

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE DOS GENOTIPOS DE LA SALVIA  
HISPANICA L. SOMETIDA A DISTINTOS NIVELES DE  
ESTRÉS HÍDRICO”.***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Química área de Especialización en Química  
Medicinal por:**

**CAMILO ALEJANDRO MALIQUEO MURGA**

**Directores de Tesis: Dra. María Carolina Zúñiga López.**

**Santiago-Chile**

**Agosto 2020**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

## CAMILO ALEJANDRO MALIQUEO MURGA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Medicinal, en el examen público rendido el día

---

**Directores de Tesis:**

**Dra. María Carolina Zúñiga López** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Tatiana Garrido Reyes (Presidente)** \_\_\_\_\_

**Dra. Carla Delporte Vergara** \_\_\_\_\_

**Dra. Verónica Arancibia Moya** \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi directora profesora María Carolina, por todas las enseñanzas que me ha dado a lo largo de estos varios años en los que he sido su estudiante y su apoyo en las actividades de divulgación científica a la secretaría de extensión. Al profesor Claudio por sus consejos y palabras desde que estuve en el laboratorio.

A la comisión por su comprensión, paciencia y correcciones para la entrega de este escrito y su presencia en mi formación como estudiante. A la profesora Inés por todas sus gestiones y preocupaciones.

A mi familia por todo el apoyo y sacrificios realizados para llegar a este momento: todas las cosas que consiguieron para motivarme a estudiar: libros, telescopio, computador. En especial a mis abuelos y mi madre. A mis hermanos por compartir años de juegos, discusiones, compartir y conocer amigos. A Nico que ya es parte de mi familia, por todo el respaldo, salidas en bicicleta, viajes, la paciencia, cariño y años de amistad.

A Manuel (por todo), Nía (por ser la mejor psicóloga no profesional del mundo), Gaby (por sus locuras) y Chang por estar siempre que los necesité, en especial en los momentos más difíciles de la carrera. A Catalina por acompañarme nuevamente este año en todo lo que ha pasado. A la secretaría de extensión por ser, muchas veces, los que hicieron que los momentos más grises de la Facultad fuesen los más brillantes.

A José Herrera, por su alegría, amistad y enseñanzas.

A Magda y Vicky en particular por su amistad desde el 2013, a Danica, Fernando, Lesly, Jessa por compartir todos los momentos dentro y fuera de la secretaría. Y por supuesto, a todos los que en algún momento me ayudaron con las plantas de chía.

## ABREVIATURAS

**AAPH:** 2,2'-Azo-bis(2-metilpropionamida) dihidrocloruro.

**DMPO:** 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido.

**DPPH:** Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo.

**ET:** Mecanismo antioxidante de transferencia electrónica.

**EPR:** Resonancia de espín electrónico.

**EPR-DMPO:** Resonancia de espín electrónico, utilizando atrapador de espín DMPO

**HAT:** Mecanismo antioxidante de transferencia de átomo de hidrógeno.

**ORAC-FL:** Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, utilizando fluoresceína como sonda.

**ORAC-PGR.** Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, utilizando pirogalol rojo como sonda.

**CLAR – DAD:** Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Contexto histórico de la Salvia hispanica L.</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Características botánicas de la chía</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Características de las semillas de chia</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Lípidos</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5 Proteínas y fibras</b> .....	<b>5</b>
<b>1.6 Polifenoles</b> .....	<b>7</b>
<b>1.7 Antioxidantes y estrés oxidativo</b> .....	<b>9</b>
<b>1.8 Tipos de antioxidantes</b> .....	<b>9</b>
<b>1.9 Antioxidantes en la dieta</b> .....	<b>11</b>
<b>1.10 Radicales libres</b> .....	<b>12</b>
<b>1.11 Determinación de capacidad antioxidante</b> .....	<b>13</b>
<b>1.12 Determinación y cuantificación de polifenoles</b> .....	<b>18</b>
<b>1.13 Genotipos de la planta de chia y aplicación de estrés hídrico</b> .....	<b>20</b>
<b>1.14 Planteamiento del problema</b> .....	<b>22</b>
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>24</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 Reactivos</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 Materiales</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3 Instrumentos y equipos</b> .....	<b>26</b>
<b>4.4 Cultivo de la Salvia hispanica L.</b> .....	<b>27</b>
<b>4.5 Muestreo</b> .....	<b>28</b>
<b>4.6 Secado, molienda y extracción</b> .....	<b>29</b>
<b>4.7 Determinación de la capacidad antioxidante</b> .....	<b>30</b>
4.7.1 Ensayo ORAC – FL .....	30

4.7.2 Ensayo de DPPH.....	31
4.7.3 Ensayo ORAC – PGR .....	32
4.7.4 Ensayo de inhibición del radical hidroxilo .....	33
<b>4.8 Determinación de polifenoles totales y perfil polifenólico.....</b>	<b>35</b>
4.8.1 Ensayo Folin – Ciocalteau.....	35
4.8.2 Determinación de polifenoles por CLAR – DAD .....	36
<b>4.9 Análisis estadístico .....</b>	<b>37</b>
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Determinación de capacidad antioxidante .....</b>	<b>38</b>
5.1.1 Ensayo ORAC – FL .....	38
5.1.2 Ensayo ORAC – PGR .....	44
5.1.3 Ensayo DPPH .....	49
5.1.4 Ensayo de inhibición del radical hidroxilo .....	55
<b>5.2 Determinación de polifenoles totales y perfil polifenólico.....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.1 Ensayo de Folin – Ciocalteau .....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.2 Perfil polifenólico.....</b>	<b>67</b>
5.2.2.1 Perfil polifenólico.....	67
5.2.2.1 Ácido cafeico .....	69
5.2.2.2 Hesperetina.....	73
<b>5.3 Resumen de resultados .....</b>	<b>78</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>VII. REFERENCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>VIII. Anexos .....</b>	<b>85</b>
8.1 Correlaciones entre los ensayos del genotipo de semilla negra.....	85
8.2 Correlaciones entre los ensayos del genotipo de semilla blanca .....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mujer consumiendo semillas de chía para inducir el parto .....	1
Figura 2. Semillas de chía, A) semilla de chía oscura y B) semilla blanca .....	2
Figura 3. Vista general de Salvia hispanica L. ....	3
Figura 4. Aceite de chía tradicional (A) y como complemento alimenticio (B) .....	4
Figura 5. Compuestos fenólicos presentes en la semilla de chía.....	7
Figura 6. Algunos de los sistemas que se ven afectados por una situación de estrés oxidativo .....	9
Figura 7. Clasificación de antioxidantes de acuerdo con su naturaleza química.....	10
Figura 8. El proceso de formación de las especies reactivas de oxígeno .....	13
Figura 9. Plantas de chía con (A)70% (B) 40% y (C) 20% de riego .....	27
Figura 10. Curva de calibración de Trolox para el ensayo ORAC-FL .....	31
Figura 11. Curva de calibración de Trolox para el ensayo ORAC-PGR.....	32
Figura 12. Espectro de resonancia de espín electrónico de DMPO – OH en ausencia de extracto de hoja de chía. ....	34
Figura 13. Espectro de resonancia de espín electrónico del DMPO – OH en presencia de extracto de hoja de chía.....	34
Figura 14. Curva de calibración de Ácido Gálico para el ensayo Folin-Ciocalteu .....	35
Figura 15. Valores ORAC-FL a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla negra .....	38
Figura 16. Valores ORAC-FL a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla blanca.....	41
Figura 17. Valores ORAC-PGR a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla negra .....	44
Figura 18. Valores ORAC-PGR a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla blanca.....	46
Figura 19. porcentaje de remanencia del radical DPPH a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla negra.....	49
Figura 20. porcentaje de remanencia del radical DPPH a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla blanca .....	52

<b>Figura 21. Porcentaje de remanencia del radical hidroxilo frente a los extractos de hoja de chía.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 22. Porcentaje de remanencia del radical hidroxilo frente a los extractos de hoja de chía.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 23. Polifenoles totales a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla negra .....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 24. Polifenoles totales a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla blanca.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 25. Cromatograma de los distintos polifenoles estudiados dentro del extracto .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 26. Cromatograma del extracto de hoja de chía negra, en la primera fecha con 70% de riego .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 27. Concentracion de ácido cafeico a través del tiempo en el extracto de hoja de la planta de semilla negra .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 28. Concentracion de ácido cafeico a través del tiempo en el extracto de hoja de la planta de semilla blanca .....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 29. Concentracion de hesperetina a través del tiempo en el extracto de hoja de la planta de semilla negra .....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 30. Concentracion de hesperetina a través del tiempo en el extracto de hoja de la planta de semilla blanca .....</b>	<b>75</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Fechas de muestreo de las plantas de chía .....</b>	<b>28</b>
<b>    Tabla 1. Compuestos estudiados y longitudes de onda para la absorción máxima .....</b>	<b>36</b>
<b>    Tabla 2. Composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de los extractos de hoja de chía .....</b>	<b>37</b>
<b>    Tabla 3. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo ORAC – FL .....</b>	<b>39</b>
<b>    Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo ORAC – FL .....</b>	<b>40</b>
<b>    Tabla 5. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo ORAC – FL .....</b>	<b>42</b>
<b>    Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo ORAC – FL .....</b>	<b>43</b>
<b>    Tabla 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo ORAC – FL .....</b>	<b>43</b>
<b>    Tabla 8. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo ORAC – PGR .....</b>	<b>45</b>
<b>    Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo ORAC – PGR .....</b>	<b>46</b>
<b>    Tabla 10. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo ORAC – PGR .....</b>	<b>47</b>
<b>    Tabla 11. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo ORAC – PGR ...</b>	<b>48</b>
<b>    Tabla 12. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo ORAC – PGR .....</b>	<b>48</b>
<b>    Tabla 13. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo DPPH .....</b>	<b>50</b>
<b>    Tabla 14. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo DPPH .....</b>	<b>51</b>
<b>    Tabla 15. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo DPPH .....</b>	<b>53</b>

Tabla 16. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo DPPH .....	53
Tabla 17. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo DPPH.....	54
Tabla 18. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo EPR.....	56
Tabla 19. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo EPR.....	57
Tabla 20. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo EPR .....	58
Tabla 21. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo EPR.....	58
Tabla 22. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo EPR .....	59
Tabla 23. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo Folin - Cioalteau .....	62
Tabla 24. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo Folin – Cioalteau	63
Tabla 25. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo Folin – Cioalteau .....	64
Tabla 26. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo Folin - Cioalteau	65
Tabla 27. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo Folin – Cioalteau .....	65
Tabla 28. Compuestos estudiados con sus tiempos de retención y longitud de onda máximos .....	67
Tabla 29. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico .....	70
Tabla 30. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico.....	70
Tabla 31. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico .....	72

Tabla 32. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico.....	72
Tabla 33. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico .....	73
Tabla 34. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el hesperetina.....	74
Tabla 35. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el hesperetina .....	75
Tabla 36. Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el hesperetina.....	76
Tabla 37. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo CLAR – DAD para el hesperetina .....	77
Tabla 38. Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo CLAR – DAD para la hesperetina.....	77
Tabla 39. Tabla resumen de resultados por ensayo .....	78
Tabla 40. Correlación entre los distintos ensayos, genotipo negro y riego de 70% constantes .....	85
Tabla 41. Correlación entre los distintos ensayos, genotipo negro y riego de 40% constantes .....	85
Tabla 42. Correlación entre los distintos ensayos, genotipo negro y riego de 20% constantes .....	85
Tabla 43. Correlación entre los distintos ensayos, genotipo blanco y riego de 70% constantes .....	86
Tabla 44. Correlación entre los distintos ensayos, genotipo blanco y riego de 40% constantes .....	86
Tabla 45. Correlación entre los distintos ensayos, genotipo blanco y riego de 20% constantes .....	86

## RESUMEN

La *Salvia hispanica* L. (planta de chía) ha sido redescubierta en las últimas décadas debido al alto contenido de ácido graso omega – 3 en sus semillas. En la actualidad es reconocida únicamente por esta propiedad que puede tener impactos beneficiosos en la salud de las personas. Sin embargo, las culturas de la zona mesoamericana le atribuían usos religiosos, alimenticios, culturales y medicinales a las distintas partes de la planta. En relación a la hoja de chía, sus aplicaciones han caído en el olvido y no han sido verificadas científicamente para su aprovechamiento en la actualidad.

En el presente trabajo de tesis se evaluaron los efectos del estrés hídrico (por déficit) sobre la capacidad antioxidante y perfil polifenólico de dos genotipos de la planta de chía (genotipo de semilla negra y genotipo de semilla blanca) a lo largo del crecimiento de las mismas. Todo esto con la finalidad de otorgar un valor agregado a la semilla, mediante la recolección de la hoja de la planta, que actualmente es un deshecho.

Para la investigación se realizó un cultivo a campo abierto de los 2 genotipos de la planta, sometida a 3 niveles de riego de acuerdo a la evapotranspiración de ésta (70% como el nivel óptimo, 40% como estrés moderado y 20% como estrés severo). Los muestreos se realizaron cada 15 días aproximadamente, 3 meses luego de la siembra y un mes después de comenzar la aplicación del estrés. Esto dio un total de 6 muestreos entre el 27 de marzo y 12 de junio.

La capacidad antioxidante fue determinada por el ensayo ORAC – FL, ORAC – PGR, inhibición del radical DPPH e inhibición del radical OH. El estudio de contenido polifenólico se realizó con el ensayo Folin – Ciocalteu y mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de arreglo de diodos (CLAR – DAD).

A continuación, se presentan los resultados que podrían cumplir con las condiciones para la obtención de una hoja con propiedades específicas de acuerdo a cada ensayo para el genotipo negro. ORAC – FL: 34374  $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g p.s.}$  (20% de riego, 4ta fecha de muestreo), ORAC – PGR: 543  $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g p.s.}$  (20% de riego,

4ta fecha de muestreo), DPPH: 59,1% de remanencia (20% de riego, 4ta fecha de muestreo), remanencia de radical OH: 20,4% (70% de riego, 6ta fecha de muestreo), Folin – Ciocalteu: 2,01 mg EAG/100 g p.s. (70% de riego, 5ta fecha de muestreo), ácido cafeico: 34,2 mg L (40% de riego, 4ta fecha de muestreo), hesperetina: 31,6 mg L (20% riego, 3ra fecha de muestreo).

De los resultados anteriores, se propone que la recolección de hoja de chía ocurra desde la quinta fecha de muestreo, momento en el que el deshoje natural de la planta ya ha comenzado. El riego idóneo es 70% para el genotipo de semilla negra.

**Palabras claves:** *Salvia hispanica* L., capacidad antioxidante, polifenoles, estrés hídrico.

## ABSTRACT

*Salvia hispanica* L. (chia plant) has been rediscovered in recent decades due to the high content of omega - 3 fatty acid in its seeds. Currently it is recognized only by this property that can have beneficial impacts on people's health. However, the cultures of the Mesoamerican zone attributed religious, nutritional, cultural and medicinal uses to the different parts of the plant. In relation to the leaf of chia, its applications have fallen into oblivion and have not been scientifically verified for its use at present.

In this thesis work, the effects of water stress (due to deficit) on the antioxidant capacity and polyphenolic profile of two genotypes of the chia plant (black seed genotype and white seed genotype) were evaluated along the growth of the same. All this with the purpose of granting an added value to the seed, by means of the collection of the leaf of the plant, that at the moment is a waste.

For the research, an open-field culture of the 2 genotypes of the plant was carried out, subjected to 3 levels of irrigation according to the evapotranspiration of the plant (70% as the optimal level, 40% as moderate stress and 20% as severe stress). ). Samples were taken every 15 days approximately, 3 months after sowing and one month after beginning the application of stress. This gave a total of 6 samplings between March 27 and June 12.

The antioxidant capacity was determined by the ORAC - FL assay, ORAC - PGR, inhibition of the DPPH radical and inhibition of the OH radical. The study of polyphenolic content was carried out with the Folin - Ciocalteu test and by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (CLAR - DAD).

Next, the results that could meet the conditions for obtaining a leaf with specific properties according to each test for the black genotype are presented. ORAC - FL: 34374  $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g p.s.}$  (20% irrigation, 4th sampling date), ORAC - PGR: 543  $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g p.s.}$  (20% irrigation, 4th sampling date), DPPH: 59.1% remanence (20% irrigation, 4th sampling date), remanence of OH radical: 20.4% (70% irrigation, 6th date of sampling), Folin - Ciocalteu: 2.01 mg EAG / 100 g ps (70% irrigation,

5th sampling date), caffeic acid: 34.2 mg L (40% irrigation, 4th sampling date), hesperetin: 31.6 mg L (20% irrigation, 3rd sampling date).

From the previous results, it is proposed that the chia leaf collection occurs from the fourth sampling date, at which time the natural defoliation of the plant begins. The ideal irrigation is 20%.

**Keywords:** *Salvia hispanica* L, antioxidant capacity, polyphenols, water stress.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Contexto histórico de la *Salvia hispanica* L.

La *Salvia hispanica* L. es una planta herbácea anual perteneciente a la familia de las Lamiaceae más conocida como chía. Esta planta fue ampliamente utilizada por diversas culturas precolombinas de la zona mesoamericana con fines alimenticios, económicos, religiosos y medicinales, siendo de alta relevancia en el Imperio Azteca, donde los pueblos subyugados debían pagar tributos en chía, los que eran recibidos en la capital imperial Tenochtitlan y se considera que fluctuaron entre 5 y 15000 toneladas de semilla de chía al año (Mendoza et al, 1925). Sin embargo, pese a su amplia producción y uso, esta especie permaneció en el olvido por aproximadamente 500 años debido a su vinculación con la idiosincrasia de los pueblos originarios del norte de América (Ayerza et al, 2004).



**Figura 1.** Mujer consumiendo semillas de chía para inducir el parto (imagen obtenida del Códice Florentino)

Dentro de los usos gastronómicos de la semilla chía es posible mencionar el consumo de la semilla como harina, llamada *chiampinolli* la cual se incorporaba en tortillas, tamales y brebajes conocidos como *chianatoles*; los usos medicinales en la antigüedad eran variados, destacando el consumo de bebidas con semillas de chía para inducir el parto como se observa en la figura 1, por otro lado, la hoja era



utilizada para aliviar el dolor de cabeza y también como cataplasmas para calmar zonas de la piel quemadas o heridas. La raíz de la planta era secada y molida para detener la diarrea (Mendoza et al, 1925), sin embargo, pocos estudios se han abocado a evaluar los efectos beneficiosos de la planta de *Salvia hispanica* L. y muchos se han destinado a buscar nuevas aplicaciones biológicas para la semilla y sus productos derivados como el mucílago, el aceite o sus macronutrientes. (Álvarez et al, 2007).

Desde la década de 1950 la planta de chía volvió a la luz pública, debido principalmente al potencial nutritivo de sus semillas debido a la calidad de sus aceites (30,74%), la cantidad de proteínas (16,54%) y los tipos de hidratos de carbonos presentes (42,12%) (USDA, 2004). Los aceites de chía son una de las características más destacables de la semilla, principalmente por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y en particular por la alta concentración del ácido graso omega-3 en su forma de ácido  $\alpha$ -Linolénico (ALA). Los estudios derivados de esta característica de la semilla han abierto un amplio campo de investigación nutricional, farmacéutico, clínico, alimenticio, agronómico, entre otros.



**Figura 2.** Semillas de chía, A) semilla de chía oscura y B) semilla blanca.

La especie *S. hispanica* posee actualmente, dos genotipos de origen natural distinguibles por la pigmentación de la superficie de sus semillas, unas son oscuras con estrías en su superficie y otras blancas, como puede observarse en la figura 2. En términos de composición oleica, las semillas no muestran diferencias al ser sometidas a iguales condiciones de crecimiento según estudios realizados en diferentes localidades de Ecuador (Ayerza, 2010), es por ello que se han abierto líneas de desarrollo de nuevas variedades de chía y evaluación de los efectos del cruzamiento natural de distintas variedades, con la intención de aumentar los rendimientos en la producción de semilla (Hérmendez et al, 2007).

## 1.2 Características botánicas de la chía

Como se mencionó anteriormente la *Salvia hispanica* L. pertenece a la familia de las Lamiaceae. Es una hierba anual que mide entre 1,0 y 1,5 m de altura. En la figura 3 se puede observar una representación de las distintas secciones de la planta de chía: los tallos son ramificados, cuadrangulares con pelos tectores cortos y blancos. Las hojas son aserradas con un peciolo de hasta cuarenta milímetros de largo y miden de 80 a 100 mm de longitud y 40 a 60 mm de anchura. Presenta espigas terminales o axiales, en grupos protegidos por pequeñas brácteas largas y puntiagudas. El péndulo es corto, el cáliz persistente en forma de tubo, abultado, estriado y tres dientes agudos, uno más largo que los otros dos. La corola es tubular, de color azul, con cuatro estambres, dos de los cuales son más grandes y estériles. El ovario es discoídeo y el estigma bifido. Las semillas, presentes en el fruto indehiscente, son ovales, suaves y brillantes, de un color negro grisáceo con manchas irregulares o blancas, según la variedad, se presentan en grupos de cuatro y miden entre 1,5 y 2 mm (Coates et al, 1996).



**Figura 3.** Vista general de *Salvia hispanica* L. (A), flor de la planta (B), caliz donde se contiene el fruto (C) y aquenio donde se encuentra contenida la semilla (D).

### 1.3 Características de las semillas de chia

El redescubrimiento de la planta de chía, en particular de las propiedades de su semilla, le ha permitido alcanzar niveles sorprendentes de popularidad y su asimilación en la cultura como un sinónimo de buena alimentación o un super alimento. Esto se debe a la proporción y calidad de los macronutrientes, junto con los elementos y la presencia de especies químicas beneficiosas en la prevención y posible tratamiento de enfermedades asociadas al estilo de vida de las sociedades occidentales (Espada et al, 2007).

### 1.4 Lípidos

La semilla de chía posee un alto contenido de lípidos en su estructura (30,74%) (USDA, 2004), principalmente ácidos grasos poliinsaturados, dentro de ellos, los principales constituyentes son los ácidos grasos linoleicos (17 – 16%) y ácidos grasos linolénicos (50 – 57%) (Ayerza, 1995). La forma de ácido graso  $\omega - 3$  presente en la semilla de chía (alfa – linolénico ALA), representa cerca del 75% del contenido total de lípidos de ella, pudiéndose encontrar que el 25% del peso de la semilla corresponde a ALA (USDA, 2004). Estas características han permitido desarrollar distintos productos oleosos con fines médicos y nutricionales como se puede ver en la figura 4.



**Figura 4.** Aceite de chía tradicional (A) y como complemento alimenticio (B).

Durante 2012 se realizaron estudios para evaluar la variación en la concentración de ALA y EPA (ácido eicosapentanoico) en la sangre de un grupo de mujeres con

sobre peso. Para ello se suministró a cada mujer 25 g de semilla de chía entera, molida o un placebo durante 10 días. De este experimento se pudo observar que hubo diferencias significativas en el contenido de los ácidos grasos en cuestión en el plasma sanguíneo de las mujeres que consumieron chía frente a las que consumieron placebo. Sin embargo, no se observaron diferencias en la concentración de los lípidos en la sangre que puedan atribuirse al consumo de la semilla de chía entera o molida. Además, fue posible determinar que no hubo efecto de la presencia de dichos ácidos en los procesos inflamatorios propios del organismo. (Nieman et al, 2012).

### **1.5 Proteínas y fibras**

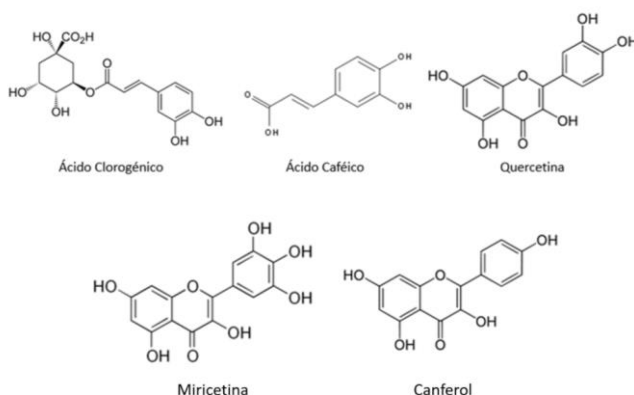
Si bien el contenido proteico en semillas varía según las condiciones de manejo del cultivo, se puede indicar que se encuentra entre 16 – 23 % en base a peso seco (Marcinek et al, 2017) comparable a los niveles de proteína que contienen semillas como la nuez, almendra o maní (entorno al 20% en base a peso seco). De acuerdo con estudios sobre el perfil de aminoácidos, calidad de proteínas y ensayos de digestibilidad *in vitro*, se observaron niveles considerables de ácido glutámico (123 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta), arginina (86,6 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta) y ácido aspártico (61,3 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta) (Olivos et al, 2010). Pese al elevado contenido de dichas proteínas, la semilla de chía muestra deficiencias en el perfil de aminoácidos esenciales, respecto a los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (FAO, 1985), por lo que la semilla de chía no se recomienda como única fuente de suplementación de proteínas, debido a que, por ejemplo, se deberá incorporar a la dieta lisina.

*“La fibra dietética es una mezcla de compuestos que consiste en polímeros de hidratos de carbono de las plantas, ambos, oligosacáridos y polisacáridos, por ejemplo, la celulosa, la hemicelulosa, sustancias pépticas, (...)”* (Elleuch et al, 2011). Como se mencionó anteriormente el contenido de fibra en la semilla de chía es entre el 35% a 40%, sin encontrarse diferencias significativas entre cultivos de distintas

regiones de México. Es importante señalar que La Asociación Dietética Americana indica que la ingesta diaria de fibra para adultos debe ser entre 25 y 30 gramos con una razón entre Fibra Dietética Insoluble y Fibra Dietética Soluble (FDI/FDS) que varíe entre 3:1 y 1:1 (Borderías et al, 2005), en relación a esto, la semilla de chía posee una razón de FDI/FDS de 5,10 a 5,34 (Reyes et al, 2008), por lo tanto es una buena opción para aportar a fibra dieta diaria.

## 1.6 Polifenoles

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos químicos que contienen al menos un grupo fenol dentro de su estructura. Son conocidos por sus funciones reguladoras en los organismos vegetales, siendo constituyentes del metabolismo secundario de las plantas. Dentro de los propios organismos vegetales, este grupo de compuestos son sintetizados para controlar vías metabólicas, alterar su entorno, protegerse en situaciones estresoras como el ataque de herbívoros.



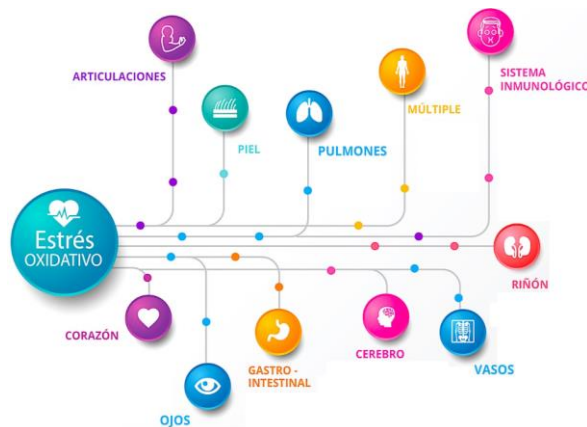
**Figura 5.** Compuestos fenólicos presentes en la semilla de chía.

En la figura 5 se pueden observar el grupo de compuestos fenólicos que se identificaron y cuantificaron en la semilla de la planta de chía: miricitina (0,115 – 0,121 mg g<sup>-1</sup>), quercetina (0,007 – 0,006 mg g<sup>-1</sup>), canferol (0,0,25 – 0,024 mg g<sup>-1</sup>), ácido clorogénico (0,226 – 0,218 mg g<sup>-1</sup>) y ácido cafeico (0,139 – 0,149 mg g<sup>-1</sup>) (Ayerza et al, 2013). Cabe señalar que estos compuestos fueron encontrados libres y glicosilados, lo cual favorece la solubilidad de los compuestos y la movilidad de estos en la planta (Marcinek et al, 2017), recientemente se publicó una investigación que realizaba una primera caracterización del perfil químico de la hoja de chía mediante espectroscopia de masas, identificándose algunos compuestos mencionados anteriormente y otros como ácido cítrico, derivados glicosilados de ácidos cumarínicos, quercetinas, apigenina, elágico, entre otros, pero cabe destacar, que se realizó un extractor etanólico sin optimizar por maceración y posteriormente sólo se realizó la identificación de dichos compuestos (Amato et al, 2015).

Además de la gran utilidad que poseen los compuestos fenólicos para la vida de los organismos vegetales, también presentan actividades biológicas interesantes en otros organismos, como los humanos: muchos de los compuestos generados por las plantas tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiparasitarias, antifúngicas, antitumorales, entre otras. Por ello, que es de sumo interés su determinación y evaluación tanto, *in vitro* como *in vivo*.

## 1.7 Antioxidantes y estrés oxidativo

Los antioxidantes son especies químicas que, en bajas concentraciones, son capaces de retardar la oxidación de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, ADN u otro sustrato de interés biológico (Sindhi et al, 2013). Esto es de alta importancia debido a que la oxidación descontrolada de sustratos biológicos de tal importancia puede conllevar la muerte celular o la aparición de enfermedades de alta complejidad como Alzheimer (Huang et al, 2016), Parkinson (Yeung et al, 2017), diabetes (Maritim et al, 2003), disfunciones cardiovasculares, cáncer (Hamid et al, 2010), entre otras (Sindhi et al, 2013). La situación descrita anteriormente es conocida como estrés oxidativo, donde se manifiesta un exceso de especies oxidantes como las especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno (ERO o ERN respectivamente) y como se muestra en la figura 6, se observan algunos de los tejidos que se pueden ver afectados.



**Figura 6.** Algunos de los sistemas que se ven afectados por una situación de estrés oxidativo.

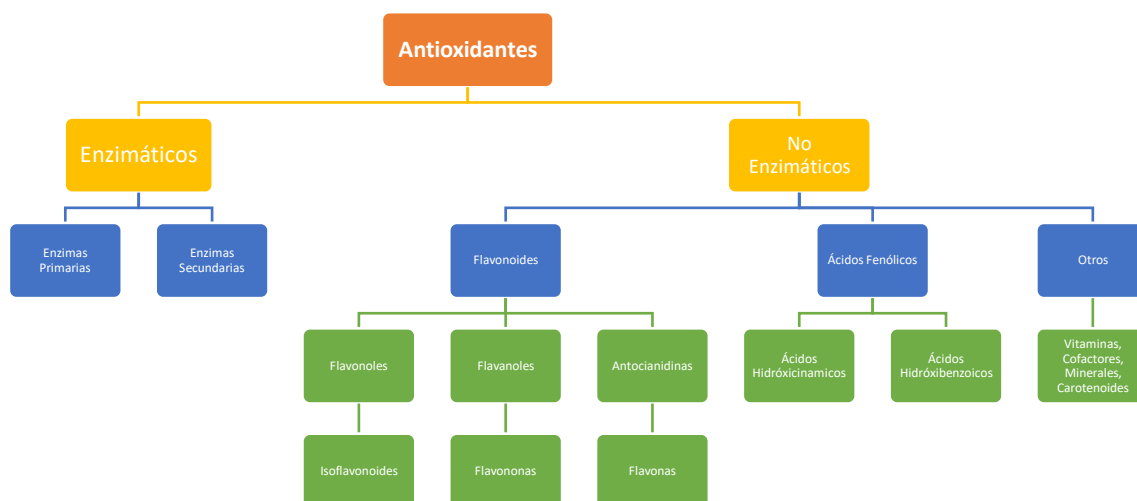
## 1.8 Tipos de antioxidantes

Los antioxidantes pueden ser clasificados de acuerdo con su naturaleza química, que puede ser enzimática, molecular orgánica o mineral. Dentro del grupo enzimático es posible encontrar especies como la super-óxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) o la glutatión – reductasa (GR); dentro del grupo de los minerales es posible mencionar al selenio, cobre, zinc, entre otros. Finalmente, dentro de los



compuestos orgánicos principales con actividad antioxidante se encuentran una serie de vitaminas como la vitamina A, C, E y compuestos con alta conjugación como los carotenoides y compuestos fenólicos (Sindhi et al, 2013).

Las distintas entidades que poseen actividad antioxidante para proteger a los organismos de niveles de oxidación descontrolados se organizan en líneas de defensa, siendo la primera línea defensiva la compuesta por enzimas que se encargan de descomponer especies como el anión radical súper óxido y el peróxido de hidrógeno, mediante SOD y CAT respectivamente, junto con los minerales mencionados utilizados como cofactor o estabilizadores de radicales. La segunda línea defensiva es la de los compuestos de carácter orgánico, estos son sumamente importantes, ya que deben ser incorporados al organismo principalmente mediante la dieta, complementos o suplementos alimenticios. Existe también una tercera línea defensiva que, si bien no impide la reacción de los radicales libres con sustratos de interés biológicos, es capaz de reparar las moléculas dañadas mediante un complejo sistema de enzimas (Sindhi et al, 2013), en la figura 7 se resumen los grupos de antioxidantes.



**Figura 7.** Clasificación de antioxidantes de acuerdo con su naturaleza química.

## 1.9 Antioxidantes en la dieta

Mediante diversos estudios ha sido posible evaluar el efecto de dietas ricas en antioxidantes sobre la prevención y tratamiento de enfermedades complejas como las mencionadas en el punto anterior. En un gran número de alimentos ya ha sido posible identificar y aislar el compuesto principal que posee propiedades beneficiosas para la salud, es el caso por ejemplo de la capsaicina presente en la familia de las solanáceas, particularmente en el género de las capsicum a la cual se le han atribuido diferentes propiedades anticancerígenas frente a cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático o cáncer gástrico (Cao et al, 2015), así mismo, se encuentran reportados los efectos del beta-caroteno frente al riesgo de contraer cáncer de pulmón, estos mostraron que no solo la presencia de un compuesto antioxidante tiene efectos sobre la salud, sino también los hábitos de las personas, ya que ensayos desarrollados en fumadores y no fumadores de cigarrillos dejaron en evidencia que el beta-caroteno es capaz de disminuir el riesgo de contraer cáncer de pulmón siempre que el individuo no sea fumador o fumador moderado (25mg de betacaroteno al día durante 8 años, en personas que fuman menos de 20 cigarrillos al día), ya que en caso contrario, el riesgo puede aumentar acorde al nivel de consumo de cigarrillos (Goralczyk et al, 2009).

Estudios realizados en 2009 sobre la población de 23 países desarrollados, mostró la influencia de la ingesta de flavonoides en la disminución de la tasa de casos de demencia senil y Alzheimer (Beking et al, 2009). Otros estudios realizados en 2014 mostraron que la quercetina posee propiedades protectoras frente a enfermedades cardiovasculares (ECV) (Lara et al, 2012).

Como ha sido posible evidenciar, una dieta rica en frutas y verduras (Li et al, 2011), granos (Giu et al, 2012), microalgas, hongos comestibles (Guo et al, 2012) y plantas medicinales provee un complemento a los sistemas antioxidantes intrínsecos de las personas, mediante la ingesta de una serie de metabolitos secundarios capaces de

prevenir y tratar enfermedades con una elevada tasa de mortalidad (Zhang et al, 2015).

Actualmente, las investigaciones y la información sobre las propiedades atribuidas a las distintas secciones de la planta de chia, sus características químicas, biológicas o nutricionales, son escasas. Como se mencionó anteriormente, en 2015 se publicó un estudio que realiza una identificación sencilla de algunos metabolitos secundarios en la hoja de la planta mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (Amato et al, 2015). Esto abre una gran senda en la caracterización y confirmación de toda la información tradicional de las culturas precolombinas que la veían como fuente de medicación, nutrición y espiritualidad.

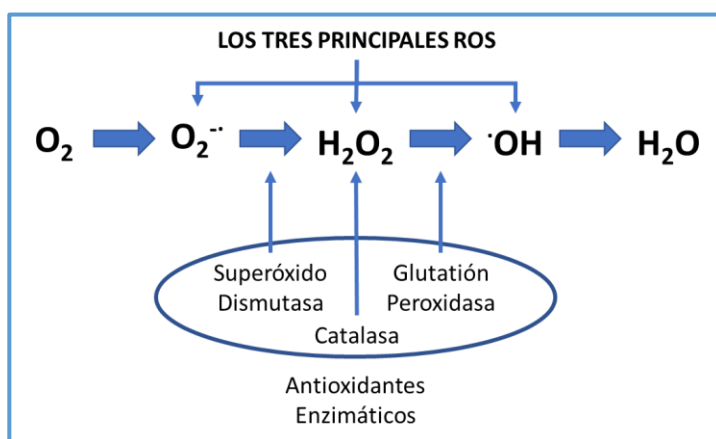
### **1.10 Radicales libres**

*“Los radicales libres pueden ser definidos como cualquier especie molecular capaz de existir de manera independiente y que contenga un electrón desapareado en un orbital atómico. La presencia de un electrón desapareado resulta en una propiedad común que comparte la mayoría de los radicales. Muchos radicales son inestables y altamente reactivos. Pueden donar o aceptar electrones desde otras moléculas, por lo que pueden comportarse como oxidantes o reductores. (...)”* (Lobo et al, 2010). La relevancia del estudio de los radicales libres recae en su alta reactividad y baja selectividad, siendo capaces de atacar moléculas con roles biológicos vitales como lípidos, proteínas o ADN. Sin embargo, es importante recalcar que dichas especies químicas son naturales en los organismos y derivan de procesos metabólicos esenciales.

Dentro de los radicales libres más importantes para los organismos se encuentra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el radical hidroperoxilo, el radical peróxido, el radical alcóxido, el ácido hipocloroso y los peroxinitritos (Lobo et al, 2010). El organismo, como se explicó en el punto de antioxidantes, posee mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para controlar las concentraciones de radicales libres. Los problemas a la salud comienzan en el momento en que la concentración de radicales libres excede a los mecanismos de

control antioxidante, esta situación es conocida como “estrés oxidativo” y puede aparecer debido a una complementariedad de algunos de los factores inductores como los procesos mitocondriales, procesos inflamatorios, fagocitosis, ejercicio, isquemia, consumo de cigarrillos, exposición a contaminación ambiental, radiación, cierto tipo de drogas, pesticidas, solventes industriales, ozono, entre otros.

Las principales especies oxidantes en los organismos son las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), dentro de las cuales, es posible encontrar de manera natural al oxígeno molecular, al radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo como se puede observar en la figura 8. Como también es posible observar, estas especies reactivas tienen vías de control enzimáticas y no enzimáticas.



**Figura 8.** El proceso de formación de las especies reactivas de oxígeno.

### 1.11 Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante es la cuantificación de la habilidad de un compuesto, extracto vegetal o muestra compleja para retardar la oxidación de sustratos de interés biológico por radicales libres u otras especies oxidantes. Para ello existen distintas técnicas que permiten evaluar esta propiedad en distintos medios, frente a distintas especies oxidantes. Para ello existen principalmente dos mecanismos de reacción, la abstracción de un átomo de hidrógeno o la transferencia de un electrón

desde el antioxidante hacia el oxidante, esto no es excluyente de que existan vías intermedias de reacción o mecanismos mixtos (Ames et al, 1993).

En la actualidad existe un sinnúmero de métodos para determinar la capacidad antioxidante de un extracto o mezcla, y se hace necesario realizar una comparación crítica de ellos debido a la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados, ya que como se mencionó anteriormente, una de las posibilidades de clasificación de las técnicas es el mecanismo de reacción químico por el cuál ocurre el proceso, otra manera de clasificar es por el sistema en el que se realiza la reacción, *in vitro* o *in vivo*. Al momento de comparar los resultados obtenidos por diferentes ensayos, se debe tener en cuenta el tipo solvente en el que se disuelve el radical que se genera, para realizar la evaluación, la forma en que éste se genera y el mecanismo que está ocurriendo (Alam et al, 2013)

Al comenzar el estudio de un nuevo extracto o molécula, es posible considerar realizar en una primera instancia los ensayos *in vitro* debido a que el nivel de control que se puede tener sobre las interacciones de los constituyentes del sistema es mayor. Dentro de los ensayos clásicos de capacidad antioxidante es posible mencionar al ensayo de DPPH, el ensayo de atrapamiento de peróxido de hidrógeno, el ensayo de capacidad de reducción férrica en plasma (FRAP), el ensayo de capacidad antioxidante mediante la reducción del ion cúprico (CUPRAC), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) utilizando diferentes sondas como Fluoresceína o Pirogalol Rojo, el porcentaje de captura de radical hidroxilo, ensayo de apagamiento de ABTS, entre otros (Alam et al, 2013) (Moharram et al, 2014).

Cada uno de los ensayos mencionados poseen características que le otorgan un cierto grado de validez para continuar con su uso, pese a la renovación en las metodologías. Los ensayos de apagamiento del radical DPPH, de atrapamiento de peróxido de hidrógeno o apagamiento del catión radical ABTS son bastante sencillo de implementar, las mediciones son espectrofotométricas y se basan en la determinación de la variación en la absorbancia al agregar un antioxidante. Sin embargo, el radical DPPH es un radical sintético, que en estado sólido es estable y

el solvente de reacción es orgánico polar (Moharram et al, 2014), esto aleja al ensayo de la realidad en un sistema biológico, mas siendo un ensayo simple y bastante tradicional ha sido ampliamente utilizado y reportado, por lo que se convierte en un parámetro de comparación para muchas investigaciones que se encuentran en las etapas iniciales. El caso del apagamiento del radical ABTS es semejante al de DPPH en términos de simpleza de la implementación, equipamiento necesario y su frecuente uso, al mismo tiempo se puede señalar también, que a diferencia del ensayo de DPPH, la generación del radical libre es mediante termólisis (Alam et al, 2013). Además de lo mencionado para los ensayos anteriores, para el atrapamiento del peróxido de hidrógeno es necesario mencionar que este compuesto oxidante se encuentra presente en el organismo y es parte del metabolismo mitocondrial, lo cual le da una ventaja sobre el ensayo de DPPH y ABTS. Sin embargo, la sensibilidad de las mediciones se ve afectada por la longitud de onda mediante la cual es necesario realizar la determinación: 230 nm, una región propia de la absorción de los enlaces simples de gran parte de los compuestos, lo que representa una mayor cantidad de interferentes (Alam et al, 2013).

Los ensayos FRAP y CUPRAC también son relativamente antiguos y se basan en la reducción de ion férrico y cúprico respectivamente. Las determinaciones también son espectrofotométricas, pero la estabilidad de los productos de reacción es baja, lo cual genera posibles errores en las determinaciones. Por otro lado, estos ensayos más que determinar capacidad antioxidante, determinan poder reductor, es decir, la capacidad de que una molécula reductora, reduzca a los respectivos iones (Moharram et al, 2014). Esto en el caso de compuestos aislados no presenta mayores complicaciones, el problema se presenta cuando se intenta determinar la capacidad antioxidante de matrices complejas y en particular extractos que pueden contener interferentes como azúcares o proteínas reductoras. Cualquier reductor con el potencial electroquímico necesario será capaz de dar cuenta de una sobreestimada capacidad antioxidante.

En el caso de los ensayos ORAC el oxidante utilizado es el radical peroxilo, el cuál es generado mediante la termólisis del compuesto AAPH (2,2'-Azobis(2-

amidinopropane) dihydrochloride). Dentro de las ventajas que pueden destacarse de este ensayo, es la generación del radical peroxilo, el que es posible encontrar en los organismos, la temperatura del ensayo es de 37°C, el medio es un buffer fosfato a pH = 7,4 (López et al, 2011). Esto permite una evaluación más cercana que los otros ensayos a las condiciones fisiológicas. Como se mencionó, el ensayo ORAC tiene diferentes modalidades, las dos principales y más utilizadas son ORAC-FL y ORAC-PGR, ambos sistemas poseen las mismas características que asemejan un organismo vivo y difieren en la molécula sonda que permite hacer un seguimiento de la reacción. Este ensayo se basa en una competencia entre la molécula sonda y la molécula o extracto antioxidante, por reaccionar con el radical libre. Desde este punto, se puede observar una diferencia marcada en la cinética de cada reacción: El proceso de apagamiento del radical libre por la fluoresceína es relativamente lenta frente a la reacción del antioxidante apagando al radical libre. Esto se evidencia en la aparición de un tiempo en el que la fluorescencia del sistema se mantiene constante (López et al, 2011), indicando que no hay reacción entre la fluoresceína y el radical libre. Luego, cuando la concentración del antioxidante disminuye lo suficiente, el radical comienza a reaccionar con la fluoresceína disminuyendo la fluorescencia del sistema. Una de las ventajas particulares de esta técnica es la alta sensibilidad que puede alcanzar, debido al uso de una molécula fluorescente como sonda, disminuyendo la cantidad de muestra necesaria para los análisis, permitiendo bajos límites de detección, como por ejemplo 10 µM para Trolox un antioxidante utilizado como referencia (Dávalos, 2004).

Pese a todas las virtudes expuestas, esta modalidad del ensayo ha sido criticada en sus fundamentos teóricos y prácticos, poniendo en duda los procesos que ocurren dentro del sistema, debido al prolongado tiempo en el que reacciona la molécula sonda con el radical libre. Esto puede permitir que el radical peroxilo sufra un proceso de dimerización y formación del radical alcoxilo, por otro lado, los resultados pueden no dar cuenta de la calidad en términos de reactividad, del antioxidante bajo estudio, ya que una alta reactividad permite que el tiempo de estabilidad de la fluorescencia disminuya, entregando un menor índice ORAC-FL (Dorta et al, 2015).

El ensayo ORAC-PGR, a diferencia del ensayo ORAC-FL no muestra un tiempo de estabilidad en la absorbancia; la sonda comienza a reaccionar con el radical libre al mismo tiempo que el antioxidante, por lo tanto, es posible observar una competencia cinética entre la sonda y el antioxidante por apagar al radical libre. Esto da cuenta de la calidad del antioxidante más que su cantidad, dicho en otras palabras, da cuenta de su reactividad más que de su estequiometría (López et al, 2011), por lo tanto, se convierte en una opción interesante emplear ambas técnicas para evaluar parámetros distintos frente a un mismo radical libre. Es importante destacar también, las limitaciones que posee este método, para el ensayo ORAC-PGR el seguimiento de reacción se realiza mediante absorbancia de la sonda, esto aumenta los límites de detección y disminuye la sensibilidad del método frente a ORAC-FL, por ejemplo. Existen otros interferentes que pueden afectar la medición de absorbancia, como lo son los compuestos coloreados, esto es una desventaja en comparación a los métodos basados en fluorescencia debido a que la emisión de radiación proveniente de compuestos fluorescentes es de una longitud de onda muy específica.

Pese a todos los ensayos analizados anteriormente, es interesante evaluar la capacidad antioxidante del sistema bajo estudio frente al radical hidroxilo, debido a su alta reactividad, con un tiempo de vida del orden de los nanosegundos, sus múltiples mecanismos de aparición vía termólisis, fotólisis o reacción con metales redox-activos presentes en el organismo como el cobre, hierro o manganeso (Halliwell et al, 1992). Debido a la alta reactividad se necesita utilizar un compuesto llamado atrapador de espín, para poder realizar una cuantificación indirecta de la producción de este radical y de su apagamiento por parte de un antioxidante.

En síntesis, este ensayo consiste en la cuantificación de un compuesto generado por la adición de un radical libre a un atrapador de espín; el producto de esta reacción se denomina *espín – aducto*. La estimación de la cantidad máxima de espín – aducto que se puede generar se realiza en ausencia de antioxidantes, para luego comparar dicha cantidad con la generada en presencia de antioxidantes. Es de esperar, que al encontrarse en presencia de antioxidantes la señal obtenida



disminuya y sea posible calcular el porcentaje de inhibición o remanencia del radical hidroxilo para una cantidad específica de antioxidante utilizado.

Para este ensayo se utiliza el equipo REE (Resonancia de Espin Electrónico), capaz de detectar moléculas paramagnéticas (susceptibles a campos magnéticos). Dentro de sus ventajas, es posible mencionar que permite utilizar una pequeña cantidad de muestra gracias a la sucesiva recolección de datos, lo que permite disminuir el error e intensificar las señales, otra ventaja importante de la utilización de este equipo es la detección directa, sin necesidad de sondas como en el caso de los ensayos ORAC-FL y ORAC-PGR, de las moléculas paramagnéticas y su rapidez en la medición, pudiendo tardar segundos a minutos. Por otro lado, una de las desventajas que presentan los estudios con EPR, es que no es posible dilucidar la estructura química de los radicales, es posible saber interacciones de electrones con núcleos e identificar señales características, pero no una estructura en base solo a las constantes de acoplamiento de las señales entregadas por el equipo.

### **1.12 Determinación y cuantificación de polifenoles**

Dentro de las investigaciones realizadas respecto a la caracterización química de especies vegetales y en particular de alimentos, se ha utilizado clásicamente la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), especialmente en extractos realizados con mezclas de amplios rangos de polaridad. También dentro de las investigaciones relacionadas principalmente al área alimenticia es común el uso del ensayo de Folin-Ciocalteu, el que permite una cuantificación general de los polifenoles presentes en un extracto.

En 2015 se desarrollaron investigaciones para determinar el perfil fenólico de berros (*Nasturtium officinale* L.), utilizando CLAR acoplada a detector de arreglo de diodos (DAD), seleccionando 3 longitudes de onda para el registro de los cromatogramas: 280, 320 y 360 nm para aumentar la capacidad de identificación de compuestos presentes en el extracto, evitando el aumento del tiempo en la separación cromatográfica. Dentro de los compuestos identificados se puede mencionar una serie de derivados de ácido gálico, ferúlico, sinapico, hidroxibenzóico. Estos fueron

confirmados por la longitud de onda máxima de los espectros registrados por el detector de arreglo de diodos. En este caso se realizaron extractos metanólicos y acuosos (Zeb, 2015).

Estudios realizados en 2009 sobre extractos metanólicos acidificados de hojas de la planta de albahaca mostraron la presencia de ácido clorogénico, cafeico y sus derivados, rosmarínico, quercetina, entre otros. Para su determinación se utilizó CLAR acoplada a DAD y CLAR acoplada a DAD/ESI-MS/MS, para hacer una caracterización completa de los compuestos presentes y derivados, la columna cromatográfica utilizada fue una C-18 encapada (Lee et al, 2009).

Otros estudios realizados en 2009 para la evaluación del perfil fenólico de la menta (*Mentha piperita* L.), este estudio encontró una serie de compuestos como el ácido cinámico, cafeico o rosmarínico. En este estudio se utilizó CLAR acoplado a DAD, los extractos realizados fueron de variadas polaridades (Dorman et al, 2009).

El ensayo de Folin – Ciocalteu es una cuantificación basada en un método colorimétrico que consiste en la reducción de un complejo metálico de tungsteno y molibdeno. El molibdeno con estado de oxidación +5 es reducido por los polifenoles presentes en el extracto, mediante ajustes de pH, se consigue la formación de un quelato entre el complejo metálico y los fenoles. Mediante esta reacción, la coloración del sistema cambia de amarillo verdoso a azul y la reacción puede ser seguida con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm aproximadamente. Este ensayo, sin embargo, presenta algunas limitaciones: En sus orígenes se utilizaba como una aproximación a la capacidad antioxidante, sin embargo, se descubrió que cualquier especie con el potencial redox adecuado dentro de una muestra o extracto podía llevar a cabo el cambio en la coloración. Por tanto, la medición incluiría otras especies reductoras y no solo a los polifenoles, como azúcares o proteínas.

### **1.13 Genotipos de la planta de chia y aplicación de estrés hídrico**

Como se mencionó previamente, la planta de chía posee dos genotipos naturales estables: genotipo de semilla blanca y genotipo de semilla oscura, en estudios desarrollados relacionados con la producción de aceites de semilla de chía, se pudo observar que la temperatura de cultivo y la altitud a la cual fue llevado a cabo éste, determinaron variaciones en la cantidad y composición de los aceites obtenidos (Ayerza, 2010).

En otro estudio del mismo grupos de investigación, se evaluó el efecto de las condiciones climáticas en la producción de aceites y proteínas en las semillas, pudiéndose destacar, para los propósitos de esta tesis, que los mayores valores de proteínas y lípidos en semilla se encontraron en los niveles inferiores de disponibilidad hídrica, es decir, de un rango de 300 mm a 3000 mm de lluvia, la planta produjo mayor cantidad de lípidos al encontrarse en un ambiente con lluvias de 560 mm promedio al año y la producción de proteínas fue máxima en un ambiente con 407 mm de lluvia al año. Cabe destacar que estos cultivos no se realizaron variando solo una variable en los cultivos, sino que varias, ecosistemas, altitud, temperatura, disponibilidad hídrica, tipo de suelo. Por ello, y como el mismo autor destaca, es necesario seguir realizando estudios para comprender de mejor manera las variables que afectan la producción y calidad de chía (Ayerza, 2009).

Finalmente, Ayerza en 2013, realiza una evaluación de distintos parámetros de calidad de la semilla de chía, midiendo la cantidad de proteína, fibra, aminoácidos y antioxidantes de dos genotipos de chía que difieren en la coloración de su semilla. La principal conclusión de este ensayo es que no se encuentran diferencias significativas en la producción de ninguno de los nutrientes señalados.

Recientemente en Chile existen cultivos comerciales de la planta o semilla de chía, esto abre un nuevo nicho de investigación debido a la gran variedad de climas, tipos de suelos, altitudes, entre otras variables que existen en nuestro país. Esta tesis se enmarca dentro de un proyecto mayor que propone evaluar la factibilidad de la implementación de cultivos productivos de chía en nuestro país. Uno de los factores

a constatar para su viabilidad e implementación es la cantidad de recursos hídricos que consumiría un cultivo como este y optimizarlo para obtener productos con características nutricionales, organolépticas y funcionales destacables, que sean un beneficio para los consumidores. Gran parte de estas propiedades han sido evaluadas para casos específicos en distintas localidades, pero solo considerando a la semilla como producto final e ignorando el posible desarrollo económico que implica las diferentes partes de la planta, como la hoja.

Sin embargo, en otros estudios realizados en *Populus deltoides* se indujo estrés hídrico para evaluar el cambio en la capacidad antioxidante y el contenido fenólico, en hojas y raíz de este árbol, encontrándose diferencias significativas y considerándolo un primer paso para la determinación de la disponibilidad de agua a la que fue expuesto un cultivo en su crecimiento (Popovic et al, 2016). Por otro lado, y evaluando los efectos del estrés hídrico en *Salvia officinalis* L., la que pertenece al mismo género que la *Salvia hispanica* L. (*Salvia*), se puede observar una variación en la absorción de macronutrientes y minerales, debidas a las diferencias entre los niveles de riego (0, 25, 50, 75, 100 %), siendo proporcional la disponibilidad de agua con la cantidad de materia seca de las plantas y la producción de aceites esenciales, sin embargo, la absorción de macronutrientes vegetales (nitrógeno, potasio y fósforo) disminuye o se mantiene constante al existir una mayor disponibilidad hídrica. Esto indica que las condiciones de cultivo, al menos para esta variedad de *Salvia*, afectan en la composición química final de la planta (Corell et al, 2014).

Otros estudios realizados sobre la misma especie vegetal, *Salvia officinalis* L., mostraron que las plantas sometidas a distintos niveles de disponibilidad hídrica, alteraron sus parámetros de crecimiento y disminuyeron significativamente el contenido de ácidos grasos en el área foliar, mediante principalmente, la reducción de ácido linolénico y la ausencia de ácido palmitoléico, sin embargo, se observó que aplicando un nivel moderado de déficit hídrico, aumentó el rendimiento de aceites esenciales (Bettaieb et al, 2009).

## **1.14 Planteamiento del problema**

A lo largo de la historia, el uso de la planta de chía fue integral para las culturas precolombinas mesoamericanas, teniendo usos no solo rituales o alimenticios, sino que también medicinales. Sin embargo, debido a los procesos de colonización por parte del Imperio Español, los usos de la planta de chía se vieron limitados y prácticamente olvidados. Hoy en día, el interés por una alimentación y vida más saludable ha impulsado el redescubrimiento de alimentos ancestrales que podrían ayudar a mejorar los actuales parámetros de alimentación occidental.

Pese a la reincorporación de la semilla de chía a la dieta de las personas y su expansión a nivel mundial, las aplicaciones y análisis son aún muy limitadas frente a los posibles beneficios que se atribuían a la planta de chía por los pueblos mesoamericanos. La investigación científica y el desarrollo industrial de la planta se ha centrado únicamente en la producción de semilla, obviando las posibles aplicaciones de la hoja, el tallo o la raíz, y considerando a la planta como un deshecho, posterior al cultivo de la semilla.

Dentro de los esfuerzos por expandir el consumo de chía, hoy en día se buscan nuevas localidades donde cultivar esta especie. Debido a la gran diversidad climática presente en nuestro país, es que esta tesis se enmarca en un proyecto de investigación mayor que busca evaluar las condiciones de cultivo para la planta de chía en territorio nacional. Ante ello, se deben realizar evaluaciones del consumo hídrico del cultivo y su eficiencia en la producción de materias primas de calidad para el consumo humano.

Es así, que esta tesis propone ser un aporte al comienzo de las investigaciones en la planta de chía, para otorgar un valor agregado a un producto que actualmente es un deshecho: la hoja del cultivo. Para ello, y aportando al conocimiento sobre los beneficios en la incorporación de la planta en la alimentación, como inicio a la exploración de esta planta, se propone evaluar la capacidad antioxidante y caracterizar el perfil polifenólico de los dos genotipos de chía naturales y sus

posibles variaciones debido a la disponibilidad de recursos hídricos, aportando así, a la optimización del proceso productivo.

Además de esto, se propone un seguimiento de los parámetros mencionados en el párrafo anterior, a lo largo del crecimiento de los cultivos, para determinar la fecha óptima de cosecha de las hojas de la planta.

## II. HIPÓTESIS

La capacidad antioxidante y el perfil polifenólico del área foliar de dos genotipos de la *Salvia hispanica* L. son distintos y varían según la fecha del cultivo y la disponibilidad hídrica a la que son sometidos.

## III. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante y perfil polifenólico de extractos del área foliar de dos genotipos de la *Salvia hispanica* L., en diferentes etapas del crecimiento del cultivo, sometido a diferentes niveles de estrés hídrico.

### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de captura del radical hidroxilo de los extractos del área foliar de la *Salvia hispanica* L. mediante el uso de EPR acoplado a la técnica de spin-trapping.
- Determinar la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de *Salvia hispanica* L. mediante ensayos ORAC-FL y ORAC-PGR.
- Determinar la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de *Salvia hispanica* L. mediante ensayo de DPPH.
- Determinar la cantidad de polifenoles totales presentes en los extractos del área foliar de la *Salvia hispanica* L. mediante el ensayo Folin-Ciocalteu.

- Determinar y cuantificar los polifenoles presentes en los diferentes extractos del área foliar de la *Salvia hispanica* L. mediante el uso de cromatografía líquida de Alta resolución (CLAR) acoplado a detector de arreglo de diodos (DAD).
- Relacionar la capacidad antioxidante de los extractos del área foliar de la *Salvia hispanica* L. con la fecha de muestreo y el estrés hídrico.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos

- AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida)), Sigma-Aldrich.
- Fluoresceína (3',6'-dihidroxi-2-benzofuran-3,9'-xanten]-1-ona), Fluka Analytical.
- Rojo de Pirogalol, Merck.
- Solución tampón fosfato pH 7,4 (fosfato monopotásico, fosfato disódico), Sigma -Aldrich.
- Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Sigma-Aldrich.
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), Sigma-Aldrich.
- Reactivo de Folin Ciocalteu, Merck.
- Carbonato de Sodio, Riedel de Haenag Seelze-Hannover.
- Ácido gálico, Sigma-Aldrich.
- Catequina, Sigma Aldrich.
- Ácido cafeico, Sigma – Aldrich.
- Ácido protocatecuico Sigma – Aldrich.
- Hesperetina. Sigma – Aldrich.



- Hesperedina. Sigma – Aldrich.
- Quercetina, Sigma – Aldrich.
- Ácido Ferúlico, Sigma – Aldrich.
- Polidatina, Sigma – Aldrich.
- Mericitina. Sigma – Aldrich.
- Ácido Elágico. Sigma Aldrich.
- Caempferol, Sigma – Aldrich.
- Agua grado HPLC, Merck.
- DMPO (5,5-dimetilpirrolina-N-óxido), Sigma-Aldrich.
- Metanol grado analítico, Merck.
- Peróxido de hidrógeno al 30%, Merck.
- Agua ultrapura (MilliQ).
- Ácido Acético glacial grado gradiente Merk Millipore.
- Acetonitrilo, para análisis de cromatografía líquida, Merck Millipore.

#### **4.2 Materiales**

- Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A.
- Micropipetas 20 -100  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$ .
- Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL.
- Tubos Eppendorf ambar de 1,5 mL.
- Microplacas de 96 pocillos de poliestireno blancas y transparentes.

#### **4.3 Instrumentos y equipos**

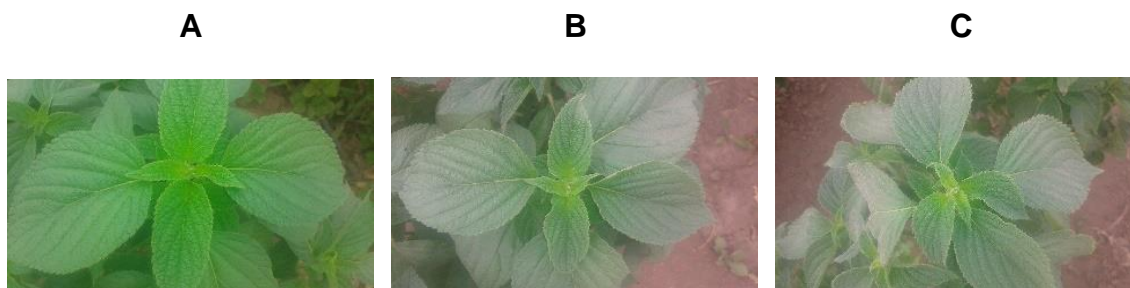
- Espectrofotómetro UV-Visible Specord 600, Analytic Jena.
- Espectrómetro de Resonancia de Espín Electrónico, Bruker ECS 106.
- Multilector de microplacas, Sinergy HT, Bio-Tek Inc.
- Multilector de microplacas, PerkinElmer.
- Cromatografo líquido de alta resolución con columna C18e, acoplado a arreglo de diodos, Agilent Technologies 1200 system.
- Balanza analítica, Precisa 40SM – 200 A.
- Ultrasonido, Power Sonic 405.

- Autovortex, Stuart Scientific SAS.
- Baño Termoregulador, SWB-A, BioBase.

#### 4.4 Cultivo de la *Salvia hispanica* L.

Los cultivos de *Salvia hispanica* L. comenzaron la primera semana del mes de enero de 2015 en la zona norte de Chile, en las cercanías de la ciudad de La Serena, en las instalaciones de INIA – Intihuasi, a cargo del Dr. Herman Silva de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Chile.

El comienzo de la aplicación del estrés hídrico fue realizado durante la primera semana de marzo y consistió en tener un cultivo con el suministro óptimo de agua, un 70% de la humedad evapotranspirada, de acuerdo con determinaciones realizadas en cultivos de años anteriores, luego 40% y 20% de disponibilidad de agua de acuerdo con la evapotranspiración de las plantas. En la imagen 9, puede observarse la apariencia de las plantas en la cuarta semana de aplicación del estrés hídrico (27 de marzo).



**Figura 9.** Plantas de chía con (A) 70% (B) 40% y (C) 20% de riego.

#### 4.5 Muestreo

Los muestreos se realizaron aproximadamente cada 15 días desde finales de marzo del 2015 hasta mediados de junio, las fechas específicas se indican en la tabla 1. Para la recopilación de muestras se eligieron ejemplares completos cortados desde la base de la región aérea de la planta, evitando la recolección de plantas desde las orillas para no ser afectadas las muestras por el efecto borde.

El traslado de las plantas se realizó durante la noche, para ser recibidas en Santiago durante la mañana y comenzar el proceso de secado durante el mismo día, disminuyendo la posible descomposición de éstas. Las hojas de la planta fueron separadas del tallo y las flores, mientras la planta aún estaba fresca.

**Tabla 1.** Fechas de muestreo de las plantas de chíá.

Muestreo	Fechas
1	27 de marzo 2015
2	14 de abril 2015
3	27 de abril de 2015
4	14 de mayo de 2015
5	28 de mayo de 2015
6	12 de junio de 2015

#### **4.6 Secado, molienda y extracción**

El secado de las hojas se realizó a 35°C hasta peso constante en estufa, para disminuir los procesos biológicos y la probabilidad de descomposición de compuestos de interés. Luego del secado, las hojas fueron almacenadas en sobres de papel y luego bolsas de plástico.

El proceso de molienda de las hojas secas se realizó con un mortero de porcelana, con la finalidad de aumentar la superficie de contacto, teniendo como parámetro visual, la homogeneidad del polvo obtenido. La hoja de chía seca y molida fue almacenada en bolsas de plástico y resguardadas de la luz.

Los extractos de hoja de chía fueron realizados mediante un protocolo previamente optimizado por el grupo de laboratorio. Para ello se utilizó una mezcla de solventes como extractante compuesta por acetona, agua y ácido acético en proporción de volúmenes de 70 / 29,5 / 0,5 (Soto, 2015). Finalmente, la razón entre materia vegetal seca y mezcla extractante fue de 1 g de hoja seca en 25 mL de solución extractante.

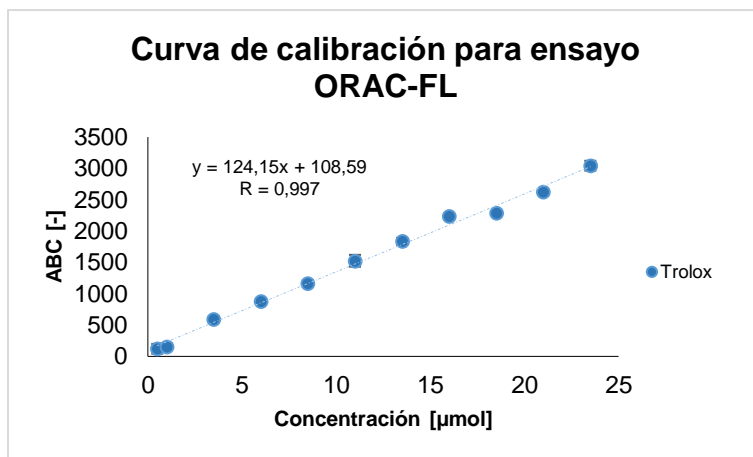
La mezcla de extracción fue expuesta a 1,5 horas de ultrasonido a 22 kHz de frecuencia, en potencia media. El resultante se mantenía a temperatura ambiente protegido de la luz durante 72 horas. Luego del periodo de maceración, se comenzaban los análisis durante la misma jornada que se realizó la extracción. Las extracciones se realizaron en triplicado.

## **4.7 Determinación de la capacidad antioxidante**

### **4.7.1 Ensayo ORAC – FL**

Los ensayos ORAC-FL (López et al, 2011) fueron medidos en un multilector de micro placas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, USA), usando micro placas de poliestireno blanco de 96 celda Nunc (Dinamarca). La fluorescencia fue medida con una longitud de onda de excitación fija de 485 nm y una emisión de 528 nm. El lector de micro placas fue controlado usando el software Gen 5. Las reacciones fueron llevadas a cabo en buffer fosfato 75 Mm (pH = 7,4). El volumen final en la celda fue de 200  $\mu$ L. Se agregaron 150  $\mu$ L de FL (40 nM, concentración en celda) y 25  $\mu$ L de extracto de hoja de chíá diluido 500 veces en buffer fosfato. La solución resultante fue incubada durante 7 minutos a 37°C, luego se agregaron 25  $\mu$ L de AAPH (18 mM en celda), utilizando una micropipeta con multicanales. La micro placa fue colocada inmediatamente en el lector y agitada automáticamente antes de comenzar la medición. La fluorescencia fue medida cada 1 minuto por 150 minutos. Se incorporó en la placa también un blanco que consistía en soluciones de FL, AAPH y buffer fosfato en lugar de los extractos.

Posteriormente, se realizó una curva de calibración del compuesto patrón, Trolox a concentraciones entre 0,5  $\mu$ M y 23,5  $\mu$ M, presentada en la figura 10, con ella se expresaron los resultados del ensayo ORAC – FL en equivalentes de Trolox. Para realizar esta curva de calibración, se determinó el área bajo la curva de las gráficas del decaimiento de la fluorescencia en el tiempo y se correlacionó con la concentración de los antioxidantes presentes en los extractos. Las áreas bajo la curva determinadas para cada extracto fueron interpoladas en la curva de Trolox y se expresaron los resultados en [ $\mu$ mol ET/100 gramos de hoja seca].



**Figura 10.** Curva de calibración de Trolox para el ensayo ORAC-FL.

#### 4.7.2 Ensayo de DPPH

Para realizar este ensayo se preparó una solución 0,09 mM de radical DPPH<sup>•</sup> en metanol, para realizar mediciones fotométricas a una longitud de onda de 516 nm aproximadamente, en presencia de extractos de hoja de chía. La proporción entre la solución de DPPH<sup>•</sup> y el extracto de chía fue de 2800 μL/20 μL respectivamente. Posteriormente, se dejó reaccionar el sistema en oscuridad durante 15 minutos y se procedió a la medición. El tiempo fue determinado para sistemas semejantes mediante la realización de cinéticas de apagamiento del radical DPPH<sup>•</sup>, asegurando que la reacción estuviera finalizada.

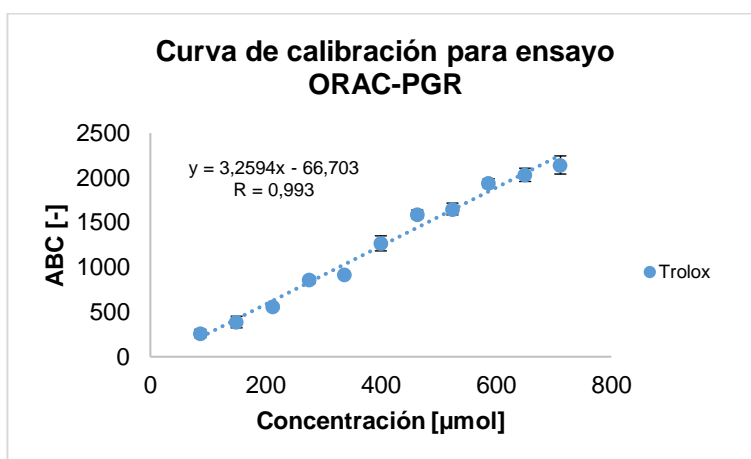
Las mediciones se realizaron con un espectrómetro UV-Vis UNICAM en celda de cuarzo, en triplicado y los resultados de este ensayo se utilizaron únicamente para la comparación entre los elementos de este estudio y fueron expresados en porcentaje de remanencia utilizando la ecuación 1.

$$\% \text{ Remanencia} = \left( \frac{Abs_{Blanco} - Abs_{Muestra}}{Abs_{Blanco}} \right) \times 100$$

**Ecuación 1** Ecuación para el cálculo de porcentaje de remanencia en métodos fotométricos

### 4.7.3 Ensayo ORAC – PGR

Los ensayos ORAC-PGR fueron medidos en un multilector de micro placas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, USA), usando micro placas de poliestireno transparente de 96 celdas Nunc (Dinamarca). La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 540 nm. El lector de micro placas fue controlado usando el software Gen 5. El índice ORAC-PGR fue determinado como lo describieron (Speisky et al, 2012), con algunas modificaciones. La reacción fue llevada a cabo en buffer fosfato 75 mM (pH = 7,4). El volumen final de la celda fue de 200  $\mu$ L. En primer lugar, se agregaron 150  $\mu$ L de PGR (70  $\mu$ M, concentración en celda) y 25  $\mu$ L de muestra diluida 100 veces en buffer fosfato. La solución resultante fue pre incubada por 7 minutos a 37°C, luego se adicionó una alícuota de AAPH (25  $\mu$ L, 0,1 M concentración final) usando micropipeta con multicanales. La micro placa fue colocada inmediatamente en el lector y agitada automáticamente antes de la medición. La absorbancia fue medida cada 15 segundos, por 90 minutos.



**Figura 11.** Curva de calibración de Trolox para el ensayo ORAC-PGR.

Se incorporó en la placa también una solución blanco que contenía PGR, AAPH y buffer fosfato en lugar de extracto antioxidante. El valor ORAC-PGR se calculó interpolando el área bajo la curva de los extractos en una curva de calibración del patrón trolox entre concentraciones 86  $\mu$ M y 711  $\mu$ M, presentada en la figura 11, realizada para este ensayo, los resultados fueron expresados en [ $\mu$ mol ET/100 gramos de hoja seca].

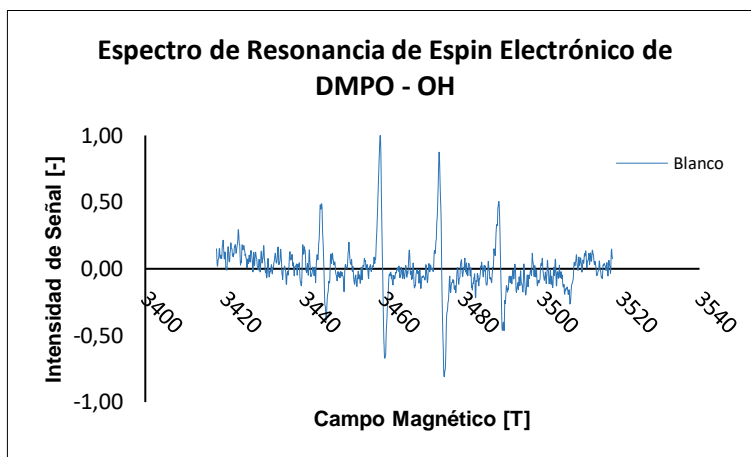
#### **4.7.4 Ensayo de inhibición del radical hidroxilo**

Los ensayos de reactividad fueron medidos por REE en un espectrómetro Bruker ECS 106 equipado con una cavidad rectangular con una modulación de campo de 50 KHz. Las mediciones fueron llevadas a cabo generando el radical hidroxilo mediante fotólisis de peróxido de hidrógeno. El radical fue detectado utilizando el atrapador DMPO (5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide). El medio de reacción fue agua nano pura y con ella se prepararon las diluciones del atrapador (200 mM) y del extracto de hojas de chía fue diluido 12,5 veces, el peróxido de hidrógeno se utilizó en concentración de 30 % v/v. Cada medio de reacción contenía 50  $\mu$ L de atrapador, 50  $\mu$ L de extracto diluido, 50  $\mu$ L de agua nano pura y 50  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno.

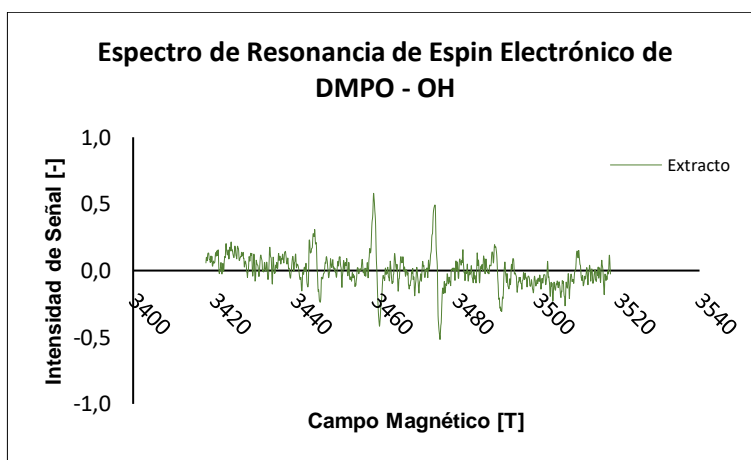
Para la fotólisis se utilizó una lámpara de deuterio, durante 30 segundos previo al comienzo de la medición. Se realizó también blancos para determinar si existía la formación de radicales libres dentro del extracto cambiando el peróxido de hidrógeno por agua nano pura y fotolizando. También se realizó un blanco para determinar la cantidad máxima de espín – aducto formado, para ello se reemplazó el extracto antioxidante por agua nano pura. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición de la formación del espín – aducto DMPO – OH.



Los espectros registrados para el espín aducto DMPO – OH se presentan en las figuras 12 y 13, ambos espectros fueron normalizados bajo los registros del espín aducto formado en ausencia del extracto con la intención de determinar la disminución generada con capacidad antioxidante del extracto.



**Figura 12.** Espectro de resonancia de espín electrónico de DMPO – OH en ausencia de extracto de hoja de chía. Se observan claramente 4 líneas representativas atribuidas a las constantes de acoplamiento de DMPO – OH.



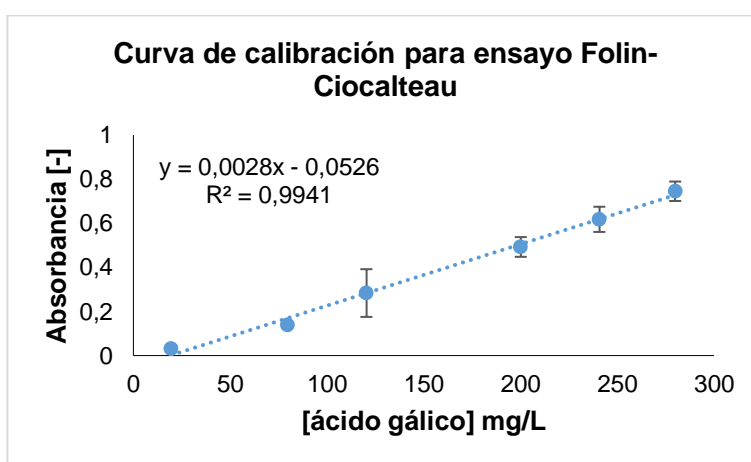
**Figura 13.** Espectro de resonancia de espín electrónico del DMPO – OH en presencia de extracto de hoja de chía. Se observan 4 líneas principales claramente disminuidas, evidenciando la inactivación del radical hidroxilo antes de ser capturado por el atrapador DMPO.

## 4.8 Determinación de polifenoles totales y perfil polifenólico

### 4.8.1 Ensayo Folin – Ciocalteau

El ensayo de polifenoles totales fue realizado en un multilector de micro placas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, USA), usando micro placas de poliestireno transparente de 96 celdas Nunc (Dinamarca). La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 765 nm. El lector de micro placas fue controlado usando el software Gen 5. En cada celda se incorporaron 200  $\mu$ L de reactivo de Folin – Ciocalteau diluido en proporción de 1,5 mL de reactivo de Folin – Ciocalteau en 13,5 mL de agua nano pura, 15  $\mu$ L de Blanco (agua nano pura) o extracto diluido 12,5 veces, 40  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio 20 % m/v y 45  $\mu$ L agua nano pura.

El sistema se mantuvo durante 30 minutos a 37°C, y se agitó previo a la medición de absorbancia. Para expresar los resultados, se realizó una curva de calibración para un antioxidante patrón, en este caso se utilizó ácido gálico, presentada en la figura 14. Los resultados fueron expresados en mg EAG/100 g de hoja seca. Los experimentos fueron realizados en triplicados y los resultados se expresan como la media y su desviación estándar.



**Figura 14.** Curva de calibración de Ácido Gálico para el ensayo Folin-Ciocalteau.

#### 4.8.2 Determinación de polifenoles por CLAR – DAD

Para realizar una caracterización polifenólica se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa con un detector de arreglo de diodos (DAD) Agilent Technologies 1200 system, utilizando una columna C18e Chromolith High Resolution de 100 – 4,6 mm de diámetro, sistema de bomba cuaternaria, el volumen de inyección (loop) fue de 20  $\mu$ L. La adquisición de datos se realizó a la longitud de onda de 280 nm y la longitud de onda máxima de cada compuesto, expuestas en la tabla 1, se utilizó para confirmar la presencia o ausencia de cada uno de los estándares. La determinación a 280 nm es esencial en la identificación y cuantificación de polifenoles, ya que un gran porcentaje de ellos absorben a esta longitud de onda (Hassane et al, 2012).

**Tabla 1.** Compuestos estudiados y longitudes de onda para la absorción máxima.

Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}$
Ácido Gálico	272
Ácido Protocatecuico	260
Catequina	278
Ácido Cafeico	322
Ácido Ferúlico	322
Polidatina	318
Miricetina	371
Hesperetina	284
Quercetina	370
Ácido Elágico	364
Canferol	366

La composición de la fase móvil en el programa de elución optimizado por el grupo de laboratorio consiste en acetonitrilo (A) – ácido acético 2 % (B) y el programa utilizado se detalla en la tabla 2. La identificación de los polifenoles fue mediante la inyección de los estándares de manera individual, determinando su tiempo de retención. Además, se utilizó el espectro de absorción de cada compuesto para corroborar el tiempo de retención de las señales en el cromatograma.

**Tabla 2.** Composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de los extractos de hoja de chía.

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	8	92
2	9	91
4	10,2	89,8
6	11,2	88,8
8	12,5	87,5
10	13,5	86,5
12	14,8	85,2
14	15,9	84,1
16	17	83
18	18,2	81,8
20	19,1	80,9
23	25	75
25	30	70
28	35	65
30	38	62
37	70	30
38	8	92

La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración para los compuestos confirmados.

#### 4.9 Análisis estadístico

Para evaluar la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos genotipos, tratamientos hídricos, ensayos y fechas de muestreo se aplicó ANOVA de una variable entre cada uno de estos parámetros, utilizando como criterio de discriminación un valor –  $p < 0,05$ . Para ello se utilizó el software Microsoft Excel 2016.

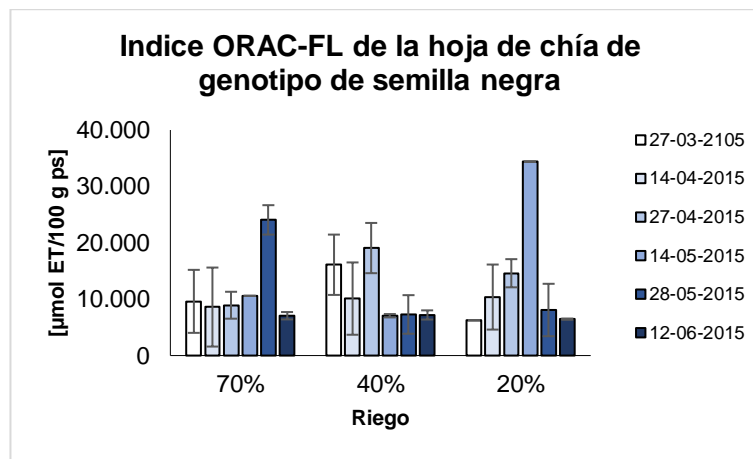
Adicionalmente se realizaron estudios de correlación de Pearson entre los distintos ensayos, genotipos y tratamientos con el software Microsoft Excel 2016.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Determinación de capacidad antioxidante

#### 5.1.1 Ensayo ORAC – FL

En primera instancia cabe destacar que todos los extractos de hojas de chíá evaluados presentaron capacidad antioxidante, esto era predecible, ya que la presencia de ciertos compuestos fenólicos que ya habían sido identificados en la semilla de chíá, en otros estudios previos, podrían estar presente en las diferentes partes de la planta (Marcinek & Krejpcio, 2017).



**Figura 15.** Valores ORAC-FL a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla negra.

En la figura 15 se presentan los resultados de capacidad antioxidante para el extracto de hoja de la planta de chíá con semilla negra. Para el riego de 70% fue  $24061 \pm 2609$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ], en la quinta fecha de muestreo, la cual presenta una diferencia estadísticamente significativa, con respecto a todas las demás fechas de muestreo. Para el cultivo con un 40% de riego fue  $19065 \pm 4456$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] en la tercera fecha de muestreo, que si bien, no se diferencia significativamente con los muestreos previamente obtenidos, sí lo hace con todas las muestras posteriores. Finalmente, en el caso del cultivo que recibió solo el 20% del riego óptimo, se observa un máximo de capacidad antioxidante en la cuarta fecha de muestreo, con una desviación prácticamente nula:  $34374 \pm 45$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ]. Todos los valores máximos obtenidos con los tres tipos de riego y los dos genotipos,

son comparables con la capacidad antioxidante de distintos berries, como arándanos  $26642 \pm 2257$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] o el maqui  $19850 \pm 966$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] (Speisky et al, 2012).

Además de los datos mencionados anteriormente, es importante destacar que la variabilidad de los datos dentro de las tres primeras fechas de muestreo fue mayor que en las tres últimas fechas, esto podría deberse a un periodo de adaptación de las plantas a sus condiciones de cultivo, donde la distribución de recursos (luz, agua, nutrientes) no era homogénea aún.

Por otro lado, se observa que, al acercarse la fecha de cosecha, la capacidad antioxidante disminuye en las hojas (teniendo como excepción el tratamiento de riego de 70%, que muestra un máximo de capacidad antioxidante en la penúltima fecha de muestreo), esto se debe a que la planta comienza su etapa de crecimiento reproductivo, enfocándose en la formación de flores y semillas y dejando de lado sus hojas. En la cuarta fecha de muestreo comienza el deshoje natural de la planta, siendo una observación relevante en el caso del desarrollo de cultivos con un doble propósito (obtención de semilla y hoja de chía). Bajo este criterio, el tratamiento ideal sería el de 20% de riego, puesto que su máximo (que además es el máximo para este genotipo) se encuentra en la cuarta fecha, permitiendo la recolección de las hojas sin un daño asociado a la planta que aún deberá madurar sus semillas.

**Tabla 3.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo ORAC – FL.

<b>RIEGO Y GENOTIPO NEGRO CONSTANTE FECHA</b>					
<b>VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,849	0,943	0,308	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>
<b>40</b>	0,257	0,120	<b>0,010</b>	0,916	0,968
<b>20</b>	0,280	0,311	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	0,577

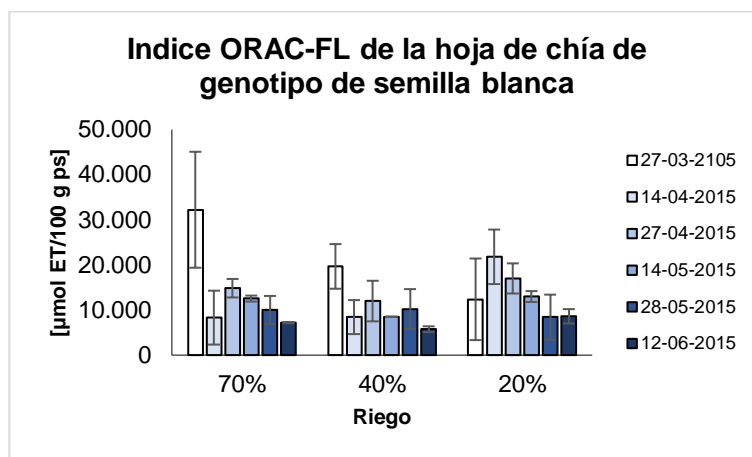
El análisis estadístico para cada tratamiento hídrico de los extractos de semilla negra muestra diferencias estadísticamente significativas principalmente entre la tercera y cuarta fecha de muestreo para el 40% y 20% de riego, y en el caso de

70% de riego, se observa diferencia estadísticamente significativa entre la cuarta y quinta fecha. Estas diferencias podrían, nuevamente, estar relacionadas con el cambio en la etapa de crecimiento de la planta, desde crecimiento vegetativo a reproductivo. Aparecen otros valores  $p < 0,05$  en los tratamientos de 70% y 20% de riego que dan cuenta de la pérdida de la capacidad antioxidante de las hojas, en el caso del riego de 70% puede ser más tardío que en el caso de 20% de riego, debido a que la primera no se vió sometida a estrés hídrico.

Respecto al comportamiento de cada tratamiento, frente a este ensayo, no se observa una correlación para el genotipo negro (tabla 4), esto puede explicarse debido a que los elementos de la composición de la planta que se están modificando en cada tratamiento no guardan una relación de proporcionalidad directa con el valor ORAC – FL obtenido.

**Tabla 4.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo ORAC – FL.

ORAC-FL	
Riego	r
<b>70-40</b>	-0,330
<b>70-20</b>	-0,107
<b>40-20</b>	-0,216



**Figura 16.** Valores ORAC-FL a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla blanca.

En relación a los valores obtenidos de los extractos de la hoja de las plantas de chía de semilla blanca, se puede mencionar que la capacidad antioxidante más elevada en las hojas de los cultivos es (figura 16), para el riego de 70%:  $32232 \pm 12663$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ], en la primera fecha de muestreo, la cual presenta una diferencia estadísticamente significativa con respecto a todas las demás fechas de muestreo. El valor mínimo para este riego fue en la segunda fecha de muestreo con un valor de  $8312 \pm 5953$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] sin mostrar diferencias significativas. Para el cultivo con un 40% de riego el valor más elevado fue  $19665 \pm 4867$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] en la primera fecha de muestreo y es significativamente diferente con los muestreos posteriores. El valor mínimo fue en la última fecha de muestreo con un valor de  $5747 \pm 296$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] sin exhibir diferencia significativa respecto al muestreo anterior. Finalmente, en el caso del cultivo que recibió solo el 20% se observa un máximo de capacidad antioxidante en la segunda fecha de muestreo con un valor de  $21791 \pm 5854$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] y un mínimo en la quinta fecha de muestreo con un valor de  $8418 \pm 4867$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] que no se distingue significativamente del muestreo anterior o posterior.

Al igual que en el genotipo negro, se observa una mayor variabilidad de los datos en las primeras fechas de muestreo que pueden deberse a la adaptación de los cultivos a las condiciones en las que se ven envueltos. En este caso, a diferencia del cultivo de chía negra, la capacidad antioxidante tiene su máximo en las dos



primeras fechas y luego decae al acercarse la fecha de cosecha de las semillas. Esto es una primera muestra del comportamiento distinto entre ambos genotipos frente a las mismas condiciones de cultivo.

Al igual que la planta de semilla negra, esta realiza su deshoje natural en la cuarta fecha de muestreo. Sin embargo, a diferencia del genotipo de semilla negra, no hay un máximo que permita definir una fecha de recolección de hojas entorno a esta fecha, como los máximos se presentan en las primeras fechas de muestreo se podría pensar que lo ideal es recolectar las hojas en dichas fechas, pero para ese momento la planta ha desarrollado muy pocas hojas e implicaría únicamente un daño para ellas. Así, bajo este ensayo, no es posible otorgar un doble propósito a la planta.

**Tabla 5.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo ORAC – FL.

<b>RIEGO Y GENOTIPO BLANCO CONSTANTE</b>					
<b>FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	<b>0,042</b>	0,145	0,124	0,228	0,185
<b>40</b>	<b>0,033</b>	0,333	0,232	0,524	0,142
<b>20</b>	0,198	0,284	0,114	0,187	0,952

El análisis estadístico (Tabla 5) muestra diferencias significativas únicamente para los tratamientos con 70% y 40% de riego entre las primeras dos fechas de muestreo. Este comportamiento, al igual que la evolución temporal de los valores ORAC – FL para este genotipo son difíciles de explicar, puesto que la planta sin estrés y con estrés moderado presentan un cambio, pero la planta con estrés severo no. Además, no coincide con el cambio de crecimiento vegetativo a reproductivo o deshoje natural de la planta. Cabe destacar que la característica de semilla blanca es recesiva frente a la semilla negra.

**Tabla 6.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo ORAC – FL.

ORAC-FL	
riegos	r
70-40	0,966
70-20	-0,043
40-20	0,028

En el análisis de correlaciones se puede observar que el comportamiento entre los tratamientos de 70% y 40% de riego son muy semejantes, esto podría implicar que, para este genotipo de la planta, el estrés de 40% de riego no es considerado una condición extrema de escases hídrica (posteriormente se podrá observar este comportamiento en otros ensayos).

**Tabla 7.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo ORAC – FL.

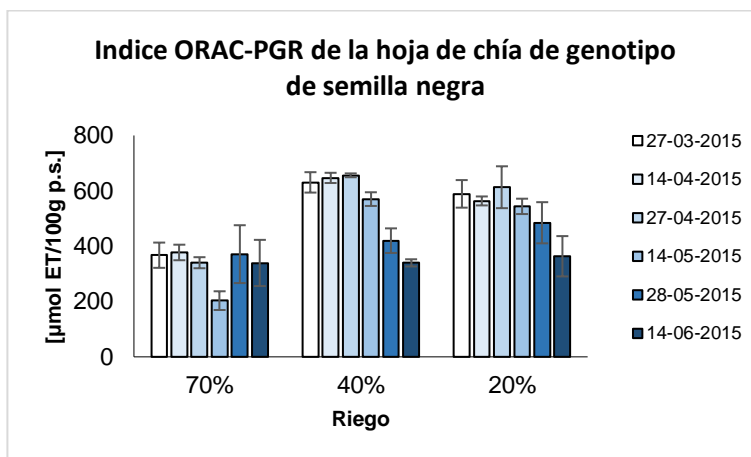
ORAC-FL	
riegos	r
70-70	-0,133
40-40	0,695
20-20	0,135

La respuesta medida con el ensayo de ORAC – FL para la aplicación de estrés hídrico no muestra una correlación entre los comportamientos de ambos genotipos. Solo en el caso de 40% de riego se podría considerar que existe una correlación débil, pero contradice las relaciones dentro de cada uno de los genotipos analizados previamente.

Habiendo expuesto todos estos resultados y análisis, si se desea utilizar esta planta con un doble propósito productivo (generación de semillas y hojas) lo ideal en estas condiciones es recolectar las hojas del genotipo de semilla negra en la quinta fecha de muestreo (un mes antes de la cosecha de la semilla) y regar con un 70% del agua evapotranspirada. Este análisis no incluye los efectos que tiene la aplicación de estrés hídrico sobre la producción de semillas. Por otro lado, si el único propósito es la producción de hojas, lo ideal es regar las plantas del genotipo negro con un 20% de riego y recolectar las hojas 5 meses y medio (cuarta fecha de muestreo) posterior a la siembra de estas. Las hojas de la planta de genotipo de semilla blanca

poseen propiedades útiles de igual forma para el propósito del estudio, sin embargo al ser el genotipo recesivo de la planta contempla una nueva dificultad, ya que puede mezclarse con el genotipo de semilla negra durante el proceso de cultivo.

### 5.1.2 Ensayo ORAC – PGR



**Figura 17.** Valores ORAC-PGR a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla negra.

Como se puede ver en la figura 17, para el caso del genotipo de semilla negra, los valores máximos se presentaron en la segunda fecha de muestreo para el cultivo con un nivel de riego de 70% con un valor de  $377 \pm 28$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ], en la tercera fecha de muestreo para los niveles de riego 40% y 20%, con valores de  $655 \pm 7$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] y  $612 \pm 75$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] respectivamente. Los valores mínimos se encontraron en la cuarta fecha para el cultivo con 70% de riego con un valor de  $203 \pm 33$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ], y en la última fecha de muestreo para los cultivos con 40% y 20% de riego, con los valores  $339 \pm 12$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] y  $363 \pm 72$  [ $\mu\text{mol ET}/100\text{g p.s.}$ ] respectivamente.

Una diferencia destacable en primera instancia respecto al ensayo ORAC – FL en este genotipo (y en los posteriores) es que la variabilidad de los datos es relativamente homogénea. Esto podría indicar, en conjunto con la información del ensayo ORAC – FL, que la planta trata de mantener una reactividad en su sistema antioxidante relativamente estable, sin importar la composición química exacta en

sus células. Esto se discutirá nuevamente más adelante al momento de informar la cantidad de polifenoles totales.

En relación a la utilización comercial de la hoja, se puede realizar la misma discusión respecto al deshoje natural de la planta, por lo tanto, lo ideal sería la recolección de las hojas desde la cuarta a la quinta fecha de muestreo en el tratamiento de 20% de riego, lo que implicaría, además, un mejor aprovechamiento de los recursos hídricos. En este análisis, nuevamente, no se está considerando la calidad y cantidad de la producción de la semilla.

**Tabla 8.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo ORAC – PGR.

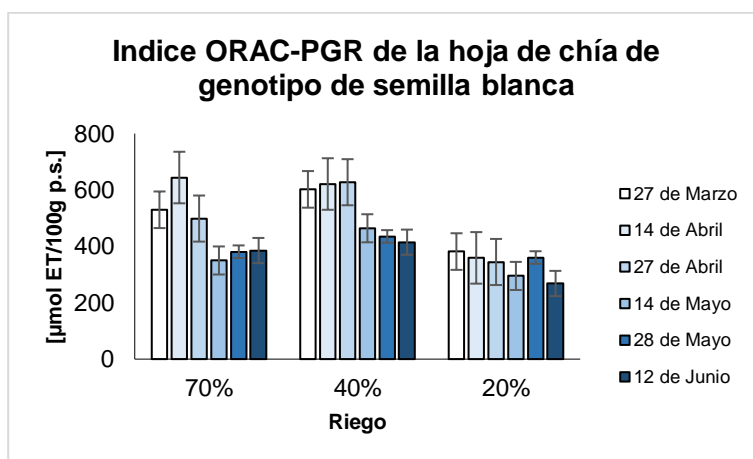
<b>RIEGO Y GENOTIPO NEGRO CONSTANTE FECHA</b>					
<b>VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,770	0,160	<b>0,005</b>	0,061	0,705
<b>40</b>	0,569	0,529	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,047</b>
<b>20</b>	0,487	0,350	0,225	0,280	0,118

La tabla 8 muestra los valores – p entre las distintas fechas del cultivo para las plantas de genotipo negro. Al igual que en el caso del ensayo ORAC – FL se observan diferencias significativas que podrían dar cuenta del cambio de etapa de crecimiento vegetativo a reproductivo en los tratamientos de 70% y 40% de riego. El tratamiento de 20% de riego no muestra diferencias significativas entre las distintas fechas, esto podría explicarse por la severidad del estrés aplicado, obligando a la planta a mantener una alta reactividad de su sistema antioxidante a lo largo de toda su vida.

**Tabla 9.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo ORAC – PGR.

ORAC-PGR	
riegos	r
70-40	-0,027
70-20	-0,015
40-20	0,956

Respecto a los comportamientos de las plantas de semilla negra frente a los distintos tratamientos hídricos, se puede observar en la tabla 9 una correlación muy fuerte entre el tratamiento de 40% y 20% de riego. Lo que implicaría que la planta de genotipo negro responde de manera semejante a un estrés moderado y severo.



**Figura 18.** Valores ORAC-PGR a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla blanca.

Como se puede leer en la figura 18 los valores máximos para el genotipo blanco en el tratamiento de 70% es  $644 \pm 147$  [µmol ET/100g p.s.] en la segunda fecha de muestreo, en el caso de 40% de riego el máximo es en la tercera fecha con un valor de  $627 \pm 47$  [µmol ET/100g p.s.] y para el tratamiento de 20% de riego su máximo se presentó en la primera fecha de muestreo con un valor de  $381 \pm 72$  [µmol ET/100g p.s.]. Los valores mínimos para el tratamiento de 70% de riego fue  $349 \pm 121$  [µmol ET/100g p.s.] en la cuarta fecha de muestreo, para el 40% de riego fue  $414 \pm 58$  [µmol ET/100g p.s.] en la última fecha de muestreo y para el 20% de riego fue de  $268 \pm 152$  [µmol ET/100g p.s.] en la última fecha de muestreo.

Estos datos muestran una variabilidad más alta en las primeras fechas de muestreo, como en el caso de ORAC – FL, pero no tan acentuadas como en dicho ensayo. Los valores de reactividad de las distintas plantas tienden a descender al acercarse la fecha de cosecha de las semillas, lo que implica que las condiciones óptimas para la recolección de hojas, con doble propósito, es en el tratamiento de 40% de riego, en la cuarta fecha de muestreo.

**Tabla 10.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo ORAC – PGR.

<b>RIEGO Y GENOTIPO BLANCO CONSTANTE</b>					
<b>FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,145	0,114	0,058	0,392	0,904
<b>40</b>	0,788	0,938	<b>0,048</b>	0,428	0,523
<b>20</b>	0,761	0,846	0,426	0,117	<b>0,038</b>

Respecto a los valores – p presentados en la tabla 10, se observa diferencia significativa entre la tercera y cuarta fecha de muestreo en el 40% de riego. Es importante observar que el valor para el riego de 70% es 0,058 y podría estar dando cuenta de una diferencia considerando que ese patrón se ha observado en los análisis anteriores. Esto coincide con el cambio de crecimiento vegetativo a reproductivo. Además, excepcionalmente en este análisis aparece una diferencia significativa entre las últimas dos fechas para el riego de 20%.

**Tabla 11.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo ORAC – PGR.

ORAC-PGR	
riegos	r
70-40	0,866
70-20	0,619
40-20	0,663

En la tabla 11, se puede observar que existe una correlación entre el comportamiento de las plantas sometidas a un tratamiento de 70% y 40% de riego, a diferencia con el caso de semilla negra, donde la correlación más fuerte es entre 40% y 20% de riego. Este comportamiento muestra otra diferencia entre los genotipos: la planta de semilla blanca estaría considerando el tratamiento de 40% menos severo de lo que lo considera la planta de semilla negra.

Finalmente, respecto a las condiciones ideales de recolección de hojas según el ensayo ORAC – PGR son tercera fecha de muestreo, en ambos genotipos a las plantas tratadas con un 40% de riego. En términos de estabilidad y reproducibilidad del cultivo, es recomendable elegir el genotipo de semilla negra, debido a que se mantendrá, pese a posibles cruza no controladas con otras plantas de chíá.

**Tabla 12.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo ORAC – PGR.

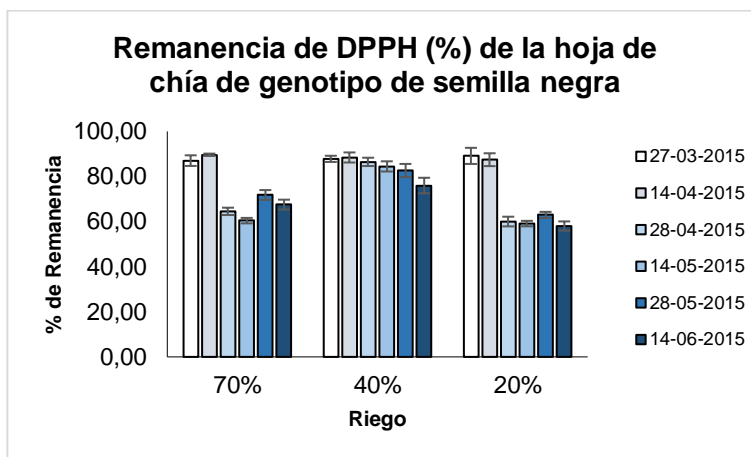
ORAC-PGR	
riegos	R
70-70	0,582
40-40	0,908
20-20	0,693

En la tabla 10 se pueden observar las correlaciones entre los distintos genotipos, mostrando, que si bien son valores más elevados que en ORAC – FL, solo la correlación en el tratamiento de 40% es fuerte entre los genotipos. Esto, al igual que en el caso de ORAC – FL es difícil de explicar considerando las correlaciones dentro de cada genotipo, por las relaciones individuales de los tratamientos de 40% con el tratamiento de 70% (en planta de semilla blanca) y con 20% (en planta de semilla

negra). Sin embargo, es otra muestra de la diferencia de comportamiento entre los distintos genotipos.

### 5.1.3 Ensayo DPPH

Los resultados para este ensayo están presentados en forma de porcentaje de remanencia del radical DPPH, es decir que, a mayor porcentaje de remanencia, menor es la capacidad antioxidante.



**Figura 19.** Porcentaje de remanencia del radical DPPH a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla negra.

En la figura 19 se presentan los resultados para los extractos de hoja de la planta de semilla negra. En la gráfica es posible observar que para los riegos de 70% y 20% el porcentaje de remanencia es elevado en las dos primeras fechas de muestreo, mientras que en el tratamiento con riego de 40% el porcentaje prácticamente no varía.

El valor mínimo de porcentaje de remanencia (máximo en capacidad antioxidante) en el tratamiento con 70% de riego es  $60\% \pm 1\%$  en la cuarta fecha de muestreo, para el tratamiento de 40% de riego es de  $76\% \pm 3\%$  en la última fecha de muestreo y para el tratamiento de 20% de riego es de  $58\% \pm 2\%$  también, en la última fecha de muestreo. El valor máximo de porcentaje de remanencia para el tratamiento de 70% de riego es  $90\% \pm 2\%$  en la segunda fecha de muestreo, para el tratamiento de 40% de riego es  $88\% \pm 2\%$  en la segunda fecha de muestreo y para el caso del tratamiento de 20% de riego es  $89\% \pm 4\%$  en la primera fecha de muestreo.



En este ensayo se observa una baja capacidad antioxidante, cabe destacar que no se realizó dilución de los extractos de hoja de chíá y estos no alcanzaron al 50% de inhibición del radical. Además, existe una baja dispersión de los datos en comparación a los ensayos anteriormente expuestos. Todo esto, podría estar relacionado con el medio de reacción, ya que en los ensayos ORAC – FL y ORAC – PGR se utilizó un buffer a pH = 7.4, en este caso se utilizó metanol, impidiendo o disminuyendo el aporte de una gran diversidad de compuestos presentes en el extracto, dando así una respuesta más homogénea.

Sin embargo, las etapas con mayor capacidad antioxidante (menor remanencia) se presentan entorno a la cuarta fecha de muestreo, lo que coincide con la fecha de deshoje natural de la planta (esto en los tratamientos de 70% y 20%), lo que haría favorable la recolección de éstas sin generar daños a la planta o afectar la producción de semillas.

**Tabla 13.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo DPPH.

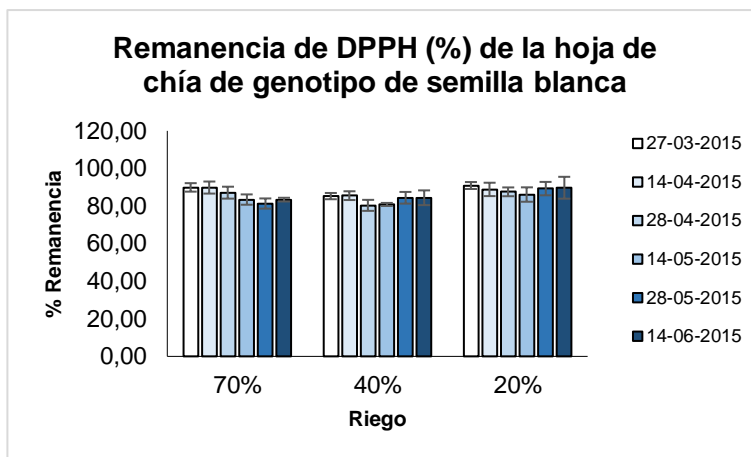
<b>RIEGO Y GENOTIPO NEGRO CONSTANTE FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,134	<b>0,000</b>	0,072	<b>0,001</b>	0,327
<b>40</b>	0,873	0,779	0,883	0,939	0,425
<b>20</b>	0,744	<b>0,000</b>	0,659	<b>0,035</b>	<b>0,048</b>

En la tabla 13 se presentan las etapas donde se observan diferencias significativas en los tratamientos de 70% y 20% de riego entre la segunda y tercera fechas de muestreo y entre la cuarta y quinta fecha. Para el tratamiento de 40% no se presentan diferencias entre las fechas. Las diferencias significativas entre la segunda y tercera fecha de muestreo coinciden con la aparición de compuestos antioxidantes que pueden responder en metanol. Sin embargo, las diferencias presentes entre las últimas fechas de muestreo indican que hay un aumento en la capacidad antioxidante en la última fecha de muestreo, lo que permitiría aplazar la recolección de hojas hasta el último momento.

**Tabla 14.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo DPPH.

DPPH	
riegos	r
70-40	0,496
70-20	0,933
40-20	0,671

Los valores del coeficiente de correlación de Pearson muestran una correlación entre el tratamiento de 70% y 20% de riego. Esto se debe a la evolución temporal del porcentaje de remanencia y coincide además con el comportamiento de las diferencias significativas entre estos mismos tratamientos. Sin embargo, esta relación entre los tratamientos extremos no se repite nuevamente en los otros ensayos. Con la información recopilada en este trabajo de investigación, solo se abre la posibilidad a que esto sea causado por el cambio de medio de acuoso a metanólico, ya que es el único ensayo que no se desarrolla en agua.



**Figura 20.** Porcentaje de remanencia del radical DPPH a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla blanca.

En la figura 20 se observa un comportamiento semejante entre todos los tratamientos aplicados. Además de valores de remanencia relativamente altos respecto al genotipo de semilla negra. Esto arroja a primera vista, un comportamiento totalmente distinto entre ambos genotipos (lo que se mencionará más adelante en la correlación entre genotipos).

En términos de valores específicos, los valores mínimos de porcentaje de remanencia (máximos de capacidad antioxidante) para cada tratamiento hídrico son para el riego de 70%:  $81\% \pm 2\%$  en la quinta fecha de muestreo, para el riego de 40% es  $80\% \pm 3\%$  en la tercera fecha de muestreo y para el riego de 20%:  $86\% \pm 4\%$  en la cuarta fecha de muestreo.

Los valores máximos de porcentaje de remanencia (mínimos de capacidad antioxidante) para cada tratamiento hídrico son para el riego de 70%:  $90\% \pm 2\%$  en la primera fecha de muestreo. En el caso de riego de 40%:  $86\% \pm 2\%$  en la segunda fecha de muestreo y para el 20% de riego:  $91\% \pm 2\%$  en la primera fecha de muestreo.

Los porcentajes de remanencia mínimos son muy semejantes entre ellos (y no presentan diferencias significativas entre ellos), por lo tanto, no es posible definir una fecha idónea para realizar la recolección de hojas. En términos netamente numéricos la recolección podría realizarse en cualquiera de las fechas estudiadas.

Sin embargo, hay que mantener presente la condición de deshoje natural, en donde la producción de hoja está en su punto máximo y la pérdida de estas no afectará la producción de semillas.

**Tabla 15.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo DPPH.

<b>RIEGO Y GENOTIPO BLANCO CONSTANTE</b>					
<b>FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,941	0,855	0,902	0,763	0,260
<b>40</b>	0,884	0,360	0,432	0,057	0,968
<b>20</b>	0,736	0,892	0,928	0,877	0,679

En la tabla 15 se observa que no hay diferencias significativas entre las distintas fechas, por lo tanto, como se mencionó en el párrafo anterior, no se puede extraer información útil para definir una fecha de recolección de hojas.

**Tabla 16.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo DPPH.

<b>DPPH</b>	
<b>riegos</b>	<b>r</b>
<b>70-40</b>	0,284
<b>70-20</b>	0,302
<b>40-20</b>	0,841

En la tabla 16 se entregan los resultados de correlación para los distintos tratamientos a los que fueron sometidas las plantas de semilla blanca. De ello se puede observar que solo aparece una correlación fuerte entre los tratamientos de 40% y 20%, esto se diferencia con el ensayo de ORAC – PGR donde la correlación más fuerte se da entre los tratamientos de 70% y 40%. Esto podría explicarse debido a la escasa respuesta que presentaron los extractos en el ensayo, más que por un patrón en la composición química de la planta.

**Tabla 17.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo DPPH.

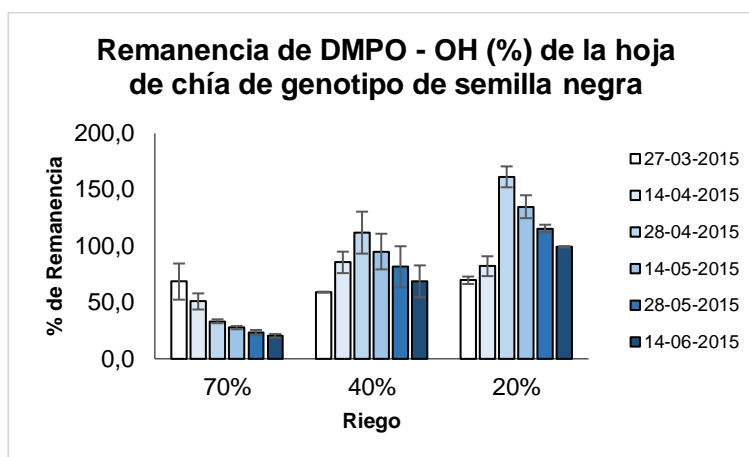
DPPH	
riegos	r
70-70	0,655
40-40	-0,030
20-20	0,549

En la tabla 17 se entregan los valores de correlación entre los distintos genotipos frente al mismo tratamiento hídrico, y se confirma que no hay una similitud en el comportamiento entre los distintos genotipos, al igual que en los ensayos anteriores.

Finalmente, bajo este ensayo, las condiciones óptimas para la producción de hojas y semillas sería en la cuarta fecha del 20% de riego en el genotipo de semilla negra. Sin embargo, este ensayo es poco concluyente al compararlo con los otros ensayos.

### 5.1.4 Ensayo de inhibición del radical hidroxilo

Los resultados de este ensayo fueron expresados en porcentaje de remanencia del radical hidroxilo, por lo tanto, al igual que en el ensayo de DPPH los resultados de remanencia son inversamente proporcionales a los de capacidad antioxidante.



**Figura 21.** Porcentaje de remanencia del radical hidroxilo frente a los extractos de hoja de chí.

En la figura 21 se presentan los resultados de inhibición del radical hidroxilo para los extractos de hoja de genotipo de semilla negra. En ella se puede observar que el comportamiento de las plantas con un riego del 70% es completamente distinto al de los otros tratamientos. La remanencia del radical libre con este porcentaje de riego disminuye constantemente hasta la última fecha de muestreo. En el caso de atamientos de 40% y 20% de riego la remanencia disminuye en las primeras fechas de muestreo, sin embargo, aumenta y sobrepasa el 100% en las fechas posteriores. En términos de valores específicos, los valores mínimos de remanencia (máxima capacidad antioxidante) frente al radical hidroxilo son: para el 70% de riego  $20,4 \pm 2\%$  en la última fecha de muestreo, para el 40% de riego es  $59,2 \pm 1\%$  en la primera fecha de muestreo y para el 20% de riego es  $69,7 \pm 4\%$  en la primera fecha de muestreo. Los valores máximos de remanencia (menor capacidad antioxidante) frente al radical hidroxilo son: para el 70% de riego  $68,5 \pm 16\%$  en la primera fecha de muestreo, para el 40% de riego es  $111,9 \pm 19\%$  en la tercera fecha de muestreo y para el 20% de riego es  $161,4 \pm 10\%$  en la tercera fecha de muestreo.

En este ensayo la variabilidad de los datos se mantiene relativamente constante a lo largo del crecimiento de las plantas. Lo que sí es destacable es el aumento en la producción de radical hidroxilo frente a las plantas en la etapa de cambio de crecimiento vegetativo a reproductivo y que prácticamente no vuelve a bajar. Esto se discutirá y comparará con otros extractos de origen genetal luego de exponer los resultados del genotipo de semilla blanca.

**Tabla 18.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo EPR.

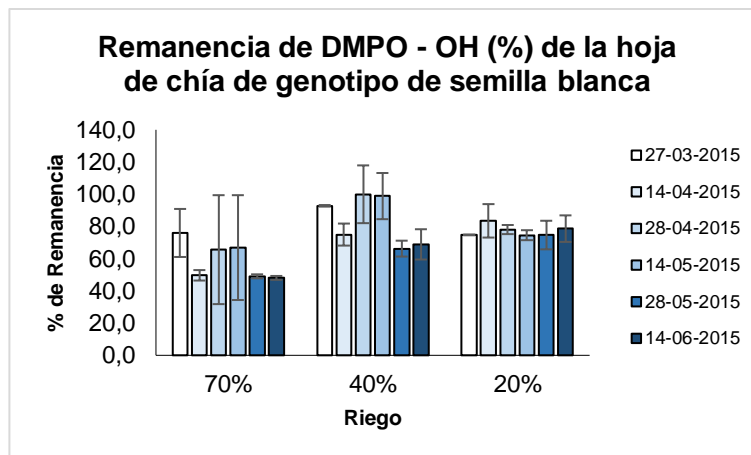
<b>RIEGO Y GENOTIPO NEGRO CONSTANTE FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,167	<b>0,017</b>	<b>0,036</b>	0,113	0,238
<b>40</b>	<b>0,011</b>	0,104	0,314	0,399	0,392
<b>20</b>	<b>0,097</b>	<b>0,001</b>	<b>0,034</b>	<b>0,042</b>	<b>0,003</b>

En la tabla 18 se pueden observar los valores p entre las distintas fechas de muestreo. Aquí, a diferencia de los ensayos anteriormente expuestos, se observa que hay mayor número de diferencias significativas en la evolución de los datos. En el caso del tratamiento de 70% pueden tener una explicación en la adaptación y cambio de etapa de crecimiento en la planta, el cambio en los valores. Por otro lado, en el tratamiento de 40% se observa diferencia en los datos entre la primera y segunda fecha, pero no posteriormente, pudiendo ser muy preponderante el efecto de las especies que están generando más radical hidroxilo. Por último, En el caso del tratamiento de 20% se observa que en cada fecha de muestreo el resultado es estadísticamente distinto. Esto, sin embargo, no nos otorga información relevante para discernir entre las fechas de muestreo, para seleccionar un momento preciso para la recolección de las hojas.

**Tabla 19.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo EPR.

EPR	
riegos	r
70-40	-0,389
70-20	-0,622
40-20	0,883

En la tabla 19 se presentan los resultados de las correlaciones entre los distintos tratamientos para las plantas del genotipo negro. Se observa, al igual que en ensayos como ORAC – PGR que la correlación entre el tratamiento de 40% y 20% es elevada, lo que estaría confirmando que este genotipo de planta tiene un comportamiento similar para ambos niveles de estrés (considerando al 40% de riego un estrés severo como el de 20%).



**Figura 22.** Porcentaje de remanencia del radical hidroxilo frente a los extractos de hoja de chíá.

En la figura 22 se presentan los resultados de remanencia del radical hidroxilo, a simple vista se puede observar una similitud en el comportamiento de las plantas sometidas a un 70% y 40% de riego, por su variación a lo largo del tiempo, a diferencia del tratamiento de 20% donde la remanencia del radical es bastante estable. Esto se discutirá en los siguientes puntos de correlación y diferencias estadísticamente significativas entre las distintas fechas de muestreo.



Los valores específicos para este genotipo son, en el caso de remanencia mínima (mayor capacidad antioxidante) el tratamiento de 70% presenta un valor de  $48,1 \pm 1\%$  en la quinta fecha de muestreo, el caso de 40% presenta valores de  $66,2 \pm 5\%$ , también en la quinta fecha de muestreo y para el caso de 20% de riego el valor es de  $74,6 \pm 3\%$  en la cuarta fecha de muestreo. Los valores máximos de remanencia (mínimos de capacidad antioxidante) para el tratamiento de 70% son  $76 \pm 15\%$  en la primera fecha de muestreo, para el riego de 40% son de  $100\% \pm 18\%$  en la tercera fecha de muestreo y para el tratamiento de 20% son de  $83,5 \pm 11\%$  en la segunda fecha de muestreo.

**Tabla 20.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo EPR.

<b>RIEGO Y GENOTIPO BLANCO CONSTANTE</b>					
<b>FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	<b>0,044</b>	0,465	0,964	0,392	0,531
<b>40</b>	<b>0,016</b>	0,094	0,933	<b>0,022</b>	0,695
<b>20</b>	0,235	0,455	0,245	0,987	0,632

En la tabla 20 se presentan los valores – p entre las distintas fechas de muestreo. Aquí se puede observar que los tratamientos solo muestran diferencias entre la primera y segunda fecha de muestreo (en tratamiento de 70% y 40%) y además una diferencia entre la cuarta y quinta fecha de muestreo para el tratamiento de 40%, en el caso de 20% de riego no se aprecian diferencias significativas entre las distintas fechas de muestreo. Esto es un comportamiento totalmente opuesto al del genotipo de semilla blanca, donde en el caso de 20% se observaban diferencias significativas entre todas las fechas.

**Tabla 21.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo EPR.

<b>EPR</b>	
<b>riegos</b>	<b>r</b>
<b>70-40</b>	0,880
<b>70-20</b>	-0,511
<b>40-20</b>	-0,294

En la tabla 21 se presentan las correlaciones entre los distintos tratamientos para este genotipo, y se puede apreciar, al igual que en ensayos anteriores, existe una similitud en el tratamiento de 70% y 40% de riego, a diferencia del genotipo de semilla negra, donde la similitud se presenta entre 40% y 20% de riego. Esto muestra nuevamente, una diferencia entre los genotipos en su forma de enfrentar la escasez hídrica.

**Tabla 22.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo EPR.

EPR	
riegos	r
70-70	0,565
40-40	0,452
20-20	-0,205

En la tabla 22 se puede constatar que no hay un comportamiento similar entre los dos genotipos al verse sometidos a los mismos niveles de riego. Esta es una tendencia común en todos los ensayos analizados hasta el momento.

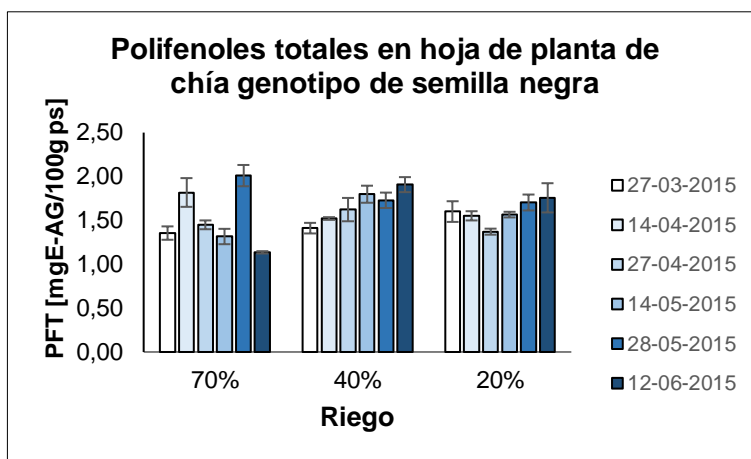
En relación a los resultados que superan el 100% de remanencia, es decir, que están formando más molécula de radical hidroxilo, podría explicarse debido a la presencia de metales de transición redox – activos como en otras matrices de origen vegetal. Para el vino, un macerado hidroalcohólico de origen vegetal, existen mecanismos de reacción propuestos que implican la formación de este y otros radicales libres en el sistema, que se ven afectados, entre otras cosas por la concentración de estos metales de transición (Ryan, Mogens, Leif, & Waterhouse, 2009).

Finalmente, si se desea recolectar la hoja de la planta por sus capacidades de inhibir la presencia del radical hidroxilo, este proceso debería efectuarse en la última fecha de muestreo (al momento de la cosecha de la semilla) en el genotipo negro con un 70% de riego. Por lo tanto, las condiciones óptimas dadas por este ensayo, son las de cultivo más común en la actualidad: el cultivo sin aplicación de estrés hídrico a

la planta de semilla negra, en la fecha de cosecha de la semilla. Por ende, este ensayo entrega información valiosa en términos de asignarle una propiedad importante (frente a uno de los radicales más reactivos en el metabolismo celular) a uno de los desechos mayoritarios de la producción de semilla de chía.

## 5.2 Determinación de polifenoles totales y perfil polifenólico

### 5.2.1 Ensayo de Folin – Ciocalteau



**Figura 23.** Polifenoles totales a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla negra.

En la figura 23 se entregan los resultados para el ensayo de Folin – Ciocalteau para los extractos de hoja de la planta de semilla negra, en ella se puede observar que los resultados para los tratamientos se encuentran en los mismos rangos. En particular en el tratamiento de 40% y 20% de riego se puede apreciar un aumento de la concentración de polifenoles hacia el final de la vida de la planta. Y en el caso del tratamiento de un 70% de riego se observa que el máximo se presenta en la quinta fecha de muestreo. Todos estos datos, permiten discernir a simple vista que la recolección de hojas es ideal al momento del deshoje natural de la planta, sin afectar su crecimiento o producción de semillas.

En relación a los valores específicos del ensayo, la mayor cantidad de polifenoles presentes para el tratamiento de 70% de riego fue  $2,01 \pm 0,12$  [mg EAG/100 g ps] en la quinta fecha de muestreo, para el tratamiento de 40% de riego fue  $1,91 \pm 0,09$  [mg EAG/100 g ps] en la última fecha de muestreo y en el tratamiento de 20% de riego fue  $1,76 \pm 0,17$  [mg EAG/100 g ps] también en la última fecha de muestreo.

Los valores mínimos para el riego de 70% fue  $1,14 \pm 0,02$  [mg EAG/100 g ps] en la última fecha de muestreo, en el caso de 40% de riego fue de  $1,41 \pm 0,07$  [mg

EAG/100 g ps] en la primera fecha de muestreo y en el caso de 20% de riego fue  $1,37 \pm 0,04$  [mg EAG/100 g ps] en la tercera fecha de muestreo.

Estos valores de contenido de polifenoles totales son relativamente bajos si se comparan con hortalizas medidas por el Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA) en su base de datos online donde, por ejemplo, las hojas de acelga fresca seca, presentan valores de 1513 [mg EAG/100 g ps], el apio presenta valores de 2320 [mg EAG/100 g ps], la lechuga costina 486 [mg EAG/100 g ps]. Sin embargo, pese a ser mil veces más bajos los resultados para este ensayo, los resultados en ORAC – FL en la misma base de datos son del mismo orden de magnitud a los presentados por la chíá; la acelga presenta un valor de 32650 [ $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g ps}$ ] el apio presenta 5800 [ $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g ps}$ ], y la lechuga un valor de 10286 [ $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g ps}$ ] (Speisky et al, 2012). A modo de ejemplo, uno de los valores más elevados de ORAC – FL para la chíá negra es 34374 [ $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g ps}$ ].

**Tabla 23.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo Folin - Ciocalteau.

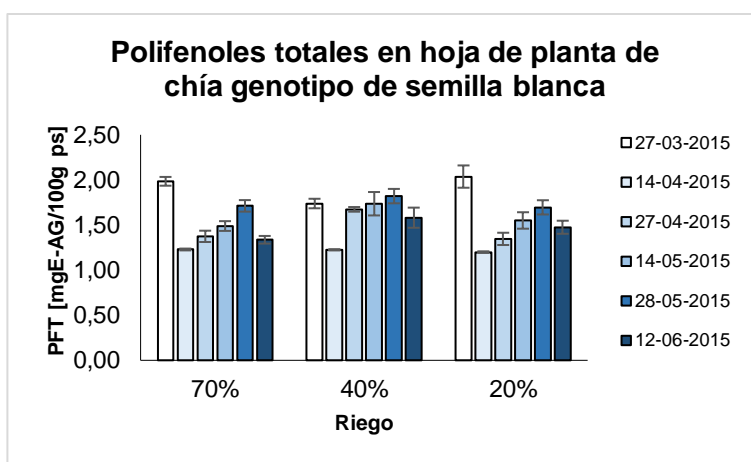
<b>RIEGO Y GENOTIPO NEGRO CONSTANTE FECHA</b>					
<b>VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,167	<b>0,017</b>	<b>0,036</b>	0,113	0,238
<b>40</b>	<b>0,011</b>	0,104	0,314	0,399	0,392
<b>20</b>	0,097	<b>0,001</b>	<b>0,034</b>	<b>0,042</b>	<b>0,003</b>

En la tabla 23 se muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la segunda y tercera fecha y tercera y cuarta fechas de muestro en el tratamiento de 70% de riego. Esta última diferencia marca el paso del crecimiento vegetativo a reproductivo, sin embargo, no se presentan diferencias que den cuenta de este paso en el tratamiento de 40% de riego, y en el caso del tratamiento de 20% de riego aparecen diferencias en entre prácticamente todas las fechas de muestreo.

**Tabla 24.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo Folin – Ciocalteau.

FOLIN-C	
riegos	r
70-40	-0,279
70-20	-0,022
40-20	0,474

En la tabla 24 se presentan las correlaciones entre los distintos tratamientos, y a diferencia de en los ensayos de capacidad antioxidante, no se observa un comportamiento semejante entre los tratamientos. Esto podría explicarse debido a que la cantidad de polifenoles no es directamente proporcional a la reactividad del sistema (lo que informa el ensayo ORAC – PGR).



**Figura 24.** Polifenoles totales a través del tiempo para la hoja de la planta de semilla blanca.

En la figura 24 se observan los resultados del ensayo Folin – Ciocalteau para los extractos de las plantas de semilla blanca. Se puede apreciar, primeramente, que el comportamiento de la planta a lo largo del tiempo es semejante entre los distintos tratamientos, con un valor elevado en la primera fecha, luego un descenso y un nuevo aumento. Esto podrá ser evidenciado con los valores del coeficiente de correlación.

Los valores específicos son: para el máximo en 70% de riego  $1,98 \pm 0,06$  [mg EAG/100 g ps] en la primera fecha de muestreo, para el 40% de riego  $1,82 \pm 0,09$

[mg EAG/100 g ps] y para el tratamiento de 20% de riego  $2,04 \pm 0,13$  [mg EAG/100 g ps] en la primera fecha de muestreo.

El valor mínimo para el tratamiento de 70% de riego es  $1,23 \pm 0,02$  [mg EAG/100 g ps] en la segunda fecha de muestro, en el caso de 40% de riego es de  $1,23 \pm 0,02$  [mg EAG/100 g ps] también en la segunda fecha de muestro y  $1,2 \pm 0,02$   $1,23 \pm 0,02$  [mg EAG/100 g ps] en la segunda fecha de muestreo.

Esta información, con los valores máximos y mínimos no entregan una información suficiente para la recolección de las hojas, pues al presentarse ambas en las primeras dos fechas de muestro, no se habría producido suficiente biomasa que recolectar. Pese a ello, se presenta un segundo valor máximo en la quinta fecha de muestreo para todos los tratamientos, lo que permitiría recolectar una gran cantidad de materia vegetal sin afectar la producción de semillas y el crecimiento de la planta.

**Tabla 25.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo Folin – Ciocalteau.

<b>RIEGO Y GENOTIPO BLANCO CONSTANTE</b>					
<b>FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	<b>0,000</b>	<b>0,035</b>	0,099	<b>0,017</b>	<b>0,002</b>
<b>40</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,430	0,433	<b>0,049</b>
<b>20</b>	<b>0,000</b>	<b>0,028</b>	<b>0,046</b>	0,120	<b>0,035</b>

En la tabla 25 se muestran los valores – p que dan cuenta de las diferencias significativas entre las distintas fechas de muestreo. Es común para los tres tratamientos la presencia de diferencias entre las tres primeras fechas y entre las dos últimas. En el caso de 70% de riego, en particular, se presenta otra diferencia estadísticamente significativa entre la cuarta y quinta fecha, y en el tratamiento de 20% aparece entre la tercera y cuarta fecha de muestreo una nueva diferencia. Esta información permite afirmar que es relevante seleccionar de manera precisa la fecha en que cosechar las hojas, puesto que en el caso del 70% de riego, la quinta fecha de muestro queda como un máximo específico, en el 20% de riego el máximo es

indistinto entre la cuarta y quinta fecha y en el tratamiento de 40% de riego, sería indistinto entre la tercera y quinta fecha de muestreo.

**Tabla 26.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo Folin - Ciocalteau.

FOLIN-C	
riegos	r
70-40	0,686
70-20	0,975
40-20	0,702

En la tabla 26 se presentan las correlaciones entre los distintos tratamientos, y si bien, todos los valores son más elevados que en los otros ensayos, destaca la relación que existe entre el 70% de riego y el 20% de riego. Siendo prácticamente lineal. Esto podría ser un factor a considerar si el propósito fuese el de conseguir hojas con alto contenido fenólico, ya que podría suponer un ahorro hídrico y los valores de Polifenoles Totales son bastante similares.

Teniendo en cuenta toda esta información, lo ideal sería la recolección de las hojas en la quinta fecha de muestreo, con un tratamiento de 40% de riego.

**Tabla 27.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo Folin – Ciocalteau.

FOLIN-C	
riegos	r
70-70	0,028
40-40	0,220
20-20	0,340

En la tabla 27 se presentan las correlaciones entre los dos genotipos frente al mismo nivel de riego. Se puede observar claramente, que su comportamiento es distinto, siendo nulo en el crecimiento de las plantas sin estrés. Dando cuenta, al igual que en los otros ensayos, que los genotipos se comportan de manera distinta.

Finalmente, las condiciones ideales de cosecha de las hojas, tomando en cuenta todos los resultados obtenidos y situaciones discutidas, son en la quinta fecha de



muestreo, en el genotipo negro con un tratamiento de 70% de riego. Esto es por la estabilidad en la reproducción de la planta de semilla negra, su valor superior en este ensayo, la cantidad de biomasa generada, el cuidado de la planta y la producción de semillas.

## 5.2.2 Perfil polifenólico

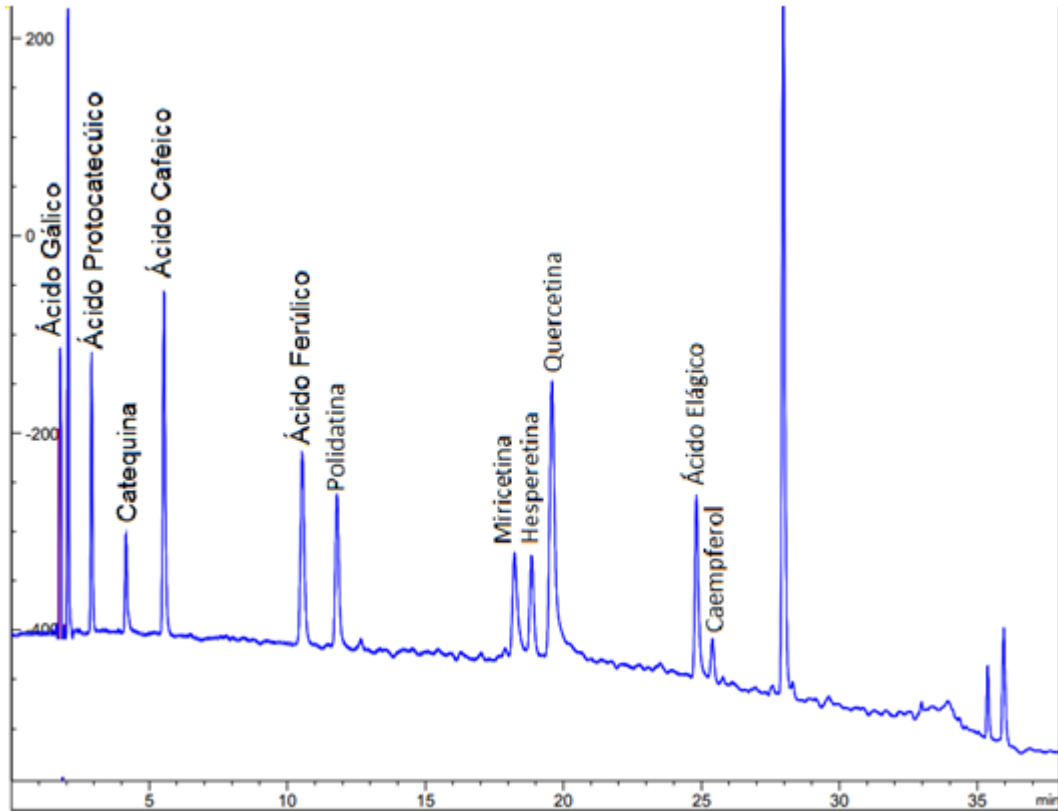
### 5.2.2.1 Perfil polifenólico

En la determinación de la presencia y cuantificación de compuestos fenólicos se utilizaron los estándares enlistados en la tabla 28: ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, polidatina, miricetina, hesperetina, quercetina, ácido elágico, caempferol. Estos compuestos fueron seleccionados por su presencia en la semilla (Marcinek et al, 2017).

**Tabla 28.** Compuestos estudiados con sus tiempos de retención y longitud de onda máximos.

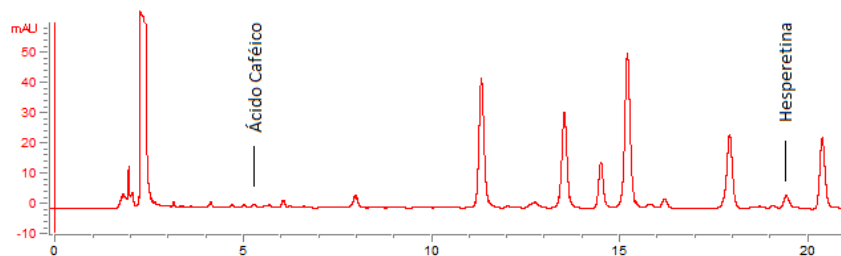
Compuesto	t <sub>R</sub>	λ <sub>máx</sub>
Ácido Gálico	1,9	272
Ácido Protocatecuico	2,8	260
Catequina	4,1	278
Ácido Cafeico	5,5	322
Ácido Ferúlico	10,6	322
Polidatina	12,1	318
Miricetina	18,2	371
Hesperetina	18,6	284
Quercetina	24,6	370
Ácido Elágico	24,2	364
Camferol	25,9	366

Para determinar la presencia de los compuestos en los extractos se utilizaron los tiempos de retención y se confirmaron con el espectro ultra violeta de los mismos. De ellos se pudo corroborar la presencia de dos compuestos: ácido cafeico y hesperetina, de los que su cuantificación y evolución temporal se expondrá más adelante. Una posible explicación a no determinar los otros compuestos estudiados, y que es común también en las especies vegetales, es que este tipo de compuestos se encuentren enlazados a moléculas de azúcares que les permitan una mayor movilidad dentro de la planta o almacenar estos compuestos en formas menos reactivas para su uso en momentos de estrés (Wan et al, 2011) (Ferrerres et al, 2005).



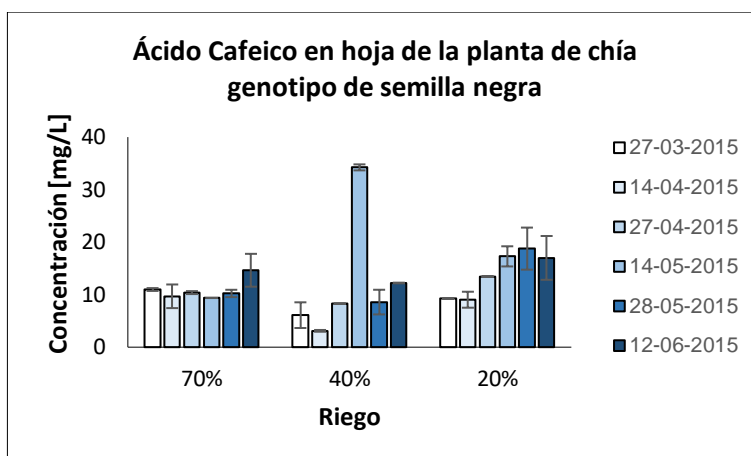
**Figura 25.** Cromatograma de los distintos polifenoles estudiados dentro del extracto.

En la figura 25 se presenta el cromatograma con la mezcla de los distintos estándares utilizados y en la figura 26 el cromatograma de uno de los extractos, en ella se pueden observar la distribución de los distintos compuestos, los que muestran una buena resolución en su identificación a 280 nm.



**Figura 26.** Cromatograma del extracto de hoja de chíá negra, en la primera fecha con 70% de riego.

### 5.2.2.1 Ácido cafeico



**Figura 27.** Concentración de ácido cafeico a través del tiempo en el extracto de hoja de la planta de semilla negra.

La concentración de ácido cafeico en los distintos extractos de hojas de plantas de semilla negra se presenta en la figura 27, de ella se puede observar que los tratamientos presentaron distintas evoluciones temporales en las concentraciones de este compuesto. Manteniéndose estable la concentración en el tratamiento de 70% de riego y tendiendo a aumentar hacia el final de la vida de la planta en el tratamiento de 40% y 20% de riego.

Los valores máximos para el tratamiento de 70% de riego es  $14,6 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$  en la última fecha de muestreo, en el tratamiento de 40% de riego es  $34,2 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  en la última fecha de muestreo y en el tratamiento de 20% de riego es  $18,8 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$  en la quinta fecha de muestreo. Respecto a los valores mínimos, para el tratamiento de 70% de riego es  $9,4 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$  en la cuarta fecha de muestreo, para el tratamiento de 40% de riego es  $3,1 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  en la segunda fecha de muestreo y para el tratamiento de 20% de riego es  $9,0 \pm 1,6 \text{ mg L}^{-1}$  en la segunda fecha de muestreo.

Si el propósito de este estudio es la recolección de hojas con la mayor concentración de ácido cafeico, las condiciones óptimas para ello son el riego de 40% en la última

fecha de muestreo. Sin embargo, bajo el análisis estadístico (Tabla 29), sería indistinta la recolección entre la penúltima y última fecha de muestreo.

**Tabla 29.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico.

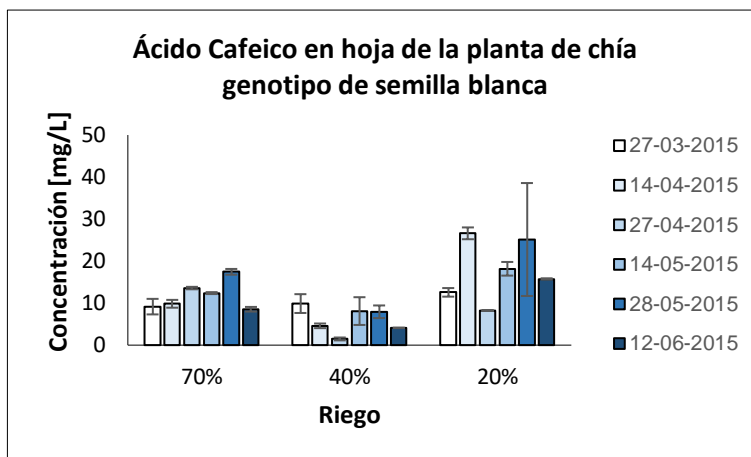
<b>RIEGO Y GENOTIPO NEGRO CONSTANTE FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,397	0,632	<b>0,009</b>	0,127	<b>0,079</b>
<b>40</b>	0,102	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,057
<b>20</b>	0,825	<b>0,009</b>	<b>0,033</b>	0,608	0,632

En la tabla 29 se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre la tercera y cuarta fecha de muestreo para los tres tratamientos de riego, lo que coincide con el cambio de crecimiento, sin embargo, también existen diferencias significativas en torno a las otras fechas estudiadas. Este comportamiento puede ser causado por las vías complejas de síntesis de compuestos fenólicos, dependiendo de las condiciones de cultivo de las plantas y sus condiciones particulares.

**Tabla 30.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico.

<b>Ácido cafeico</b>	
<b>riegos</b>	<b>r</b>
<b>70-40</b>	-0,175
<b>70-20</b>	0,217
<b>40-20</b>	0,552

En la tabla 30 se observan las correlaciones entre los distintos tratamientos para los extractos de genotipo negro. Como se mencionó en el primer párrafo de esta sección, no se observan concentraciones del compuesto de interés, esto puede deberse, como se mencionó anteriormente a la complejidad de las rutas metabólicas en las que está implicado el ácido caféico.



**Figura 28.** Concentración de ácido cafeico a través del tiempo en el extracto de hoja de la planta de semilla blanca.

La concentración de ácido cafeico en los distintos extractos de hojas de plantas de semilla blanca se presenta en la figura 28, de ella se puede observar que los tratamientos presentaron distintas evoluciones temporales en las concentraciones de este compuesto al igual que en el genotipo negro.

Los valores máximos para el tratamiento de 70% de riego es  $17,4 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$  en la quinta fecha de muestreo, en el tratamiento de 40% de riego es  $9,9 \pm 2,4 \text{ mg L}^{-1}$  en la primera fecha de muestreo y en el tratamiento de 20% de riego es  $26,6 \pm 1,6 \text{ mg L}^{-1}$  en la segunda fecha de muestreo. Respecto a los valores mínimos, para el tratamiento de 70% de riego es  $8,5 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$  en la ultima fecha de muestreo, para el tratamiento de 40% de riego es  $1,5 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$  en la tercera fecha de muestreo y para el tratamiento de 20% de riego es  $8,3 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  en la tercera fecha de muestreo.

Según los resultados expuestos anteriormente, la fecha y tratamiento idóneos para realizar la recolección de hojas es en la segunda fecha de muestreo, en el tratamiento de 20% de riego, sin embargo, considerando el factor de la acumulación de biomasa, es preferible recolectar en la quinta fecha de muestreo, donde se han producido más hojas, y el proceso de deshoje ha comenzado de manera natural.

**Tabla 31.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo blanco en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico.

<b>RIEGO Y GENOTIPO BLANCO CONSTANTE</b>					
<b>FECHA VARIABLE</b>					
	<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>	0,397	0,632	<b>0,009</b>	0,127	0,079
<b>40</b>	0,102	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,057
<b>20</b>	0,825	<b>0,009</b>	<b>0,033</b>	0,608	0,632

En la tabla 31 se presentan las diferencias estadísticamente significativas entre las distintas fechas de muestreo, al igual que en el caso del genotipo de semilla negra, aparece en todos los tratamientos diferencias entre la tercera y cuarta fecha de muestreo, que coinciden con el cambio de crecimiento vegetativo a reproductivo. Las otras diferencias, como se comentó en el análisis anterior, pueden explicarse debido a las funciones y condiciones específicas de cada planta, teniendo en cuenta la complejidad del metabolismo secundario.

**Tabla 32.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico.

<b>ácido cafeico</b>	
<b>riegos</b>	<b>r</b>
<b>70-40</b>	0,053
<b>70-20</b>	0,232
<b>40-20</b>	0,261

En relación a la comportamiento en la producción de este polifenol, se puede observar que son nulas; cada tratamiento mostró una respuesta distinta frente al paso del tiempo. Esto ocurre de la misma manera en el genotipo de semilla negra, como se vio en el punto anterior.

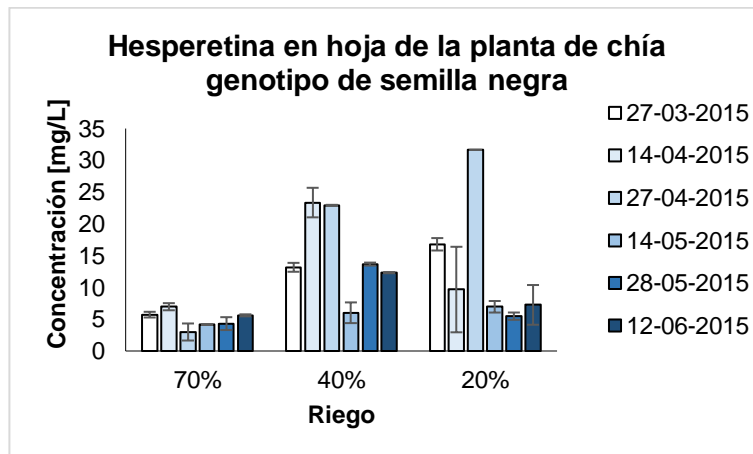
**Tabla 33.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo CLAR – DAD para el ácido cafeico.

ácido cafeico	
riegos	r
70-70	-0,481
40-40	0,260
20-20	0,108

En la tabla 33 se presentan los coeficientes de correlación para el comportamiento de las plantas de ambos genotipos sometidos a los mismos niveles de riego. Se puede apreciar que, al igual que en todos los otros ensayos, la respuesta de ambos genotipos es totalmente distinta.

Respecto a las condiciones óptimas para la recolección de las hojas con la finalidad de obtener ácido cafeico son en la cuarta fecha de muestreo, con un 40% de riego en el genotipo negro.

### 5.2.2.2 Hesperetina



**Figura 29.** Concentración de hesperetina a través del tiempo en el extracto de hoja de la planta de semilla negra.



La concentración de hesperetina en los distintos extractos de hojas de plantas de semilla negra se presenta en la figura 29, de ella se puede observar que los tratamientos presentaron distintas evoluciones temporales en las concentraciones de este compuesto.

Los valores máximos para el tratamiento de 70% de riego es  $6,9 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$  en la segunda fecha de muestreo, en el tratamiento de 40% de riego es  $23,4 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  en la segunda fecha de muestreo y en el tratamiento de 20% de riego es  $31,6 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$  en la tercera fecha de muestreo. Respecto a los valores mínimos, para el tratamiento de 70% de riego es  $3,0 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$  en la tercera fecha de muestreo, para el tratamiento de 40% de riego es  $6,0 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  en la cuarta fecha de muestreo y para el tratamiento de 20% de riego es  $5,5 \pm 1,6 \text{ mg L}^{-1}$  en la quinta fecha de muestreo.

Si el propósito de este estudio es la recolección de hojas con la mayor concentración de hesperetina, las condiciones óptimas para ello son el riego de 20% en la tercera fecha de muestreo.

**Tabla 34.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el hesperetina.

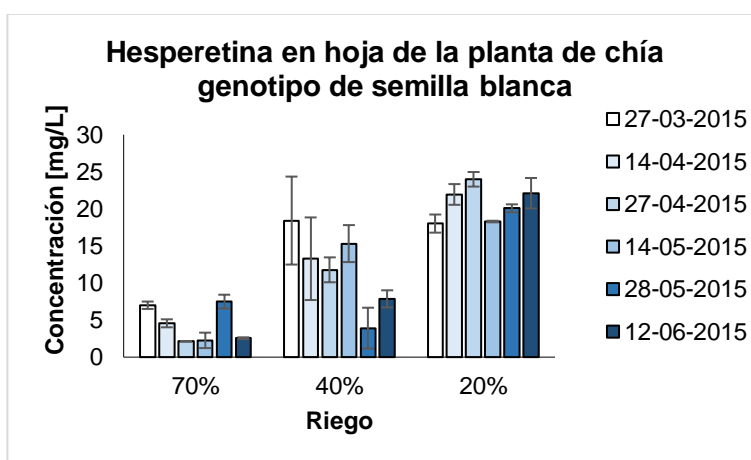
		<b>RIEGO Y GENOTIPO NEGRO CONSTANTE FECHA</b>				
		<b>VARIABLE</b>				
		<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>		0,072	<b>0,010</b>	0,206	0,806	0,107
<b>40</b>		<b>0,002</b>	0,768	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>
<b>20</b>		0,144	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	0,097	0,391

En la tabla 34 se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre la tercera y cuarta fecha de muestreo para los tratamientos de 40% y 20% de riego, lo que coincide con el cambio de crecimiento como también se presentaban claramente para el ácido cafeico. Al igual que en el caso anterior, las marcadas diferencias entre los valores de las fechas comparadas tienen relación con las condiciones de crecimiento de las plantas y las implicancias de este compuesto en las distintas funciones de la planta.

**Tabla 35.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el hesperetina.

hesperetina	
riegos	r
70-40	0,131
70-20	-0,488
40-20	0,574

En la tabla 35, como en los otros estudios de correlación entre los distintos tratamientos para el ácido cafeico, no se aprecia una correlación entre las distintas condiciones de cultivo en este genotipo. Esto puede, al igual que en los casos anteriores puede deberse a la diversidad de usos que poseen los compuestos fenólicos en la vida de las plantas, por ser parte de sus metabolismos secundarios.



**Figura 30.** Concentración de hesperetina a través del tiempo en el extracto de hoja de la planta de semilla blanca.

La concentración de hesperetina en los distintos extractos de hojas de plantas de semilla blanca se presenta en la figura 30, de ella se puede observar que los tratamientos presentaron distintas evoluciones temporales en las concentraciones de este compuesto al igual que en el genotipo negro.

Los valores máximos para el tratamiento de 70% de riego es  $7,5 \pm 1,0 \text{ mg L}^{-1}$  en la quinta fecha de muestreo, en el tratamiento de 40% de riego es  $18,4 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$

en la primera fecha de muestreo y en el tratamiento de 20% de riego es  $24,0 \pm 1,1$  mg L<sup>-1</sup> en la tercera fecha de muestreo. Respecto a los valores mínimos, para el tratamiento de 70% de riego es  $2,1 \pm 0,3$  mg L<sup>-1</sup> en la última fecha de muestreo, para el tratamiento de 40% de riego es  $3,4 \pm 0,2$  mg L<sup>-1</sup> en la tercera fecha de muestreo y para el tratamiento de 20% de riego es  $18,3 \pm 1,1$  mg L<sup>-1</sup> en la primera fecha de muestreo.

Según los resultados expuestos anteriormente, la fecha y tratamiento idóneos para realizar la recolección de hojas es en la tercera fecha de muestreo, en el tratamiento de 20% de riego, sin embargo, considerando el factor de la acumulación de biomasa -al igual que en el caso anterior-, es preferible recolectar las hojas en la cuarta fecha de muestreo, donde se han producido más hojas, si es que la finalidad es la producción de semillas también. Si el fin último es la producción de este polifenol, se debe recolectar en el máximo del 20% de riego, ya que hay una diferencia estadísticamente significativa entre la tercera y cuarta fecha de muestreo (tabla 36).

**Tabla 36.** Valores – p entre las fechas de muestreo para el genotipo negro en el ensayo CLAR – DAD para el hesperetina.

		<b>RIEGO Y GENOTIPO BLANCO CONSTANTE</b>				
		<b>FECHA VARIABLE</b>				
		<b>M1-M2</b>	<b>M2-M3</b>	<b>M3-M4</b>	<b>M4-M5</b>	<b>M5-M6</b>
<b>70</b>		<b>0,008</b>	<b>0,003</b>	0,840	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>
<b>40</b>		0,337	0,680	0,117	<b>0,006</b>	0,081
<b>20</b>		<b>0,024</b>	0,121	<b>0,001</b>	<b>0,012</b>	0,185

En la tabla 36 se presentan los valores – p entre las fechas de muestreo. En este caso solo el tratamiento de 20% presenta diferencias en entre la tercera y cuarta fecha de muestreo, que coincidiría con el cambio en el crecimiento. Además, se presentan otra serie de diferencias que podrían estar relacionadas con las funciones del metabolito en la planta, como se ha mencionado en los análisis anteriores.

**Tabla 37.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos tratamientos hídricos para el genotipo blanco en el ensayo CLAR – DAD para el hesperetina.

hesperetina	
riegos	r
70-40	-0,112
70-20	-0,477
40-20	-0,408

En la tabla 37 se muestran los resultados de las correlaciones entre los distintos tratamientos, aquí se aprecia que no hay una relación directa entre las fechas y concentraciones de la hesperetina en las hojas de las plantas.

**Tabla 38.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos genotipos en el ensayo CLAR – DAD para la hesperetina.

hesperetina	
riegos	r
70-70	0,308
40-40	-0,060
20-20	0,494

Finalmente, en la tabla 38 se presentan los coeficientes de correlación entre ambos genotipos, manteniendo el tratamiento hídrico constante. Esto da cuenta, una vez más, que no hay una relación entre la respuesta que entregan ambos genotipos de la planta. Validando la hipótesis de que ambos genotipos tendrán comportamientos distintos.

Por último, las condiciones idóneas para obtener el máximo de hesperetina en las hojas es con el riego de 20%, en el genotipo negro, en la tercera fecha de muestreo.

### 5.3 Resumen de resultados

En la tabla 39 se presenta un resumen sobre las condiciones óptimas para la recolección de hojas de chía, de acuerdo a todas las discusiones realizadas en cada uno de los ensayos analizados anteriormente.

**Tabla 39.** Tabla resumen de resultados por ensayo.

Ensayo	Riego	Fecha	Genotipo
ORAC - FL	20%	cuarta	negro
ORAC - PGR	20%	cuarta	negro
DPPH	20%	cuarta	negro
EPR	70%	sexta	negro
Folin - Ciocalteau	70%	quinta	negro
Ácido cafeico	40%	cuarta	negro
Hesperetina	20%	tercera	negro

A modo de conclusión, se puede afirmar en primera instancia que el genotipo negro muestra en general, mejores resultados en cada uno de los ensayos realizados, además de ser más estable en su reproducción por ser el gen dominante. En el caso de las fechas de recolección, desde la cuarta hasta la sexta fecha de cultivo es lo ideal para recolectar las mejores propiedades descritas en cada ensayo. Para finalizar, el tratamiento hídrico idóneo puede ser de 20% de riego, por los resultados de los ensayos ORAC, DPPH y hesperetina. Sin embargo, en el caso de los ensayos de inhibición del radical hidroxilo (EPR) y Folin – Ciocalteau, lo ideal es utilizar el 70% de riego determinado por evapotranspiración. Si bien, el riego de 70% tiene menos resultados óptimos que el riego de 20%, son también ensayos de alta relevancia por la peligrosidad del radical hidroxilo y la amplia base de datos que existe sobre el ensayo Folin – Ciocalteau.

Además de todos los resultados analizados en las secciones ya expuestas, se incluirá en anexos las correlaciones entre los distintos ensayos, con distintos tratamientos hídricos.

## VI. CONCLUSIONES

1. Fue posible determinar capacidad antioxidante de los diferentes extractos de la hoja de la *Salvia hispanica* L., mediante los distintos ensayos utilizados.
2. Fue posible identificar la presencia y cantidad de dos compuestos fenólicos: hesperetina y ácido caféico.
3. Mediante el ensayo Folin-Ciocalteau fue posible determinar el contenido de polifenoles totales en el extracto.
4. La hipótesis de este trabajo se valida de acuerdo a que existen diferentes propiedades de los extractos de acuerdo a la fecha de recolección de muestras, el genotipo bajo estudio y el nivel de riego al que fueron sometidos.
5. Las condiciones ideales para la producción de hoja de chíá son: utilizar el genotipo de semilla negra, con riego óptimo (70%) y desde 15 días antes de la recolección de la semilla.

## VII. REFERENCIAS

- Alam, N., Nusrat, J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-152.
- Álvarez, L., Valdivia, M., & Aburto, M. (2007). Chemical Characterization of the Lipid Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica* L.). *International Journal of Food Properties*, 11, 687-697.
- Amato, M., Caruso, M., Guzzo, F., Galgano, F., & Commisso, M. (2015). Nutritional quality of chia seeds and leaf metabolites of Chia (*Salvia hispanica* L.) from souther Italy. *European Food Research and Technology*, 241, 615–625.
- Ames, B., Shigenaga, M., & Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Processing of the National Academic Science*, 90, 7915-7922.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 72, 1079-1081.
- Ayerza, R. (2009). The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by enviromental factors. *Journal of Oleo Science*, 58, 347-354.
- Ayerza, R. (2010). Effects of seed color and growing locations on fatty acid content and composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87, 1161-1165.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispánica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44, 131-135.
- Beking, K., & Vieira, A. (2009). Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study. *Public Health Nutrition*, 13, 1403–1409.
- Bettaieb, I., Zakhama, N., Aidi, W., Kchouk, M., & Marzouk, B. (2009). Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*, 120, 271-275.

- Borderías, A., Sanchez, I., & Perez, M. (2005). New applications of fibres in food: Addition to fishery products. *Trends in food Science and Technology*, 16, 458-465.
- Cao, S., Chen, H., & Xiang, S. (2015). Anti-Cancer Effects and Mechanisms of Capsaicin in Chili Peppers. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 3075-3081.
- Coates, W., & Ayerza, R. (1996). Production potencial of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 5, 229-233.
- Corell, M., Citlalitl, M., & Contreras, J. (2014). Effect of water stress on *Salvia officinalis* L. Bioproductivity and its bioelement concentrations. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43, 419-425.
- Dávalos. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48-54.
- Dorman, H., Kosar, M., Baser, K., & Hiltunen, R. (2009). Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha x piperita* L. (peppermint) extracts. *Natural Products Communications*, 4, 535-542.
- Dorta, E., Fuentes, E., Aspee, A., Atala, E., & Speisky, H. (2015). The ORAC (oxygen radical absorbance capacity) index does not reflect the capacity of antioxidants to trap peroxy radicals. *Royal Society of Chemistry*, 50, 39899-39902.
- Elleuch, M., Bedigian, D., & Roiseux, O. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124, 411-421.
- Espada, C., Berra, M., Martinez, M., Eynard, A., & Pasqualini, M. (2007). Effect of Chia oil (*Salvia hispanica*) rich in w-3 fatty acid on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acid*, 77, 21-28.
- FAO. (1985). Energy and protein requirements. *Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation: Technical report series 724*.
- Ferreres, F., Valentao, P., Llorach, R., & Pinheiro, C. (2005). Phenolic compounds in external leaves of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53, 2901-2907.



- Giu, D., Xi, L., Xiang, Xu, & Li, G. (2012). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of Functional Food*, 5, 260-266.
- Goralczyk, R. (2009). Beta-carotene and lung cancer in smokers: review of hypotheses and status of research. *Nutrition and Cancer*, 61, 767-774.
- Guo, Y., Deng, G., Xu, R., & Wu, S. (2012). Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. *Food & Function*, 3, 1195–1205.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters*, 307, 108-112.
- Hamid, A., Aiyelaagbe, O., Usman, L., & Ameen, O. (2010). Antioxidants: its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4, 142-151.
- Hassane, E., Gierschner, J., Duroux, J., & Trouillas, P. (2012). UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry*, 131, 79-89.
- Hernández, J., Miranda, S., & Peña, A. (2007). Natural outcrossing of chia (*Salvia hispanica* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14, 331-337.
- Huang, W., Zhang, X., & Chen, W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). *Biomedical Reports*, 4, 519-522.
- Lara, O., Tabares, J., Leon, Y., Alvarez, R., & Roldan, M. (2012). Proatherogenic Macrophage Activities Are Targeted by the Flavonoid Quercetin. *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*, 343, 296–306.
- Lee, J., & Scagel, C. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 115, 650-656.
- Li, F., Bo, X., Xiang, X., & Ren, G. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345–350.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118-126.
- López, C., Ortiz, R., Benavides, J., Mura, E., & Lissi, E. (2011). Use of the ORAC-PYROGALLOL RED/ORAC-FLUORESCIEIN ratio to assess the quality of antioxidants in chilean wines. *Journal of Chilean Chemistry Society*, 56, 764-767.

- Marcinek, K., & Krejpcio, Z. (2017). Chia seeds: new source of omega-3 fatty acids, natural antioxidants and dietetic fiber. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 68, 123 - 129.
- Maritim, A., Sanders, R., & Watkins, J. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 24-38.
- Mendoza, A., Del Paso, F., & Galindo, J. (1925). Codex Mendoza 1542. *Museo Nacional de Arqueología, Historia y Etnografía, México*.
- Moharram, H., & Mohamoud, M. (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 11, 31-42.
- Nieman, D., Gillit, N., Henson, D., Kennerly, K., & Shanely, R. (2012). Chia seed supplementation and diese risk factors in overweight women: A metabolomics investigation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 18, 700-708.
- Olivos, B., Valdivia, M., & Tecante, A. (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Science and Technology International*, 16, 89-96.
- Popovic, B., Stajner, D., Zdero, R., & Tumbas, V. (2016). Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in polar plants (*populus* spp.). *Plant physiology and biochemistry*, 105, 242-250.
- Reyes, E., Tecante, A., & Valdivia, M. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.). *Food Chemistry*, 107, 656-663.
- Ryan, E., Mogens, A., Leif, S., & Waterhouse, A. (2009). Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4359-4365.
- Sindhi, V., Gupta, V., & Sharma, K. (2013). Potential applications of antioxidants - A review. *Journal of pharmacy research*, 7, 828-835.
- Soto, C. (2015). Determinación de la capacidad antioxidante de las espigas de la planta de chíá. *Memoría de tesis Universidad de Chile*, 18.
- Speisky, H., Lopez, C., Gomez, M., & Fuentes, J. (2012). First Web-Based Database on Total Phenolics and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Fruits Produced and Consumed within the South Andes Region of South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8851-8859.

- USDA. (4 de enero de 2004). *Seeds, chia seeds, dried. Nutrient Database for Standard Reference*. Recuperado el 2019, de FoodData Central Search Results: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170554/nutrients>
- Wan, C., & Yu, Y. (2011). Isolation and identification of phenolic compounds from *Gynura divaricata* leaves. *Parmacognosy Magazine*, 7, 101-108.
- Yeung, P., Lai, A., Son, H., & Zhang, X. (2017). Aldose reductase deficiency leads to oxidative stress-induced dopaminergic neuronal loss and autophagic abnormality in an animal model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 50, 119-133.
- Zeb, A. (2015). Phenolic profile and antioxidant potential of wild watercress (*Nasturtium officinale* L.). *springerplus*, 4, 1 - 7.
- Zhang, Y., Gan, R., Li, S., & Zhou, Y. (2015). Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules*, 20, 21138-21156.

## VIII. Anexos

### 8.1 Correlaciones entre los ensayos del genotipo de semilla negra

**Tabla 40.** Correlación entre los distintos ensayos, genotipo negro y riego de 70% constantes.

Chía Negra 70%							
Ensayo/Ensayo	ORAC-FL	ORAC-PGR	DPPH	EPR	FOLIN-C	HPLC-CAF	HPLC-HESP
ORAC-FL	1,000	0,174	-0,048	0,307	0,742	-0,314	-0,282
ORAC-PGR		1,000	-0,720	-0,368	0,439	0,227	0,399
DPPH			1,000	0,771	-0,449	0,150	-0,766
EPR				1,000	-0,013	0,282	-0,491
FOLIN-C					1,000	-0,569	0,079
HPLC-CAF						1,000	0,202
HPLC-HESP							1,000

**Tabla 41.** Correlación entre los distintos ensayos, genotipo negro y riego de 40% constantes.

Chía Negra 40%							
Ensayo/Ensayo	ORAC-FL	ORAC-PGR	DPPH	EPR	FOLIN-C	HPLC-CAF	HPLC-HESP
ORAC-FL	1,000	0,688	-0,575	-0,246	-0,665	-0,436	0,557
ORAC-PGR		1,000	0,941	0,387	-0,787	-0,115	0,461
DPPH			1,000	-0,261	0,877	0,223	-0,557
EPR				1,000	-0,140	-0,267	-0,355
FOLIN-C					1,000	0,554	-0,492
HPLC-CAF						1,000	-0,764
HPLC-HESP							1,000

**Tabla 42.** Correlación entre los distintos ensayos, genotipo negro y riego de 20% constantes.

Chía Negra 20%							
Ensayo/Ensayo	ORAC-FL	ORAC-PGR	DPPH	EPR	FOLIN-C	HPLC-CAF	HPLC-HESP
ORAC-FL	1,000	0,258	0,392	-0,546	-0,313	0,313	-0,077
ORAC-PGR		1,000	-0,454	-0,182	-0,837	-0,600	0,632
DPPH			1,000	-0,780	0,086	0,889	-0,022
EPR				1,000	0,529	-0,524	-0,450
FOLIN-C					1,000	0,441	-0,846
HPLC-CAF						1,000	-0,398
HPLC-HESP							1,000

## 8.2 Correlaciones entre los ensayos del genotipo de semilla blanca

**Tabla 43.** Correlación entre los distintos ensayos, genotipo blanco y riego de 70% constantes.

Chía Blanca 70%							
Ensayo/Ensayo	ORAC-FL	ORAC-PGR	DPPH	EPR	FOLIN-C	HPLC-CAF	HPLC-HESP
ORAC-FL	1,000	0,218	-0,531	-0,858	0,807	-0,235	0,427
ORAC-PGR		1,000	-0,905	-0,053	-0,177	-0,383	0,178
DPPH			1,000	0,425	-0,029	0,577	-0,091
EPR				1,000	-0,568	0,157	-0,001
FOLIN-C					1,000	0,155	0,732
HPLC-CAF						1,000	0,269
HPLC-HESP							1,000

**Tabla 44.** Correlación entre los distintos ensayos, genotipo blanco y riego de 40% constantes.

Chía Blanca 40%							
Ensayo/Ensayo	ORAC-FL	ORAC-PGR	DPPH	EPR	FOLIN-C	HPLC-CAF	HPLC-HESP
ORAC-FL	1,000	0,553	-0,152	-0,462	0,363	0,475	0,569
ORAC-PGR		1,000	0,005	-0,500	-0,418	-0,249	0,609
DPPH			1,000	-0,698	0,377	-0,357	0,085
EPR				1,000	-0,259	0,001	0,141
FOLIN-C					1,000	0,452	-0,606
HPLC-CAF						1,000	0,285
HPLC-HESP							1,000

**Tabla 45.** Correlación entre los distintos ensayos, genotipo blanco y riego de 20% constantes.

Chía Blanca 20%							
Ensayo/Ensayo	ORAC-FL	ORAC-PGR	DPPH	EPR	FOLIN-C	HPLC-CAF	HPLC-HESP
ORAC-FL	1,000	0,357	-0,421	-0,724	-0,606	0,099	0,369
ORAC-PGR		1,000	-0,389	0,010	0,326	0,122	-0,152
DPPH			1,000	0,036	-0,514	-0,028	0,111
EPR				1,000	0,794	-0,303	-0,660
FOLIN-C					1,000	-0,239	-0,753
HPLC-CAF						1,000	-0,175
HPLC-HESP							1,000