64 °C y 10 minutos

de tiempo de extracción. El análisis estadístico reveló que la relación masa de muestra: volumen de disolvente fue la variable más influyente. El método desarrollado mostró un alto nivel de precisión y se aplicó con éxito a varias muestras de cerveza comercial para el análisis de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante, con valores entre 1,08-1,37 y 1,42-3,04, respectivamente.

Palabras claves: Cebada, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, diseño de Box-Behnken, extracción asistida por ultrasonidos.

SUMMARY

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is considered one of the most cultivated cereals worldwide due to its important uses in both human and animal nutrition. Its grain is a great source of phenolic compounds, particularly interesting for health due to its antioxidant properties, among others. A Box-Behnken design with a response surface methodology was used to optimize the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds present in barley. The optimal conditions were: 0.5 grams of sample in 20 mL of 71% MeOH in water at 64 °C and 10 minutes of extraction time. Statistical analysis revealed that the sample mass:solvent volume ratio was the most influential variable. The developed method showed a high level of precision and was successfully applied to several commercial beer samples for the analysis of total phenolic compounds and antioxidant capacity, with values between 1.08-1.37 and 1.42-3.04. respectively.

Keywords: Barley, phenolic compounds, antioxidant capacity, Box-Behnken design, ultrasound-assisted extraction.

1. INTRODUCCIÓN

La cebada es un cereal muy consumido y se encuentra entre los cereales más antiguos. Es cultivada y usada para el suministro de alimentos tanto animal, como por ejemplo en la producción de piensos debido a su gran contenido en proteínas [1] como en la alimentación humana, para el malteo en la fabricación de cerveza y otros productos como el jarabe de malta, leche malteada, etc [2]. Recientemente, está ganando un renovado interés como ingrediente para la producción de alimentos funcionales debido a su concentración de compuestos bioactivos [3]. Su grano es una

gran fuente de vitaminas, aminoácidos y compuestos fenólicos [4]. Éstos últimos han atraído la atención de los científicos debido a sus fuertes actividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* y su capacidad para eliminar radicales libres que se producen en las reacciones de oxidación [5,6]. Los abundantes contenidos de compuestos fenólicos en la cebada revelan que puede servir como una excelente fuente dietética de antioxidantes naturales para la prevención de enfermedades y la promoción de la salud, presentando propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas y anticancerígenas, entre otras [7-9].

La determinación de compuestos fenólicos en una muestra sólida comienza por la etapa de extracción de los mismos. No existe un método único y estándar y varios parámetros, como el disolvente, la temperatura o el tiempo, pueden afectar significativamente la eficiencia de extracción. Por lo tanto, es necesario optimizar las diferentes variables para lograr una eficiente recuperación y maximizar el rendimiento [10]. Desde el punto analítico, las técnicas más usadas son aquellas que ahorran tiempo con un menor uso de disolventes, siendo a su vez más ecológicas [11]. Bonoli *et al.* (2004) compararon la capacidad de extracción de varias mezclas de disolventes y también investigaron el uso de la extracción líquida presurizada (PLE) [12]. Yu *et al.* (2001) fueron los primeros en realizar la hidrólisis enzimática para la extracción de polifenoles de la cebada [13]. En este caso se hará uso de la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), presentando ventajas como una mayor sencillez, eficiencia y rendimiento, además de un menor consumo de disolventes y energía frente a las técnicas convencionales. Es una técnica de extracción verde, rápida y ecológica avanzada para la producción de extractos de alta calidad a partir de productos naturales. [14].

La UAE consiste en la aplicación de ondas con una frecuencia entre 20.000 - 100.000 Hz, produciendo un fenómeno llamado "cavitación". Se ha demostrado que, cuanto menor es la frecuencia, mayor es la burbuja de la cavitación. De esta manera, las burbujas colapsan con el disolvente y rompen las paredes de la matriz de la muestra facilitando la liberación de los analitos [15]. En trabajos previos, se han realizado estudios sobre compuestos fenólicos en cebada, usando UAE, aunque no se ha llevado a cabo un desarrollo y optimización de los métodos de extracción para obtener las condiciones óptimas [16].

Para la optimización de los parámetros implicados en la extracción de los compuestos fenólicos de la cebada se llevó a cabo un diseño de Box-

Behnken (BBD), un tipo de diseño factorial de superficie de respuesta [17]. La metodología de superficie de respuesta (RSM) es una herramienta ampliamente utilizada para analizar las respuestas que se ven afectadas por múltiples variables y sus interacciones [18]. Una de sus principales ventajas es la capacidad para tener en cuenta las interacciones entre diferentes variables, en comparación con los análisis tradicionales de una sola variable. Un diseño experimental apropiado puede reducir el número de experimentos a realizar y se puede ajustar un modelo matemático a los datos adquiridos a partir de un número seleccionado de combinaciones de variables [19].

Los objetivos de este estudio fueron optimizar los parámetros de extracción de los compuestos fenólicos totales presentes en la cebada mediante UAE y posteriormente, evaluar su poder antioxidante mediante el método de DPPH. Además, se evaluó la idoneidad y aplicabilidad del método mediante el análisis de la concentración de compuestos fenólicos en distintos tipos de cerveza comercial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de los métodos de extracción se llevó a cabo con una mezcla de 100 g de tres tipos de cebada empleadas en la elaboración de cerveza: IPA, Weissbier y Pale Ale. Estas cebadas se obtuvieron de la marca "Cervezanía" (Seville, Spain). Las cebadas se mezclaron y se molieron en un molino ZM200 (Retsch-Allee 1-5, Haan, Germany) con un tamiz de 0,25 μm , y la mezcla molida se guardó a temperatura ambiente hasta su análisis.

La UAE se llevó a cabo con una sonda Sonopuls Ultrasonic Homogeniser HD4100 (Bandelin, Berlin, Germany) que permite el control y modificación del ciclo (fijado en $0,9 \text{ s}^{-1}$) y la amplitud (fijada en un 20% de la máxima (70 W)). Esta sonda está acoplada a un baño termostático (FRIGITERM-10, JP Selecta, Abrera, Spain) donde se fija la temperatura. Para la extracción se pesó una cantidad determinada de muestra molida (según diseño) y se le añadieron 20 mL del disolvente adecuado para la realización de la extracción durante 10 min. Una vez terminada, el extracto obtenido se centrifugó a 1702G durante 5 minutos. El sobrenadante se llevó a un volumen de 25 mL con agua MilliQ. Para el posterior análisis, el extracto fue filtrado con filtro de jeringa de nylon de 0,22 μm (Nylon Syringe Filter, FILTER-LAB,

Barcelona, Spain). Las variables independientes analizadas mediante el BBD, junto con sus niveles evaluados se fijaron en base a trabajos previos [20,21] y se muestran en la Tabla 1.

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó con un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) y empleando el método de Folin-Ciocalteu [22]. Para ello, se introdujeron en un matraz aforado de 25 mL: 0,25 mL de muestra, 12,5 mL de agua destilada, 1,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 5 mL de solución de Na_2CO_3 (20%), enrasándolo finalmente con agua destilada. La reacción entre los compuestos fenólicos de la muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu forma un complejo de color azul, que absorbe a un máximo de 765 nm y cuya intensidad de color depende de la proporción de estos compuestos. Debido a la cinética de extracción y la estabilidad del complejo formado, las muestras se mantuvieron durante 30 min antes de medir la absorbancia, tiempo necesario para la formación del complejo. Previamente se realizó una recta de calibrado, usando el mismo procedimiento y ácido gálico como patrón, preparando patrones de concentración conocida entre 1 y 1000 mg L^{-1} . La recta de calibrado fue $y = 0,0529x + 0,0202$; $R^2 = 0,9991$; LOD 0,499 mg L^{-1} y LOQ 1,647 mg L^{-1} . Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente por gramo de cebada (mg GAE g^{-1} de cebada).

La actividad antioxidante de los extractos de cebada se determinó empleando el método del DPPH con algunas modificaciones [23]. Se usaron 2 mL de una disolución de DPPH (6×10^{-5} mol L^{-1}) y 100 μL de muestra. Se dejó reposar durante 40 min a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Finalmente, la absorbancia se determinó a una longitud de onda de 515 nm. Se construyó una recta de calibrado usando trolox como patrón a concentraciones entre 0,5 y 100 mg L^{-1} . La recta de calibrado fue $y = 0,8596x + 0,3090$; $R^2 = 0,9994$; LOD 2,096 mg L^{-1} y LOQ 6,916 mg L^{-1} . Los valores encontrados en las muestras de extractos se expresaron como mg equivalentes de trolox por gramo de cebada (mg TE g^{-1} de cebada).

Los datos de los análisis llevados a cabo por triplicado se expresaron como media \pm desviación estándar. En primer lugar, estos datos se sometieron a una prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad y homogeneidad de las varianzas de los datos; y, posteriormente, a un Análisis de Varianza (ANOVA), junto con la prueba de Tukey, para determinar si los diferentes contenidos de polifenoles presentaban valores estadísticamente significativos a un nivel de significancia del 95%. En consecuencia, los

resultados con un p -valor < 0.05 se consideraron estadísticamente diferentes. El software empleado para el desarrollo de los diseños de experimentos ha sido Statgraphic Centurion Versión XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., Los Llanos, VA, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diseño experimental

El diseño de Box-Behnken fue aplicado debido a su gran eficacia y número limitado de experimentos [24]. Se evaluó el efecto de tres variables (% MeOH, temperatura y g muestra: volumen disolvente (ratio)) sobre la recuperación de compuestos fenólicos totales. Se trabajó con 3 factores y 3 repeticiones del punto central, por lo que se llevó a cabo un diseño de 15 experimentos.

Los resultados del diseño experimental muestran que los rendimientos de la extracción estuvieron entre 0,6950 y 1,0189 mg de compuestos fenólicos totales por g de cebada, datos recogidos en la Tabla 2. Además, la columna de error relativo presentó el valor de diferencia porcentual relativa para cada una de las condiciones de extracción entre el valor experimental y el calculado según el modelo desarrollado. Puede comprobarse como resultó ser inferior al 6% en todos los casos.

Tras realizar la matriz de experimentos indicada en el diseño BBD, los resultados estadísticos obtenidos de los compuestos fenólicos para cada uno de los factores optimizados se observan en la Tabla 3. El análisis de la varianza (ANOVA) indicó que el modelo explica el 89,86% de la variabilidad total, lo que muestra un fuerte ajuste entre los valores extraídos y los predichos por el modelo. La desviación estándar de los residuos fue de 0,0549 y el error medio absoluto de 0,0266. En este caso, el p -valor para la falta de ajuste (lack of fit) no resultó inferior a 0,05, por lo que el modelo seleccionado resulta adecuado para describir los datos observados. Las variables e interacciones con un p -valor inferior a 0,05 se consideran significativamente influyentes en la respuesta con un nivel de confianza del 95%. Concretamente fueron la ratio, la temperatura y el efecto cuadrático del disolvente empleado.

También se obtuvo la ecuación polinómica de segundo grado que permite modelar el comportamiento de las variables de extracción y su efecto en

la recuperación de los compuestos fenólicos. Esta ecuación polinómica para calcular el total de compuestos fenólicos mediante UAE contiene los coeficientes de las variables y sus interacciones.

$$\begin{aligned} \text{Compuestos fenólicos totales} = & 0,9880 + 0,0307*X_1 - 0,0615*X_2 + 0,0539*X_3 - \\ & 0,1150*X_1^2 - 0,0349*X_1*X_2 + 0,0018*X_1*X_3 - 0,0534*X_2^2 - \\ & 0,0208*X_2*X_3 - 0,0629*X_3^2 \end{aligned}$$

Donde X_1 es el porcentaje de metanol en agua en el disolvente de extracción, X_2 es número de gramos utilizados en cada extracción por cada 20 mL de disolvente y X_3 es la temperatura de trabajo en °C.

Los resultados se representaron gráficamente mediante un diagrama de Pareto (Figura 1). En él puede observarse la significancia de cada una de las variables y sus posibles interacciones en orden decreciente. La longitud de cada barra es proporcional al valor absoluto de su efecto estandarizado asociado. Todas aquellas variables que superen el valor de 2,57 presentan un efecto significativo sobre el nivel de compuestos fenólicos en los extractos con un nivel de confianza del 95%. Se puede ver la misma información mencionada anteriormente en el ANOVA.

En la Figura 1 se observa que el factor cuadrático del disolvente, así como la ratio y la temperatura presentan efectos significativos sobre la respuesta. Los signos positivos indican una relación directa entre el efecto o interacción y la variable respuesta, mientras que los signos negativos se refieren a una relación inversa. Por un lado, se puede ver que el factor cuadrático del disolvente y la ratio tienen un efecto negativo, es decir, cuanto menor sean sus valores, más compuestos fenólicos se extraen. Por otro lado, la temperatura tiene un efecto positivo, es decir, cuanto mayor sea la temperatura usada durante la extracción mayor será la cantidad de compuestos fenólicos. Estos factores con efectos significativos también se han encontrado en otras investigaciones, como en la obtención de compuestos antioxidantes de black chokeberry [25], donde se encontró que el producto cuadrático del disolvente influía de manera significativa, siendo mayor la cantidad de compuestos antioxidantes extraídos, cuanto menor era el producto cuadrático. La temperatura también era una variable con significancia y cuanto mayor era esta, mayor era la cantidad de compuestos antioxidantes extraídos en la muestra, de la misma manera que sucede con la extracción de compuestos fenólicos en la cebada. Además, el método para

extraer compuestos fenólicos en la cebada presenta una alta correlación con el poder antioxidante y permite una determinación más rápida y fiable que la determinación del poder antioxidante [26]. Una vez obtenido el modelo, se ha empleado para la obtención de las condiciones óptimas de extracción a través del análisis de la superficie de respuesta (Figura 2).

El modelo desarrollado permitió establecer los valores óptimos para maximizar la extracción de los compuestos fenólicos presentes en la cebada. En este caso, se establecieron los siguientes valores: 71 % MeOH en agua, 64 °C y 0,5 g de muestra en 20 mL de disolvente.

Aunque el valor de la ratio fue el mínimo establecido para el diseño de experimentos y produce efectos significativos sobre la respuesta de manera inversa, tal como se ha descrito previamente, no se empleó valores más bajos. Esto es debido a que, si disminuimos más el valor, el extracto presentaría una dilución elevada y se podrían producir problemas a la hora de la cuantificación posterior [27]. Por otra parte, se observó que, a mayor temperatura, mayor cantidad de compuestos fenólicos se extraían. Esto es debido a que las temperaturas altas favorecen la rotura de los enlaces de Van der Waals, de puentes de hidrógeno y los enlaces dipolo-dipolo. Además, la tensión superficial y viscosidad del disolvente mejoran la penetración del disolvente en la matriz, liberando más rápidamente los analitos [28,29]. No se ensayaron temperaturas superiores puesto que producirían la evaporación del disolvente y afectarían a la variable ratio, además de la posible degradación de los compuestos de interés.

3.2. Optimización del tiempo de extracción

Se realizó el estudio del tiempo de extracción para determinar el tiempo mínimo necesario para obtener la máxima concentración de compuestos fenólicos totales en la cebada. Se estudiaron por triplicado tiempos entre 5 - 30 minutos (Figura 3). Se observaron diferencias significativas entre 5 y 10 min, pero a partir de este momento no hubo diferencias significativas a tiempos superiores, por lo que se estableció 10 minutos como tiempo óptimo de extracción, ya que supone un gran ahorro en cuestiones de tiempo de análisis. Tiempos cortos de extracción han sido previamente reportados como los más adecuados empleando esta misma técnica, lo que se explica en

base a la alta energía aportada por los ultrasonidos que, por un lado, facilitan la extracción, pero por otro pueden incidir en los procesos de degradación de los compuestos fenólicos a largos tiempos de análisis [30].

3.3. Repetibilidad, precisión intermedia y recuperación

Una vez obtenidas las condiciones óptimas del método de extracción, se determinó la repetibilidad y la precisión intermedia del método optimizado. Para la repetibilidad se realizaron 8 extracciones en un mismo día ($n = 8$) y para la precisión intermedia se llevaron a cabo 8 extracciones por día durante tres días consecutivos ($n = 8 + 8 + 8$). Los coeficientes de variación obtenidos fueron de 3,48% y 6,78%, respectivamente, siendo ambos inferiores al 10%, que se consideró aceptable para afirmar que un método de extracción con una determinación final por espectroscopía es preciso [31].

Para finalizar, se realizó un estudio de recuperación durante el proceso de extracción. Para ello, se realizaron extracciones por triplicado en las condiciones óptimas de extracción, añadiendo 1 mL de una disolución de ácido gálico de 100 mg L^{-1} a la muestra a extraer. Tras las extracciones, se ha obtenido un nivel de recuperación del 103,48% de media.

3.4. Aplicación a muestras reales

Una vez desarrollado y optimizado el método de extracción asistido por ultrasonidos para los compuestos fenólicos totales presentes en la cebada, se aplicó a diferentes variedades de cerveza. Cada una de ellas se analizó por triplicado, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 4.

A la vista de la Tabla 4, se obtuvo que la variedad de cerveza Pale Ale presentó mayor cantidad de compuestos bioactivos en comparación con las otras dos variedades, seguida de la IPA.

3.4. Actividad antioxidante

Una vez desarrollado y optimizado el método de extracción asistido por ultrasonidos, se llevó a cabo el estudio de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, mediante el método del DPPH (Tabla 4). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

En este caso, se observó que la cerveza que presentó una mayor capacidad antioxidante fue la IPA en comparación con las otras dos variedades. De forma general suele haber una correlación entre el nivel de compuestos fenólicos y el nivel de capacidad antioxidante, si bien es cierto que no siempre ocurre así y además no es directamente proporcional, lo que sugiere que hay otros compuestos que presentan poder antioxidante además de los compuestos fenólicos. Se ha comprobado en la bibliografía existente que en la cebada existen otros compuestos con alta capacidad antioxidante además de los compuestos fenólicos como es el triptófano [32]. Este puede ser el motivo por el que los valores de la capacidad antioxidante no presentan una correlación total con los niveles de compuestos fenólicos totales [33].

4. CONCLUSIONES

La extracción asistida por ultrasonidos demostró ser una técnica bastante efectiva y rápida para la extracción de una amplia gama de compuestos fenólicos presentes en la cebada. BBD se utilizó con éxito para establecer los parámetros óptimos de extracción. La variable más influyente fue la relación entre la masa de muestra y el volumen de disolvente, aumentando la cantidad de compuestos bioactivos extraídos cuanto menor sea su valor. Se trata de un método bastante rápido, ya que en un tiempo de tan solo 10 minutos se pudieron extraer la mayoría de los compuestos beneficiosos para la salud. Además, el método desarrollado presentó una alta precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia y se aplicó con éxito a varias muestras de cerveza comercial que contenían distintas concentraciones de cebada. Se ha comprobado como de forma general hay una correlación entre el nivel de compuestos fenólicos y el nivel de capacidad antioxidante, si bien no es directamente proporcional, lo que sugiere que hay otros compuestos que presentan poder antioxidante en la cebada. En base a estos resultados se puede concluir que UAE en condiciones óptimas puede considerarse como una herramienta fácil, rápida y económica para la extracción de compuestos fenólicos totales en la cebada, y que este enfoque es una alternativa excelente y asequible para la industria.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Tari, L.M.; Perera, W.N.U.; Zaefarian, F.; Abdollahi, M.R.; Cowieson, A.J.; Ravundran, V., "Influence of barley inclusion method and protease supplementation on growth performance, nutrient utilisation, and gastrointestinal tract development in broiler starters", *Animal Nutrition*, 8, 2022, 61-70.
- [2] Sharma, P.; Goudar, G.; Longvah, T.; Gour, V.S.; Kothari, S.L.; WANI, I.A., "Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley during processing", *Food Reviews International*, 38, 2022, 163-198.
- [3] Omneya, E.; Wafaa, M.E.; Shahira, E.; Abeer, E.S.; Essam, A., "Comprehensive overview: The effect of using different solvents for barley extraction with its anti-inflammatory and antioxidant activity", *Chemistry & Biodiversity*, 20, 2023, 202200935.
- [4] Arigò, A.; Petr, Č.; Petra, Š.; Luisa, M.; Lenka, Č., "Development of extraction method for characterization of free and bonded polyphenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Czech Republic using liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Food Chemistry*, 245, 2018, 829-837.
- [5] Aguiar, J.; Gonçalves, J.L.; Alves, V.L.; Câmara, J.S., "Chemical fingerprint of free polyphenols and antioxidant activity in dietary fruits and vegetables using a non-targeted approach based on QuEChERS Ultrasound-Assisted Extraction combined with UHPLC-PDA", *Antioxidants*, 9, 2020, 305.
- [6] Céspedes, C.L.; Valdez-morales, M.; Avila, J.G.; El-hafidi, M.; Alarcón, J.; Paredes.lópez, O., "Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild blackberry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (*Elaeocarpaceae*)", *Food Chemistry*, 119, 2010, 886-895.
- [7] An-na, L.; Sha, L.; Yu-jie, Z.; Xiang-rong, X.; Yu-ming, C.; Hua-bin, L., "Resources and biological activities of natural polyphenols", *Nutrients*, 6, 2014, 6020-6047.
- [8] Singh, A.; Holvoet, S.; Mercenier, A., "Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases", *Clinical & Experimental Allergy*, 41, 2011, 1346-1359.
- [9] Chung, S.Y.; Joshua, D.L.; Shengmin, S., "Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols", *Archives of Toxicology*, 83, 2009, 11-21.

- [10] Kazemi, M.; Khodaiyan, F.; Labbafi, M.; Hosseini, S.S.; Hoiijati, M., "Pistachio green hull pectin: Optimization of microwave-assisted extraction and evaluation of its physicochemical, structural and functional properties", *Food Chemistry*, 271, 2019, 663-672.
- [11] Talmaciu, A.I.; Volf, I.; Popa, V.I., "A comparative analysis of the "Green" techniques applied for polyphenols extraction from bioresources", *Chemistry Biodiversity*, 12, 2015, 1635-1651.
- [12] Bonoli, M.; marconi, E.; Caboni, M.F., "Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours: Evaluation of the extraction capability of different solvents mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry", *Journal of Chromatography A*, 1057, 2004, 1-12.
- [13] YU, J.; Vasanthan, T.; Temelli, F., "Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2001, 4352-4358.
- [14] Castejón, N.; Luna, P.; Señoráns, F.J., "Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents", *Food Chemistry*, 244, 2018, 75-82.
- [15] Esclapez, M.D.; García-pérez, J.V.; Mulet, A.; Cárcek, J.A., "Ultrasound-assisted extraction of natural products", *Food Engineering Reviews*, 3, 2011, 108-120.
- [16] El Mansouri, F.; Palma, M.; El Farissi, H.; Oufdou, H.; Brigui, J., "Extraction, analysis of polyphenols and antioxidant properties of morrocan barley seed extracts (*Hordeum vulgare* L.)", *Materials Today Proceedings*, 43, 2020, 1896-1902.
- [17] Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandao, G.C.; Da Silva, E.G.P.; Portugal, L.A.; Dos Reis, P.S.; Souza, A.S.; Dos Santos, W.N.L., "Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods", *Analytica Chimica Acta*, 597, 2007, 179-186.
- [18] Wettasinghe, M.; Shahidi, F., "Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds", *Food Chemistry*, 67, 1999, 399-414.

- [19] Mead, R., "The design of experiments: Statistical principles for practical applications; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1988.
- [20] Yerena-prieto, B.J.; Gonzalez-gonzalez, M.; Vázquez-espínosa, M.; González-de-Peredo, A.V.; García-Alvarado M.Á.; Palma, M.; Rodríguez-Jimenes, G.D.C.; Barbero, G.F., "Optimization of an ultradound-assisted extraction method applied to the extraction of flavonoids from moringa leaves (*Moringa oleifera* Lam.)", *Agronomy*, 12, 2022, 261.
- [21] Carrera, C.; Aliaño-González, M.J.; Rodríguez-López, J.; Ferreiro-Gonzalez, M.; Ojeda-Copete, F.; Barbero, G.; Palma, M., "Optimization of an ultrasound-assisted extraction method for the analysis of major anthocyanin content in *Erica australis* flowers", *Molecules*, 26, 2021, 2884.
- [22] Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M., "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent", *Methods in Enzymology*, 299, 1999, 152-178.
- [23] Haifeng, Z.; Wei, F.; Jianjun, D.; Jian, L.; Jian, C.; Lianju, S.; Yan, L.; Weibao, K., "Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties", *Food Chemistry*, 107, 2008, 296-304.
- [24] González-de-Peredo, A.V.; Vázquez-Espínosa, M.; Espada-Bellido, E.; Ferreiro-González, M.; Carrera, G.F.; Palma, M., "Development of optimized ultrasound-assisted extraction methods for the recovery of total phenolic compounds and anthocyanins from onion bulbs", *Antioxidants*, 10, 2021, 1755.
- [25] Vázquez-Espínosa, M.; González-de-Peredo, A.V.; Espada-Bellido, E.; Ferreiro-González, M.; Toledo-Domínguez, J.J.; Carrera, C.; Palma, M.; Barbero, G.F., "Ultrasound-assisted extraction of two types of antioxidant compounds (TPC and TA) from black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.): Optimization of the individual and simultaneous extraction methods", *Agronomy*, 9, 2019, 456.
- [26] Teixeira Oliveira, J.; Machado da Costa, F.; Gonçalvez Da Silva, T.; Dotto Simoes, G.; Dos Santos Pereira, E.; Quevedo da Costa, P.; Andrezza, R.; Cavalheiro Schenkel, P.; Pieniz, S., "Green tea and kmbucha characterization: Phenolic composition, antioxidant capacity and enzymatic inhibition potential", *Food Chemistry*, 408, 2023, 3-9.

- [27] Vázquez-Espinosa, M.; González-de-Peredo, A.V.; Ferreiro-González, M.; Carrera, C.; Palma, M.; Barbero, G.F.; Espada-Bellido, E., "Assessment of ultrasound assisted extraction as an alternative method for the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from maqui berries (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz)", *Agronomy*, 9, 2019, 148.
- [28] Mustafa, A.; Turner, C., "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review", *Analytica Chimica Acta*, 703, 2011, 8-18.
- [29] Wijngaard, H.; Hossain, M.B.; Rai, D.K.; Brunton, N., "Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin", *Food Research International*, 46, 2012, 505-513.
- [30] Zhao, S.; Kwok, K.C.; Liang, H., "Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*", *Separation and Purification Technology*, 55, 2007, 307-312.
- [31] Lynch, J.M., "Use of AOAC international method performance statistic in the laboratory", *Journal of AOAC International*, 81, 1998, 679-682.
- [32] Ishikawa, E.; Kanai, S.; Sue, M., "Detection of a novel intramolecular rearrangement during gramine biosynthesis in barley using stable isotope-labeled tryptophan", *Biochemistry, Biophysics Reports*, 34, 2023, 101439.
- [33] Nam, M.; Yu, J.M.; Park, Y.R.; Kim, Y.S.; Kim, J.H.; Kim, M.S. "Metabolic profiling of chestnut shell (*Castanea crenata*) cultivars using UPLC-QTOF-MS and their antioxidant capacity", *Biomolecules*, 12, 2022, 1797.

Tabla 1. Rango de las variables de estudio para las experiencias del diseño.

FACTOR	VALORES		
	-1	0	+1
MeOH (%)	20	50	80
Ratio (g mL ⁻¹)	0,50:20	0,75:20	1,00:20
Temperatura (°C)	40	55	70

Tabla 2. Diseño de experimentos con sus respuestas observadas y predichas y errores relativos.

Experiencia	Factores			Respuestas		Error relativo (%)
	X1	X2	X3	Y _{TPC} (mg g ⁻¹)		
				Experimental	Predicho	
1	0	--1	-1	0,9011	0,8585	4,96
2	-1	-1	0	0,8054	0,8155	1,25
3	-1	1	0	0,8059	0,7623	5,73
4	-1	0	-1	0,6950	0,7274	4,46
5	0	0	0	0,9300	0,9880	5,87
6	1	1	0	0,7640	0,7538	1,35
7	0	-1	1	1,0192	1,0079	1,11
8	1	-1	0	0,9031	0,9467	4,61
9	0	1	-1	0,7659	0,7771	1,44
10	1	0	1	0,9290	0,8965	3,62
11	1	0	-1	0,7862	0,7851	0,14
12	0	1	1	0,8006	0,8432	5,05
13	-1	0	1	0,8304	0,8315	0,13
14	0	0	0	1,0189	0,9880	3,13
15	0	0	0	1,0151	0,9880	2,74

Tabla 3. Análisis de la varianza (ANOVA) para compuestos fenólicos totales en los extractos.

Efecto	Coefficiente de regresión estimado	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	p-valor
Modelo	0,9879				
MeOH	0,0306	0,0075	0,0075	2,5000	0,1745
Ratio	-0,0615	0,0303	0,0303	10,0600	0,0248

Temperatura	0,0538	0,0232	0,0232	7,7000	0,0391
MeOH x MeOH	-0,1149	0,0488	0,0488	16,2000	0,0101
MeOH x Ratio	-0,0349	0,0049	0,0049	1,6200	0,2593
MeOH x Temperatura	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,9492
Ratio x Ratio	-0,0534	0,0105	0,0105	3,5000	0,1204
Ratio x Temperatura	-0,0208	0,0017	0,0017	0,5800	0,4820
Temperatura x Temperatura	-0,0628	0,0146	0,0146	4,8400	0,0790
Lack-of-fit		0,0100	0,0033	1,3200	0,4581

Tabla 4. Comparación de la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en diferentes tipos de cerveza ($n = 3$).

	Weissbier*	IPA*	Pale Ale*
Compuestos fenólicos totales (mg g^{-1})	1.08 ± 0.004	1.21 ± 0.004	1.37 ± 0.004
Capacidad antioxidante (mg g^{-1})	1.42 ± 0.14	3.04 ± 0.16	2.73 ± 0.17

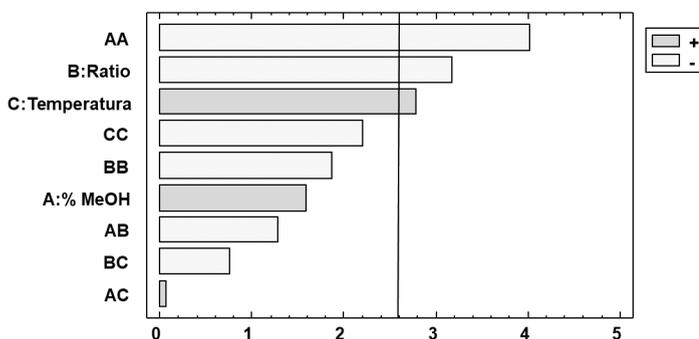


Figura 1. Diagrama de Pareto para compuestos fenólicos totales en cebada.

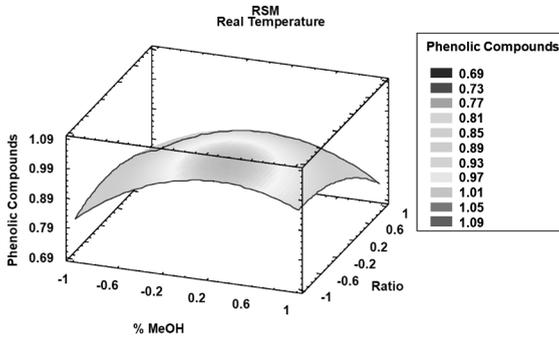


Figura 2. Superficie de respuesta estimada para compuestos fenólicos totales en cebada utilizando el diseño experimental de Box-Behnken para representar la relación peso/volumen (mg mL^{-1}) en comparación con el disolvente (% MeOH en agua).

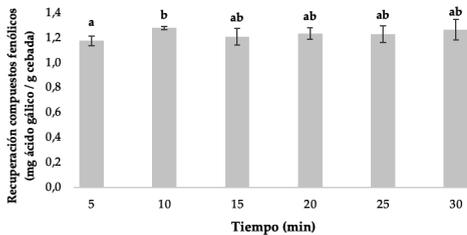


Figura 3: Concentración de compuestos fenólicos totales encontrados en los extractos empleando las condiciones optimizadas y diferentes tiempos de extracción ($n = 3$). (Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre los resultados de extracción a un nivel de confianza del 95%).