

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**“Evaluación de la capacidad antimicrobiana y  
antioxidante en extractos secuenciales de hoja de  
chía (*Salvia hispanica* L.)”**

**Tesis presentada para optar al grado de Magíster en Química en el área  
de Especialización en Productos Naturales y Memoria para optar  
al Título de Químico por:**

**SANDY FARFAN LUCCA**

**Directores de Tesis:**  
**Dra. María Carolina Zúñiga López**  
**Dr. Claudio Olea Azar**

**Santiago, Chile**  
**Marzo 2024**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

## SANDY FARFAN LUCCA

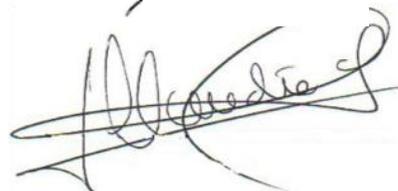
Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Productos Naturales y Título de Químico.

#### Directores de Tesis:

Dra. María Carolina Zúñiga López



Dr. Claudio Olea Azar



#### Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. David Vásquez

Dra. Raquel Bridi

Dr. Guillermo Schmeda

## **Agradecimientos**

Al llegar al final de este viaje académico, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera significativa a la realización de esta tesis de postgrado.

En primer lugar, agradezco a mis padres por su apoyo y paciencia a lo largo de esta travesía.

A mis profesores, por su orientación y sabiduría en mi desarrollo académico.

No puedo pasar por alto el apoyo de mis compañeros y amigos cercanos; agradezco sus aportaciones, palabras de aliento y el respaldo que he recibido de su parte.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de alguna manera, han contribuido a esta investigación, ya sea brindando recursos, compartiendo conocimientos o simplemente ofreciendo su tiempo y apoyo moral.

*“Tan divino!”* – Beatriz Pinzón Solano (Yo soy Betty, la fea)

## Abreviaturas

%PI	Porcentaje de inhibición
A	Ácido gálico
ABC	Área bajo la curva
AC	Ácido cafeico
AcEt	Acetato de etilo
AE	Aceite esencial
AGE	Ácidos grasos esenciales
AH	Ácido hidroxicinámico
AMH	Agar Müller – Hinton
AP	Ampicilina
ATCC	Colección de Cultura Tipográfica Americana
B	Hoja de chía de genotipo blanca
CA	Capacidad Antioxidante
CCF	Cromatografía en capa fina
CMH	Caldo Müller – Hinton
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Apigenina
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ET	Transferencia de electrones
EtOH	Etanol
F17	Fracción 17
FL	Fluoresceína
HAT	Transferencia de átomo de hidrógeno
HEX	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

MX	Moxifloxacino
N	Hoja de chía de genotipo negra
NCCLS	Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico
NP/PEG	2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol/polietilenglicol 4000 al 5%
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	Capacidad de absorción de radicales centrados en oxígeno
PGR	Rojo de pirogalol
P <sub>i</sub>	Potencial de ionización
Q	Quercetina
RH	Antioxidante
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RO	Ácido rosmarínico
TX	Trolox
UA	Unidades de absorbancia
UV	Ultravioleta
$\Delta H_D$	Entalpía de disociación de enlace
$\Omega - 3$	Ácido $\alpha$ -linolénico
$\Omega - 6$	Ácido linoleico

## Índice de Figuras

Figura 1. (A) Ilustración de un indígena azteca trabajando en un cultivo de chía; (B) mapa de Mesoamérica. ....	14
Figura 2. (A) Plantación de chía ( <i>Salvia hispanica</i> L.); (B) semilla de chía blanca y (C) semilla de chía negra. ....	16
Figura 3. Estructura química básica de diferentes familias de polifenoles. (I) flavonoide, (II) flavonol, (III) flavona, (IV) flavanona, (V) flavanol y (VI) isoflavona. ....	28
Figura 4. Estructura química de (I) ácido gálico y (II) antocianidina. ....	28
Figura 5. Estructura química de (I) estilbenoide y (II) resveratrol. ....	29
Figura 6. Principales ácidos hidroxicinámicos encontrados en la naturaleza. ....	29
Figura 7. Esquema de la extracción seriada realizada por maceración, utilizando solventes de polaridad creciente. ....	34
Figura 8. Perfil cinético de un ensayo ORAC-FL. (A) curva de decaimiento de la fluorescencia en presencia de un antioxidante, (B) blanco y (C) área de protección neta bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia en presencia de un antioxidante. ....	36
Figura 9. Estructura química de la (1) ficoeritrina y (2) fluoresceína. ....	37
Figura 10. Estructura química del (3) Trolox y (4) $\alpha$ -tocoferol. ....	37
Figura 11. Estructura química del compuesto PGR. ....	39
Figura 12. Mecanismo de reacción entre el radical DPPH y un antioxidante (RH). ....	40
Figura 13. Esquema de trabajo para la determinación de la capacidad antimicrobiana por el método de difusión en agar. ....	44
Figura 14. Representación de una determinación de CMI por macrodilución. ....	44
Figura 15. Esquema de trabajo para la determinación de la CMI por microdilución. ....	46
Figura 16. Curvas de decaimiento de la fluorescencia de la molécula sonda (FL) por efecto de radicales libres en presencia de cada extracto, para cada genotipo estudiado. ....	50
Figura 17. Funciones más relevantes en la estructura de un flavonoide (quercetina) en cuanto a la actividad antioxidante: grupo catecol o anillo B dihidroxilado (en amarillo). Presencia de una insaturación en el anillo C (en azul) y el grupo 4 – oxo (en verde). Grupo hidroxilo (en rosado). ....	53

Figura 18. Curvas de decaimiento de la absorbancia de la molécula sonda (PGR) por efecto de radicales libres en presencia de cada extracto, para cada genotipo estudiado.....	54
Figura 19. Resultados para el %PI de cada extracto. ....	56
Figura 20. Matriz de combinación obtenida a partir de los valores de RO y CA en términos de sinergia o antagonismo, sobre la CA. (*) combinaciones con significación estadística ( $p \leq 0,05$ ). Valores no significativos se muestran en verde. Los valores son expresados como la media $\pm$ desviación estándar (n=3). ....	58
Figura 21. Gráfico de superficie de respuesta de la matriz de combinación obtenida a partir de los valores de RO y CA en términos de sinergia o antagonismo, sobre la CA .....	59
Figura 22. Cromatograma obtenido para el extracto EtOH-N.....	64
Figura 23. CCF de F15 utilizando el revelador NP/PEG. A la izquierda CCF analizado bajo luz visible. A la derecha CCF analizado bajo luz UV (365 nm). A = ácido gálico; Q = quercetina; F17 = fracción 17; E = apigenina. ....	66
Figura 24. Espectro de masas para F17. ....	67
Figura 25. A la izquierda: gráfico de decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de la molécula sonda (FL) por efecto de radicales libres. Las concentraciones de TX son: (■) blanco, (■) 5,0 $\mu$ M, (■) 8,0 $\mu$ M, (■) 10 $\mu$ M, (■) 15 $\mu$ M y (■) 20 $\mu$ M. A la derecha: relación del ABC y la concentración de TX ( $y = 787,647 + 141,138x$ ; $r = 0,9961$ ). ....	81
Figura 26. A la izquierda: gráfico de decaimiento de la absorbancia de la molécula sonda (PGR) por efecto de radicales peroxilo. Las concentraciones de TX son: (■) blanco, (■) 85,87 $\mu$ M, (■) 114,5 $\mu$ M, (■) 171,75 $\mu$ M, (■) 286,25 $\mu$ M, (■) 400,75 $\mu$ M y (■) 515,25 $\mu$ M. A la derecha: relación del ABC y la concentración de TX ( $y = 32,598 + 1,941x$ ; $r = 0,9961$ ). ....	82
Figura 27. Fraccionamiento del extracto EtOH-N. Con (1) ácido protocatecuico, (2) ácido cafeico, (3) ácido ferúlico, (4) ácido rosmarínico, (5) miricetina, (6) morina y (★) peak más intenso correspondiente a F17.....	84

## Índice de Tablas

Tabla 1. Cuantificación de AC y RO en los extractos seriados de hoja de chía cultivada el año 2020. Datos extraídos de estudios realizados previamente por el grupo de investigación (Zúñiga-López et al., 2021).....	42
Tabla 2. Rendimiento de la extracción por cada solvente utilizado, para los genotipos de hoja negra (N) y blanca (B). .....	49
Tabla 3. Resultados de ORAC-FL obtenidos para cada extracto.....	51
Tabla 4. Resultados de ORAC-PGR obtenidos para cada extracto. ....	55
Tabla 5. Lectura de los halos de inhibición obtenidos como resultado del ensayo de actividad antimicrobiana por difusión en agar. ....	60
Tabla 6. Resultados para la CMI de cada extracto.....	62
Tabla 7. Lectura de los halos de inhibición obtenidos como resultado del ensayo de actividad antimicrobiana por difusión en agar para las fracciones que mostraron actividad frente a los microorganismos ensayados. ....	65
Tabla 8. Taxonomía de la <i>Salvia hispanica</i> L.....	81
Tabla 9. Gradiente de elución utilizado en el fraccionamiento de EtOH-N.....	82
Tabla 10. Tiempos de retención de los compuestos polifenólicos identificados en el extracto EtOH-N.....	83

## Resumen

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una especie herbácea anual, perteneciente a la familia Lamiaceae, cultivada tradicionalmente en la época precolombina de Mesoamérica, y que luego de un largo período de olvido ha sido nuevamente objeto de interés. El consumo y demanda de chía a nivel mundial se ha visto incrementado en los últimos años donde, el cultivo se ha centrado únicamente en la producción de las semillas, siendo el resto de la planta considerado un desecho agrícola.

Con el objetivo de revalorizar una fuente vegetal desaprovechada, el presente trabajo de tesis se centró en el estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hoja de dos genotipos de semilla de chía (negra y blanca), cultivadas en el año 2020, obtenidos mediante maceración en frío utilizando solventes de polaridad creciente hasta agotamiento de la matriz en cada fase extractiva.

La evaluación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo mediante tres métodos (ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH) donde, las fracciones AcEt mostraron la mayor actividad de toda la serie. Por otro lado, el estudio de la actividad antimicrobiana se realizó frente a bacterias Gram – positiva y Gram – negativas, mediante el método de difusión en agar y el de microdilución. Los extractos mostraron una moderada actividad antimicrobiana frente a las cepas ensayadas, destacando la fracción EtOH-N, la cual fue fraccionada mediante HPLC semipreparativa donde, la fracción F17 contribuye en un 20 – 38% a la actividad antimicrobiana global del extracto. Se realizó una caracterización cualitativa del perfil del aislado F17 mediante cromatografía en capa fina (CCF) observando la presencia de flavonas. Por otro lado, como resultado del análisis mediante HPLC-MS/MS se logró la identificación de un compuesto de fórmula molecular  $C_{15}H_{13}O_3$  ( $m/z = 242,2844$ ).

## Summary

Chia (*Salvia hispanica* L.) is an annual herbaceous species, belonging to the Lamiaceae family, traditionally cultivated in the pre-Columbian era of Mesoamerica, and which after a long period of oblivion has once again been the object of interest. The consumption and demand for chia worldwide has increased in recent years where the crop has focused solely on the production of seeds, with the rest of the plant being considered agricultural waste.

With the aim of revaluing an untapped plant source, this report focused on the study of the antioxidant and antimicrobial activity of leaf extracts of two chia seed genotypes (black and white), grown in 2020, obtained by cold maceration using solvents of increasing polarity until matrix depletion in each extractive phase.

The evaluation of antioxidant capacity was carried out using three methods (ORAC-FL, ORAC-PGR and DPPH) where the AcEt fractions showed the highest activity of the entire series. On the other hand, the study of antimicrobial activity was carried out against Gram-positive and Gram-negative bacteria, using the agar diffusion method and the microdilution method. The extracts showed a moderate antimicrobial activity against the tested strains, highlighting the EtOH-N fraction, which was fractionated by semi-preparative HPLC where the F17 fraction contributes more than 50% to the overall antimicrobial activity of the extract. A qualitative characterization of the F17 isolate profile was performed by thin layer chromatography (CCF) observing the presence of flavones. On the other hand, as a result of the analysis using HPLC-MS/MS, it was possible to identify a compound with a molecular formula  $C_{15}H_{13}O_3$  ( $m/z = 242,2844$ ).

## Índice

1	Introducción .....	14
1.1	<i>Salvia hispanica</i> L. ....	14
1.1.1	Clasificación taxonómica y descripción botánica .....	15
1.1.2	Composición química de la semilla de chía .....	16
1.1.3	Usos populares .....	17
1.1.4	Propiedades terapéuticas .....	18
1.1.5	Situación actual.....	19
1.1.6	Hoja de chía.....	19
1.2	Actividad biológica.....	20
1.2.1	Capacidad antioxidante .....	20
1.2.2	Actividad Antimicrobiana.....	23
1.3	Compuestos fenólicos .....	26
1.3.1	Estructura y distribución de los polifenoles .....	26
1.3.2	Polifenoles como agentes antioxidantes .....	30
1.3.3	Compuestos fenólicos como agentes antimicrobianos .....	30
2	Hipótesis .....	32
3	Objetivo general.....	32
4	Objetivos específicos .....	32
5	Materiales y métodos.....	33
5.1	Cultivo, muestreo y tratamiento de la muestra .....	33
5.2	Obtención de los extractos.....	33
5.2.1	Reactivos y materiales .....	33
5.2.2	Equipos e instrumentos.....	33
5.2.3	Maceración .....	33
5.3	Actividad biológica.....	35
5.3.1	Reactivos y materiales .....	35

5.3.2	Equipos e instrumentos.....	35
5.4	Estudio del sinergismo o antagonismo en mezclas de polifenoles más abundantes en los extractos.....	41
5.4.1	Fundamento teórico .....	41
5.4.2	Protocolo experimental .....	41
5.5	Capacidad antimicrobiana.....	42
5.5.1	Cepas utilizadas y condiciones de cultivo .....	42
5.5.2	Método de difusión en agar.....	43
5.5.3	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	44
5.6	Realizar un fraccionamiento del extracto que exhiba la mejor actividad biológica de la serie, siendo esta atribuible a familias de compuestos.....	46
5.6.1	Reactivos y materiales .....	46
5.6.2	Equipos e instrumentos.....	46
5.6.3	Fundamento teórico .....	47
5.6.4	Protocolo experimental .....	47
6	Resultados.....	49
6.1	Objetivo específico 1. Realizar la extracción de las hojas de cada variante mediante maceración a temperatura ambiente utilizando para ello solventes de polaridad creciente (extracción seriada).....	49
6.2	Objetivo específico 2. Estudiar la capacidad antioxidante de los extractos seriados de hojas de chía, cultivadas el año 2020, mediante las técnicas ORAC-FL y ORAC-PGR. ....	50
6.2.1	ORAC-FL. ....	50
6.2.2	ORAC-PGR.....	54
6.3	Objetivo específico 3. Determinar el porcentaje de inhibición de radicales mediante la técnica de DPPH para cada extracto obtenido. ....	56
6.4	Objetivo específico 5. Estudiar una posible sinergia o antagonismo sobre la capacidad antioxidante de la combinación de ácido rosmarínico y cafeico, siendo los polifenoles presentes en mayor proporción cuantificados en los extractos. ....	58

6.5	Objetivo específico 6. Estudiar la capacidad antimicrobiana de los extractos seriados mediante el método de difusión en agar. ....	60
6.6	Objetivo específico 7. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos mediante el método de microdilución en placa.....	62
6.7	Objetivo específico 8. Realizar un fraccionamiento del extracto que presente la mayor actividad biológica de la serie y evaluar la capacidad antimicrobiana, atribuible a familias de compuestos. ....	63
7	Conclusiones .....	68
8	Bibliografía.....	70
9	Anexos.....	81
9.1	Anexo I. Taxonomía de la <i>Salvia hispanica</i> L.....	81
9.2	Anexo II. Gráficos de decaimiento de la sonda FL en presencia de TX. Curva de calibración de TX para ORAC-FL. ....	81
9.3	Anexo III. Gráficos de decaimiento de la sonda PGR en presencia de TX. Curva de calibración de TX para ORAC-PGR.....	82
9.4	Anexo IV. Gradiente de elución utilizado en el fraccionamiento de EtOH-N.	82
9.5	Anexo V. Compuestos identificados en el extracto EtOH-N mediante HPLC semipreparativo.....	83
9.6	Anexo VI. Cromatograma dividido en las 20 fracciones obtenidas para el extracto EtOH-N.....	84



religiosos como una ofrenda a los dioses. Entre los años 1500 – 900 a.C. la semilla de chía era utilizada además como moneda de intercambio entre pueblos (Cahill, 1996).

Junto con la conquista española en el año 1492, la ocupación de estos territorios y la imposición de las costumbres europeas, trajeron consigo un nuevo modelo económico, reestructurando la agricultura acorde con los requerimientos de esa época y sustituyendo los cultivos preponderantes en la dieta precolombina por nuevas especies como el trigo y la cebada. Además, comenzó la producción de azúcar, algodón y tabaco que eran destinados a los grandes mercados europeos. Lo anterior, ocasionó la disminución de la plantación de especies locales y la pérdida de algunas variedades de plantas ancestrales (Ayerza & Coates, 2022).

Sin embargo, diversos pueblos originarios lograron mantener el dominio sobre vastos territorios pudiendo conservar algunas tradiciones. La cultura Nahua permitió la conservación de la planta de chía, destinando su cultivo únicamente para el autoconsumo, elaborando a partir de la semilla una popular bebida conocida como “agua fresca de chía” siendo actualmente consumida en algunas regiones de México, Guatemala y Nicaragua (Ayerza & Coates, 2006).

### **1.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica**

La *Salvia hispanica* L. fue descrita por primera vez por Carl Linnaeus, quien publicó la clasificación taxonómica de la planta en su libro *Species Plantarum*, en el año 1753. El género *Salvia* es muy amplio, incluyendo alrededor de 900 especies diferentes. En particular, *Salvia hispanica* L. pertenece al orden Lamiales y a la familia Lamiaceae, misma familia a la cual pertenece la menta, el romero y el orégano, siendo plantas con una aromaticidad característica (Ayerza & Coates, 2006).

La chía es una planta anual, de crecimiento estival y que requiere de un suelo arcilloso-limoso húmedo para germinar. Una vez establecidas las plántulas, presenta un buen comportamiento en situaciones de estrés hídrico o precipitaciones intensas (Sharifi-Rad et al., 2018).



Figura 2. (A) Plantación de chía (*Salvia hispanica* L.); (B) semilla de chía blanca y (C) semilla de chía negra.

En general, la chía puede alcanzar entre 1,0 – 1,5 m de altura, siendo los tallos de sección cuadrangular, pubescentes y de aproximadamente 2 cm de diámetro (Figura 2-A). Las hojas son ovaladas, serradas y crecen opuestas, siendo las dimensiones de 4 – 8 cm de largo y 3 – 5 cm de ancho. Presentan una tonalidad verde oscuro y al reverso cuentan con una vellosidad que permite la retención de agua. La flor es zigomorfa y pentámera, pudiendo ser de color azul-violáceo o blanco. Grupos de 5 – 6 flores componen la inflorescencia de la planta, que se extiende en forma verticilada. Las semillas son ovaladas y miden alrededor de 1,5 mm de ancho y 2 mm de largo. Presentan una coloración variada, pudiendo ser blancas (Figura 2-B) y negras (Figura 2-C) (Di Sapio et al., 2012).

### 1.1.2 Composición química de la semilla de chía

La semilla de chía es un pseudocereal con un elevado índice nutricional. Presenta una composición variada en la que destaca su contenido de proteínas, lípidos y vitaminas, entre otros micronutrientes.

El contenido proteico de la semilla de chía varía de un 16 – 23% por cada 100 g, superando a otros pseudocereales como la quinua y el amaranto que presentan entre 14 – 16% de proteína por cada 100 g (Valdivia-López & Tecante, 2015).

Además, se ha reportado la presencia de un número importante de aminoácidos esenciales como arginina, leucina y fenilalanina, entre otros (Cisternas et al., 2022). Adicionalmente, la chía contiene alrededor de un 25% de fibra donde un 5 – 6% corresponde al mucílago, utilizado como fibra dietética (Reyes-Caudillo et al., 2008). El mucílago de las semillas de chía es un polisacárido de alto peso molecular y se libera al entrar en contacto con el agua, formando un gel transparente e insípido de alta viscosidad que al ser consumido facilita la digestión y brinda sensación de saciedad (Roohi, 2020).

Otra consideración nutricional importante acerca de la semilla es su contenido de ácidos grasos esenciales (AGE), destacando los derivados del ácido  $\alpha$ -linolénico ( $\Omega$ -3) con un 60 - 63% y de ácido linoleico ( $\Omega$ -6) con un 20%. El aceite extraído de la semilla presenta una cantidad de ácidos grasos saturados y poliinsaturados significativamente mayor a la de algunos pescados como el salmón y el atún (Ullah et al., 2016).

Por otra parte, la chía presenta una variada cantidad de minerales. La semilla contiene alrededor de 6 – 10 veces más calcio que la leche, siendo además una excelente fuente de fósforo, potasio, hierro y magnesio. A su vez, en su composición se encuentran otros micronutrientes como algunas vitaminas del complejo B y antioxidantes de naturaleza polifenólica, principalmente flavonoides y ácidos cinámicos siendo ampliamente reportados por su actividad biológica y acción terapéutica (Cisternas et al., 2022).

Cabe destacar, que diversos estudios han reportado una variación en la cantidad y calidad de los componentes de la semilla según las condiciones edafoclimáticas en la cual se desarrolle el cultivo (Mohd Ali et al., 2012).

### **1.1.3 Usos populares**

En el año 2009, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó un informe sobre la inocuidad de las semillas de chía y las calificó como "nuevo alimento", con valiosas propiedades nutricionales y terapéuticas, pudiendo ser utilizadas de manera segura por los consumidores. Sin embargo, no fue sino hasta

el año 2015 que la entidad impuso algunas regulaciones sobre el uso de las semillas de chía, definiendo un 5% como el nivel permisible de su aplicación en la industria alimentaria y en la formulación de alimentos (EFSA, 2009).

Por lo anterior, la semilla de chía ha sido incorporada principalmente en productos de panificación, enriqueciendo las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos, otorgando un valor agregado. Actualmente, es posible encontrar en el mercado una gran variedad de pastas, galletas, panes y cereales elaborados con chía, incorporada directamente o en forma de harina (Gómez-Ramírez & Caudillo-Ortega, 2018). A su vez, se ha reportado el alto valor nutricional del aceite de semilla de chía, principalmente como fuente de ácidos grasos ( $\Omega$ -3), el cual se ha incluido en la elaboración de margarinas y mantequillas o como suplemento alimenticio en forma de cápsulas (Iglesias Puig, 2013). Por otra parte, la ausencia de gluten en la chía es otra valiosa característica de la semilla, ya que puede ser consumida por la población que sufre de enfermedad celíaca (Valdivia-López & Tecante, 2015).

#### **1.1.4 Propiedades terapéuticas**

El enorme potencial nutricional de la semilla de chía y su incorporación en el mercado como un alimento funcional han sido el foco de múltiples estudios orientados a los beneficios terapéuticos tras su consumo. Diversos autores han reportado el efecto cardioprotector del aceite de semilla de chía, al prevenir el daño vascular coronario y de los miocitos cardíacos, reduciendo además los niveles de triglicéridos y la hipertensión arterial (Sharifi-Rad et al., 2018; Valenzuela et al., 2011). Reyes-Caudillo et al., (2008) reportaron una disminución del riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y algunas cardiopatías, además de la pérdida de peso. Además, se ha reportado ampliamente el potencial antioxidante y antiinflamatorio de la semilla de chía, siendo una fuente importante de compuestos de naturaleza polifenólica los cuales, inhiben el fenómeno de peroxidación lipídica y la formación de radicales libres (Tepe et al., 2005). Por otra parte, se ha identificado la presencia de compuestos como ácido cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol en extractos etanólicos de chía los cuales, presentan actividad antimicrobiana frente a una amplia gama de microorganismos (Güzel et al., 2020).

### **1.1.5 Situación actual**

A partir de la década de los noventa, la chía comenzó a ser cultivada y comercializada en países como México, Bolivia, Perú y Argentina, siendo Paraguay el principal exportador a la fecha (Xingú López et al., 2017). En el mercado internacional, la chía ha alcanzado una fuerte demanda en algunos países de Europa, Estados Unidos y Australia siendo consumida en diversas presentaciones y preparaciones (Busilacchi et al., 2015).

La mayor diversidad genética de *Salvia hispanica* L. se encuentra en México, siendo Jalisco la zona productora del 99% del cultivo nacional, enfocada exclusivamente en la producción de la semilla donde el resto de la planta es descartada, generando toneladas de residuo vegetal que al término de la cosecha son eliminados a través de la quema controlada. Puntualmente, las hojas concentran la mayor biomasa desechada de todo el cultivo (alrededor de 500 kg/hectárea) (Hernández-Gómez & Miranda-Colín, 2008).

### **1.1.6 Hoja de chía**

El interés por revalorizar una fuente vegetal desaprovechada con potencial actividad biológica como las hojas de chía ha crecido en los últimos años. La evidencia folclórica del uso de las hojas de chía en la medicina tradicional sugiere que eran utilizadas para el tratamiento de heridas y desgarros de la piel (Cahill, 1996). Ahmed et al., (1994) sugirieron el uso del aceite esencial de hoja en la industria de aromas y fragancias o como repelente de insectos tras identificar la presencia de 52 componentes, entre ellos ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, fibra y terpenos. Años más tarde, Amato et al., (2015) reportaron por primera vez la composición de hojas de chía obtenidas a partir de semillas silvestres, utilizando diferentes estrategias de fertilización nitrogenada. Los resultados indicaron que las hojas de chía son una buena fuente de antioxidantes como flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. Lo anterior, fue corroborado por Zúñiga-López et al. (2021) quienes evaluaron la composición química y la capacidad antioxidante de extractos secuenciales de hojas de chía de genotipo blanca y negra utilizando solventes de polaridad creciente, lo que resultó en una mayor capacidad antioxidante de los

extractos etanólicos de hojas de chía negra. Elshafie et al., (2018) demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial (AE) extraído de las hojas de chía contra algunas bacterias fitopatógenas (*Clavibacter michiganensis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus mojavensis*) y hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* y *Monilinia fructicola*), lo que sugiere que el AE de las hojas de chía podría usarse como una alternativa natural prometedora en el control de hongos y bacterias fitopatógenas. Así, la evidencia científica hasta ahora reportada sugiere que la presencia de metabolitos secundarios de relevancia científica supone una posible aplicabilidad de los extractos foliares en la formulación de nuevos agentes terapéuticos.

## **1.2 Actividad biológica**

### **1.2.1 Capacidad antioxidante**

#### **1.2.1.1 Radicales libres**

Los radicales libres pueden definirse como cualquier especie química, capaz de existir independientemente, que contiene un electrón desapareado en su orbital más externo. Dicha característica hace que los radicales sean altamente inestables y reactivos por lo que tienden a captar un electrón de moléculas estables cercanas, con el fin de alcanzar su propia estabilidad diamagnética. Lo anterior convierte a la molécula que cedió el electrón en un radical libre, iniciando así una reacción en cadena (Avello & Suwalsky, 2006).

En los organismos vivos, los radicales libres se forman como resultado de algunos procesos metabólicos aeróbicos esenciales. En particular, alrededor de un 5% de los intermediarios formados son especies reactivas de oxígeno (EROs), destacando el radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), generado principalmente en la cadena de transporte de electrones y en la fagocitosis para ser usado como defensa bactericida; el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) como producto de la reacción entre el anión superóxido con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton; y los radicales peroxilo ( $\bullet\text{O}_2\text{R}$ ) y alcoxilo ( $\bullet\text{OR}$ ), formados típicamente durante la degradación oxidativa de lípidos (peroxidación lipídica) (Corrales & Muñoz, 2012).

Adicionalmente, producto de la oxidación de los átomos terminales de nitrógeno de la L-arginina se forma el radical monóxido de nitrógeno ( $\text{NO}\bullet$ ), el cual participa en algunos procesos de señalización a nivel neuronal, siendo además el precursor de la formación de otras especies no radicalarias, pero altamente reactivas, como los son los aniones nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ) y peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Este grupo de moléculas recibe el nombre de especies reactivas de nitrógeno (ERNs) (Martínez Sánchez, 2005; Squadrito & Pryor, 1998).

No obstante, los radicales libres no son formados únicamente de manera endógena. La constante exposición a contaminantes atmosféricos como el humo del tabaco, productos químicos industriales, pesticidas y rayos UV pueden promover el aumento progresivo de EROs (Wulf, 2002).

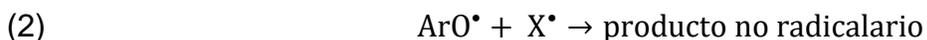
#### **1.2.1.2 Estrés oxidativo**

En general, todo organismo vivo mantiene un entorno intracelular de carácter reductor, el cual es preservado mayoritariamente por enzimas que mantienen el equilibrio redox en diversos procesos metabólicos que implican transferencia de electrones. Sin embargo, si los mecanismos generados internamente para mantener una condición fisiológica normal resultaran insuficientes, existirá un exceso de radicales libres y un aumento progresivo del contenido intracelular de EROs, lo que puede inducir un daño considerable a macromoléculas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas; alterando la funcionalidad y homeóstasis celular (Paniagua et al., 2004). Lo anterior, conocido como “estrés oxidativo” es el resultado del desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad de un sistema biológico de neutralizar rápidamente las especies reactivas intermediarias o reparar el daño resultante. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en el ser humano, lo que conduce al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cerebrovasculares, algunas formas de cáncer y la aceleración del proceso mismo de envejecimiento biológico (Corrales & Muñoz, 2012).

### 1.2.1.3 Antioxidantes

Los organismos vivos cuentan con diversos mecanismos de defensa que permiten controlar la generación de EROs. Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas, conocidas comúnmente como antioxidantes (Paniagua et al., 2004).

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retrasar la oxidación de otras moléculas, inhabilitando la propagación de las reacciones en cadena originadas por radicales libres al neutralizarlos, generando un aducto más estable. En general, existen dos mecanismos descritos: (i) transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) (reacciones 1-2) y (ii) de transferencia de electrones (ET) (reacciones 3-5).



En el mecanismo HAT, el antioxidante (ArOH) atrapa un radical (R•) por donación de átomos de hidrógeno, generando un producto no radicalario (RH) y un intermediario más estable químicamente (ArO•), el que a su vez puede reaccionar con un nuevo radical (X•) formando nuevamente una especie no radicalaria, siendo ésta última una reacción irreversible. Diversos estudios han reportado que este mecanismo es dependiente de la entalpía de disociación de enlace ( $\Delta H_D$ ): menores valores de  $\Delta H_D$  facilitarían la abstracción de un átomo de hidrógeno al necesitar menor energía para la disociación del enlace O-H. Así mismo, se ha observado que la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes pueden contribuir a reducir la  $\Delta H_D$ , facilitando la formación de un radical estable (Giacomelli et al., 2004; Siquet et al., 2006; Zhang et al., 2023). Por otra parte, en el mecanismo ET el antioxidante (ArOH)

puede donar un electrón al radical formándose el correspondiente anión ( $R^-$ ) y el catión radical del antioxidante ( $ArOH^{+\bullet}$ ); estas reacciones son dependientes del potencial de ionización ( $P_i$ ) y de la naturaleza del medio en el cual se lleven a cabo. En general, son utilizados solventes polares que presentan una constante dieléctrica relativamente alta, lo que facilita la ionización de la especie  $ArOH^{+\bullet}$  y la consecuente formación del intermediario  $ArO^\bullet$  (Benítez-Estrada et al., 2020; Foti et al., 2004).

## **1.2.2 Actividad Antimicrobiana**

### **1.2.2.1 Resistencia Antimicrobiana**

Las infecciones causadas por microorganismos patógenos multirresistentes constituyen una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2001). En los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha evaluado una serie de estrategias para contener el problema que supone la constante aparición de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales y los altos costos asociados a la investigación requerida, lo que limita el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos (Acuña, 2003). En Chile, del total de medicamentos comercializados, un 4% corresponde a antibióticos, cuya venta se distribuye en diferentes presentaciones farmacéuticas: de uso parenteral, oral, oftálmico y ótico (Organización Panamericana de la Salud, 2019). En la actualidad, se calcula que aproximadamente el 40% de todos los pacientes hospitalizados reciben tratamiento con antibióticos. Sin embargo, la falta de información y pruebas necesarias conlleva a una determinación poco fiable de la infección, siendo injustificada la prescripción del fármaco en casi un tercio de los diagnósticos pudiendo además ocasionar reacciones adversas y potenciales toxicidades al paciente (Medellín, 2011). Por lo anterior, existe un creciente interés en la búsqueda de terapias antimicrobianas alternativas a los tratamientos comúnmente aplicados, en condiciones respetuosas con el medio ambiente y que presenten baja toxicidad.

## **1.2.2.2 Patógenos de importancia clínica**

### **1.2.2.2.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus* es un género de bacterias grampositivas que comprende más de 40 especies diferentes. Los estafilococos se encuentran principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas, siendo comúnmente asociados con infecciones oportunistas (Pasachova Garzón et al., 2019). *Staphylococcus aureus* es la especie más patógena en humanos y capaz de causar un espectro de infecciones del tracto respiratorio debido a su capacidad para expresar una resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, especialmente a fármacos de tipo  $\beta$ -lactámicos.

El principal mecanismo de resistencia de este tipo de microorganismo es a través de la producción de ciertas enzimas ( $\beta$ -lactamasas) las cuales, hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo  $\beta$ -lactámico, inhibiendo la acción del antibiótico sobre el microorganismo (Moreno et al., 2009). Se calcula que la mitad de todas las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, meticilina, tetraciclina y eritromicina. Esto deja al antibiótico vancomicina como el único medicamento efectivo disponible en la actualidad (Zhang et al., 2023).

### **1.2.2.2.2 *Escherichia coli***

Las enterobacterias abundan la flora intestinal de los seres humanos, además de ser microorganismos ubicuos en la naturaleza, encontrándose tanto en ambientes terrestres como acuáticos.

La familia *Enterobacteriaceae* suma un total de 238 especies, siendo los géneros *Klebsiella*, *Salmonella* y *Escherichia* algunos de los más conocidos. Algunas de estas cepas son la causa principal de patologías cuya gravedad depende principalmente de la virulencia de cada especie y de las características del hospedador (Dubreuil, 2020). Dentro de las bacterias comúnmente asociadas a infecciones gastrointestinales se encuentra la *Escherichia coli*. En pacientes inmunodepresivos, dicho microorganismo puede producir infecciones de diversa

severidad en las vías urinarias además de colitis, meningitis e incluso sepsis, alcanzando una tasa de mortalidad que alcanza los 2 millones de personas por año por lo que se considera uno de los patógenos más versátiles y de mayor relevancia para el ser humano (Enciso-Martínez et al., 2022).

#### **1.2.2.2.3 *Pseudomona aeruginosa***

*Pseudomona aeruginosa* es un bacilo gramnegativo que se encuentra ampliamente en la naturaleza, el suelo y el agua. Clasificado como un patógeno oportunista, este microorganismo no afecta mayormente a huéspedes sanos, pero en pacientes con afecciones subyacentes o inmunocomprometidas puede causar cuadros infecciosos importantes como neumonía. Es responsable de al menos un 10% de todas las infecciones nosocomiales en todo el mundo además de infecciones del tracto urinario y bacteriemia (Makky et al., 2023). Prospera en condiciones que serían adversas para muchas otras bacterias, pudiendo sobrevivir con una fuente mínima de carbono y en un ambiente húmedo. Además, es intrínsecamente resistente a muchas clases de agentes antimicrobianos, pudiendo adquirir genes de resistencia adicionales de otros microorganismos e incluso eliminar la flora competidora (Planet, 2023).

#### **1.2.2.3 Mecanismos de acción antimicrobianos**

Existen múltiples mecanismos descritos para compuestos que exhiben actividad antibacteriana (Moreno et al., 2009). Según el efecto sobre los microorganismos, los antibióticos se clasifican en bacteriostáticos (inhibición de la proliferación o crecimiento) y bactericidas (causar la muerte del microorganismo a través de la lisis celular). En general, dependiendo de la diana afectada, los antimicrobianos se clasifican en:

1. Agentes que inhiben la síntesis de peptidoglucano, afectando la organización estructural de la pared celular bacteriana ( $\beta$ -lactámicos, glucopéptidos).
2. Agentes que actúan directamente sobre la membrana citoplasmática, afectando el paso de iones y macromoléculas, provocando la muerte celular (poliximinas).

3. Inhibidores de la síntesis de proteínas fundamentales, atacando directamente a la unidad funcional ribosomal en diferentes etapas del proceso (aminoglucósidos).
4. Inhibidores de la síntesis de ADN, ya sea interfiriendo en el proceso de replicación, impidiendo la transcripción o la síntesis de metabolitos esenciales (quinolonas).
5. Inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas, que actúan impidiendo la acción de estas enzimas bacterianas; siendo compuestos que carecen de actividad antimicrobiana intrínseca son administrados en conjunto con antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

### **1.3 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son un grupo de moléculas que se encuentran ampliamente en frutas, hortalizas y otros cultivos alimentarios, siendo metabolitos secundarios producidos naturalmente en las plantas los cuales desempeñan un papel esencial en diversos procesos biológicos (Vidal Gutiérrez et al., 2020). En general, participan en procesos de señalización ante factores de estrés biológicos y medioambientales, protegiendo a la planta del ataque de fitopatógenos, insectos u herbívoros; así como de estresores ambientales como la luz UV, escasez de agua, salinidad del suelo, entre otros (Peralta-Pérez & Volke, 2012; Shen et al., 2022).

Así, la dieta humana incluye una variedad de alimentos ricos en compuestos fenólicos los cuales, ejercen diversos efectos beneficiosos para la salud. Numerosos estudios han reportado la actividad antioxidante de estos compuestos, pudiendo prevenir el daño causado por los radicales libres a través de: eliminación de EROs, activación de enzimas antioxidantes o la inhibición de oxidasas (Zapata et al., 2014).

#### **1.3.1 Estructura y distribución de los polifenoles**

Los compuestos fenólicos han sido ampliamente estudiados dada su importancia en la salud humana y aplicaciones terapéuticas. Se encuentran distribuidos principalmente en el reino vegetal como metabolitos secundarios involucrados en funciones ecológicas (acción defensiva) e interacciones entre especies, siendo sustancias químicas que presentan en su estructura uno o más anillos aromáticos

con al menos un grupo hidroxilo (OH) (Fernández-Pachón et al., 2006). Estos compuestos se conocen además como “polifenoles” y pueden clasificarse en diversos grupos en función del número y la localización de los sustituyentes OH, así como de la naturaleza y extensión de la alquilación y/o glicosilación de estos grupos.

Los flavonoides constituyen la subclase de polifenoles más abundante, siendo compuestos de bajo peso molecular, caracterizados por presentar una estructura base conformada de dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Figura 3-I). A su vez, existen varios subgrupos de flavonoides, cuya clasificación se define en función del grado de saturación del anillo heterocíclico C y de la posición del anillo B. Por ejemplo, los flavonoles se caracterizan por poseer un grupo ceto en posición 4 y un OH en posición 3, además de una insaturación del anillo C entre los carbonos 2 y 3 (Figura 3-II). La quercetina es un flavonol que se encuentra presente en altas concentraciones tanto en frutas como en verduras en especial en la cebolla, siendo el flavonoide más abundante y habitual en la dieta humana. El té y el vino son también alimentos ricos en flavonoles (Heim et al., 2002).

Por otra parte, las flavonas presentan el mismo esqueleto base que los flavonoles, a excepción de la presencia del grupo OH en posición 3 (Figura 3-III). Son los flavonoides menos abundantes en los alimentos, encontrándose en algunas verduras como alcachofas, perejil y apio; y en frutas como la granada (Swanson, 2003). Por su parte, las flavanonas (análogos de las flavonas) poseen el anillo C saturado (Figura 3-IV) y se encuentran principalmente en cítricos, siendo mayor su contenido en el albedo de la fruta. Finalmente, las isoflavonas son isómeros de las flavonas, al presentar el grupo fenilo en posición 3 (Figura 3-VI). La mayoría de las leguminosas contienen cantidades significativas de isoflavonas, siendo la soja y los porotos verdes las fuentes más comunes (Quiñones et al., 2012).

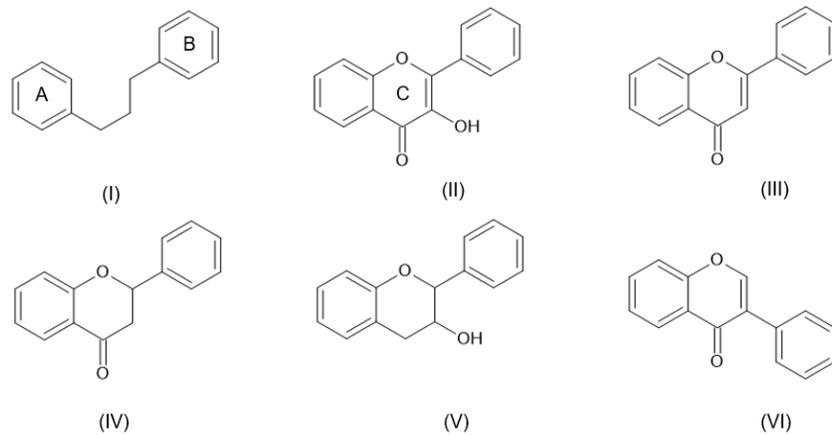


Figura 3. Estructura química básica de diferentes familias de polifenoles. (I) flavonoide, (II) flavonol, (III) flavona, (IV) flavanona, (V) flavanol y (VI) isoflavona.

Por otra parte, los flavanoles presentan un grupo OH en posición 3 del anillo C saturado (Figura 3-V). Algunas frutas y productos como el vino, chocolate y el té son una fuente importante de dichos compuestos. Estas estructuras pueden encontrarse en forma de monómeros (catequinas), oligómeros (procianidinas) y polímeros (taninos). Los taninos pueden subclasificarse en hidrolizables (formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico (Figura 4-I), y azúcares simples) y condensados (polímeros de antocianidinas).

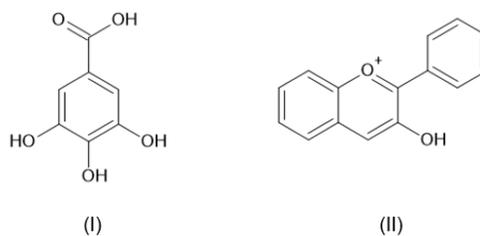


Figura 4. Estructura química de (I) ácido gálico y (II) antocianidina.

Las antocianidinas (Figura 4-II) son pigmentos hidrosolubles hallados en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, violeta o azul a hojas, flores y frutos. Se encuentran principalmente en forma de glucósidos (antocianinas) siendo hidrolizados por enzimas para la generación de azúcares importantes en el metabolismo de la planta (Swanson, 2003).

Otro grupo importante de polifenoles son los estilbenos (Figura 5-I), caracterizados por presentar una estructura base del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>. El resveratrol (Figura 5-II) es el estilbenoide más estudiado, siendo una importante fitoalexina producida por las plantas en respuesta al ataque de bacterias y hongos patógenos. Se encuentra presente en algunas frutas como arándanos, moras, frambuesas y principalmente en la piel de las uvas.

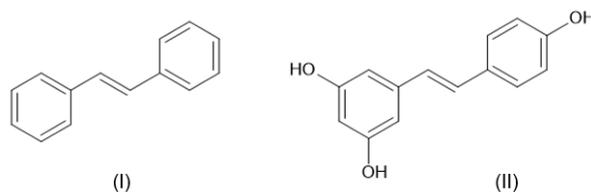


Figura 5. Estructura química de (I) estilbenoide y (II) resveratrol.

Finalmente, los ácidos hidroxicinámicos (AH) juegan un papel clave en la formación de otros compuestos fenólicos más complejos (Figura 6). Están formados básicamente por un anillo aromático, sustituido por uno o más grupos OH, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. Por lo general, se encuentran esterificados en la pared celular vegetal, siendo difíciles de extraer por métodos convencionales. Sin embargo, es posible encontrar algunas estructuras solubles como el ácido cafeico, siendo el compuesto predominante en la naturaleza. Los AH están presentes en diversos alimentos y bebidas de origen vegetal, como café, yerba mate, manzanas y ciruelas. Otros ejemplos de esta familia de compuestos son el ácido p-cumárico, ferúlico y sinápico.

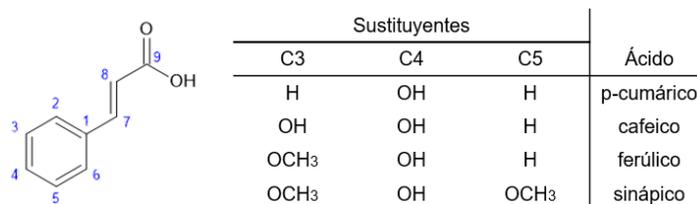


Figura 6. Principales ácidos hidroxicinámicos encontrados en la naturaleza.

### **1.3.2 Polifenoles como agentes antioxidantes**

Una alta ingesta de polifenoles puede proporcionar efectos beneficios para la salud. Diversos estudios han demostrado que el consumo de alimentos ricos en quercetina o miricetina puede frenar la progresión de la resistencia a la insulina en pacientes diagnosticados con diabetes tipo II. Por otra parte, los flavonoides pueden interactuar con una variedad de proteínas diana para regular las vías de señalización del crecimiento celular, otorgar protección contra enfermedades cardiovasculares o generar una respuesta antiinflamatoria (Li et al., 2014). Algunos experimentos *in vitro* han demostrado que estas estructuras pueden inhibir la proliferación de células cancerígenas y la oxidación del ADN (Bogucka-Kocka et al., 2008). Adicionalmente, los flavonoides participan en diversos mecanismos celulares que implican reacciones de óxido-reducción, siendo considerados antioxidantes naturales. Algunos mecanismos antioxidantes descritos para flavonoides involucran la eliminación directa de EROs a través de la donación de átomos de hidrógeno, donde la configuración de los grupos OH es el determinante más relevante de la capacidad de eliminación de estas especies radicalarias (Agati et al., 2012). A su vez, la activación de enzimas antioxidantes como oxidorreductasas o la inhibición de oxidasas permitiría generar múltiples respuestas ante una condición de estrés oxidativo (Shen et al., 2022).

### **1.3.3 Compuestos fenólicos como agentes antimicrobianos**

Los compuestos fenólicos son moléculas capaces de suprimir una serie de factores de virulencia microbiana. En particular, los flavonoides ejercen su mecanismo de acción a través de la formación de complejos con proteínas extracelulares de la pared bacteriana causando lisis celular (Guil-Guerrero et al., 2016). Por otro lado, los ácidos fenólicos de bajo peso molecular ejercen efectos antimicrobianos por la difusión del ácido no disociado a través de la membrana, lo que conduce a la acidificación del citoplasma y, en algunos casos, a la muerte del microorganismo (Nikmaram et al., 2018). Las proantocianidinas exhiben diferentes mecanismos, incluyendo la desestabilización y permeabilización de la membrana citoplasmática, la inhibición de enzimas microbianas extracelulares y la privación de los sustratos

necesarios para el crecimiento microbiano, como el hierro y el zinc. A su vez, los taninos actúan inhibiendo enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano y privando al microorganismo de los sustratos necesarios para su crecimiento. De manera general, la lipofilia de los compuestos polifenólicos, el grado de sustitución de grupos OH (hidroxilo) y OMe (metoxilo) de los anillos aromáticos y la saturación de la cadena lateral son factores determinantes en la actividad antimicrobiana (Saavedra et al., 2010).

En función a los antecedentes mencionados anteriormente, el presente estudio se centra en la revalorización de una fuente vegetal hasta ahora desaprovechada con potencial actividad biológica como lo son las hojas de chía (*Salvia hispanica* L.), considerando la presencia de metabolitos secundarios de relevancia científica como los polifenoles y de la posible aplicabilidad de los extractos foliares en la formulación de nuevos agentes terapéuticos.

## **2 Hipótesis**

Los extractos de hoja de chía presentan actividad antioxidante y antibacteriana, fundamentada principalmente en el sinergismo generado por los compuestos polifenólicos que se encuentran en mayor concentración en las hojas de *Salvia hispanica* L.

## **3 Objetivo general**

Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de chía (*Salvia hispanica* L.) de genotipos de semilla negra y blanca, y el efecto del sinergismo entre polifenoles presentes en mayor proporción.

## **4 Objetivos específicos**

1. Realizar la extracción de las hojas de los fenotipos de semilla blanca y negra mediante maceración a temperatura ambiente utilizando para ello solventes de polaridad creciente (extracción seriada).
2. Estudiar la capacidad antioxidante de los extractos seriados de hojas, cultivadas el año 2020, mediante las técnicas ORAC-FL y ORAC-PGR.
3. Determinar el porcentaje de inhibición de radicales, mediante la técnica de DPPH, para 8 extractos diferentes.
4. Estudiar una posible sinergia o antagonismo sobre la capacidad antioxidante de la combinación de ácido rosmarínico y cafeico, siendo los polifenoles presentes en mayor proporción cuantificados en los extractos.
5. Estudiar la capacidad antimicrobiana de los extractos seriados mediante el método de difusión en agar.
6. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos mediante el método de dilución en placa.
7. Realizar un fraccionamiento del mejor extracto de la serie y evaluar la actividad biológica atribuible a familias de compuestos.

## **5 Materiales y métodos**

### **5.1 Cultivo, muestreo y tratamiento de la muestra**

Las plantas de *Salvia hispanica* L. fueron cultivadas en el campo experimental Pan de Azúcar ubicado en las proximidades del Centro Regional de Investigación INIA Intihuasi, en las cercanías de La Serena, Chile. Se sembraron dos genotipos diferentes de semilla de chía (blanca y negra) comerciales a comienzos de enero del 2020. El tiempo de riego estimado fue de 40 – 80 minutos con una frecuencia de 3 – 5 días, en función a la demanda de agua requerida por la planta. El muestreo se realizó en junio del 2020 donde, se recolectaron entre 3 – 4 plantas las cuales se congelaron a -80°C para su transporte a Santiago. Luego, las hojas fueron separadas de cada planta y secadas en estufa a 35°C, hasta peso constante. Finalizado el tratamiento anterior, las hojas fueron trituradas en un mortero de porcelana y almacenadas a temperatura ambiente, resguardadas de la luz, hasta su extracción.

### **5.2 Obtención de los extractos**

#### **5.2.1 Reactivos y materiales**

Se utilizó hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcEt) y etanol (EtOH) adquiridos de Sigma-Aldrich (Missouri, USA).

#### **5.2.2 Equipos e instrumentos**

Se utilizó un rotavapor Buchi R-200 con un baño de calefacción B-491 (Flawil, Suiza) y un horno de secado WTB Binder n° 940162 (Tuttlingen, Alemania).

#### **5.2.3 Maceración**

##### **5.2.3.1 Fundamento teórico**

La maceración es uno de los métodos convencionales más utilizados para la extracción de sustancias bioactivas. El procedimiento es sencillo de realizar; se utilizan equipos simples y a bajo costo. Principalmente, consiste en colocar la matriz sólida o material biológico en contacto con un solvente o menstuo, durante cierto periodo de tiempo (Duarte-Trujillo et al., 2020). El rendimiento cuantitativo y

cualitativo de la extracción dependerá en gran medida de la polaridad del solvente escogido, siendo los más utilizados los de naturaleza hidroalcohólica, pudiendo emplear también mezclas de dos o más solventes. Por otra parte, factores como la naturaleza y composición química de los compuestos bioactivos de interés, así como la concentración del solvente, temperatura y el tiempo de contacto influirán considerablemente en la eficiencia del método (Soto-García & Rosales-Castro, 2016).

### 5.2.3.2 Protocolo experimental

Para la obtención de los extractos se llevó a cabo una maceración a temperatura ambiente utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente: a partir de una masa inicial de hojas de chía secadas a 35°C hasta peso constante, se añadió un volumen suficiente de hexano (HEX), dejando reposar el macerado por alrededor de 24 horas. Luego, el sobrenadante fue concentrado en un rotavapor y finalmente secado al vacío hasta peso constante. La masa foliar fue nuevamente macerada en hexano, repitiendo el procedimiento descrito hasta agotamiento de la matriz donde, se sumaron los extractos obtenidos en cada fase de extracción para ser almacenados en un único vial, hasta su uso (Figura 7).

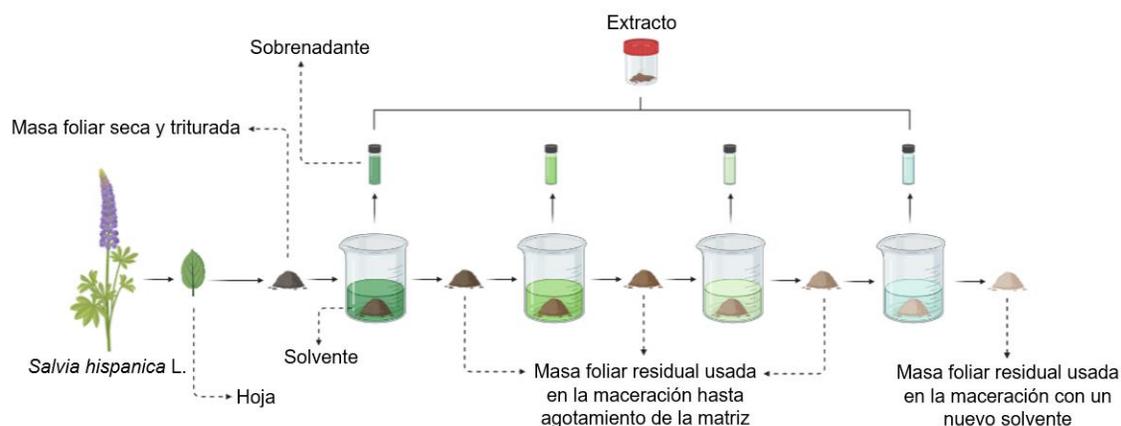


Figura 7. Esquema de la extracción seriada realizada por maceración, utilizando solventes de polaridad creciente

Posteriormente, se repitió el procedimiento completo para la misma muestra vegetal residual utilizando diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcEt) y etanol (EtOH), obteniendo así un total de 8 extractos seriados procedentes de hoja de chía de

genotipo negra (N): HEX-N, DCM-N, AcEt-N, EtOH-N y blanca (B): HEX-B, DCM-B, AcEt-B y EtOH-B.

### **5.3 Actividad biológica**

#### **5.3.1 Reactivos y materiales**

En los ensayos de capacidad antioxidante se utilizaron los siguientes reactivos: AAPH (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)), fluoresceína (FL) (3',6'-dihidroxispiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanten]-3-ona), pirogalol rojo (PGR) (1,1-dioxido de 3',4',5',6'-tetrahidroxispiro[benzo[c][1,2]oxatiol-3,9'-xanteno]), Trolox (TX) (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Placas de 96 pocillos de poliestireno blanco y transparente.

Por otra parte, para las pruebas de actividad antimicrobiana se utilizó: agar y caldo Müller-Hinton adquiridos de Condalab (Madrid, España), ampicilina (AP) en polvo para solución inyectable del laboratorio DFM Pharma (La Reina, Chile), moxifloxacino (MX) adquirido en Medinova Farma (Huechuraba, Chile) y dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido de Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro marca Pidiscat (Barcelona, España).

#### **5.3.2 Equipos e instrumentos**

Para los ensayos de capacidad antioxidante se utilizó un espectrofotómetro de placa BioTek modelo Synergy HT (Vermont, USA), balanza analítica Precisa 40SM-200A (Gotinga, Alemania). En los ensayos de capacidad antimicrobiana se utilizó un gabinete de bioseguridad clase II marca BIOBASE (Wolfenbüttel, Germany), autoclave vertical clase N modelo STV-A35II marca Bioevopeak (Shandong, China), pHmetro digital de bancada modelo HI2212 marca Hanna Instruments (Padova, Italia), incubadora marca Memmert modelo UM500-SS (Büchenbach, Alemania), patrones de turbidez de equivalencia McFarland marca Thermo Scientific (Waltham, USA), pie de metro digital de 150 mm, marca genérica.

### 5.3.2.1 Capacidad antioxidante

#### 5.3.2.1.1 Determinación de la capacidad de absorción de radicales centrados en oxígeno (ORAC-FL)

##### 5.3.2.1.1.1 Fundamento teórico

La capacidad de absorción de radicales centrados en oxígeno (ORAC) adaptado para utilizar sondas fluorescentes resulta en el método analítico *in vitro* más utilizado en el estudio de la capacidad antioxidante de compuestos, alimentos y muestras biológicas (Zapata Díez & Zapata Ocampo, 2019). El ensayo ORAC se basa en la capacidad que tienen ciertas moléculas de inhibir la formación de radicales peroxilo a partir de la degradación térmica del azo-compuesto AAPH, siendo especies reactivas comparables a las generadas biológicamente en el organismo (Schaich et al., 2015). Como resultado de la reacción entre los radicales y la molécula sonda es posible medir la degradación oxidativa de la fluorescencia a través del tiempo, configurando un área bajo la curva (Figura 8).

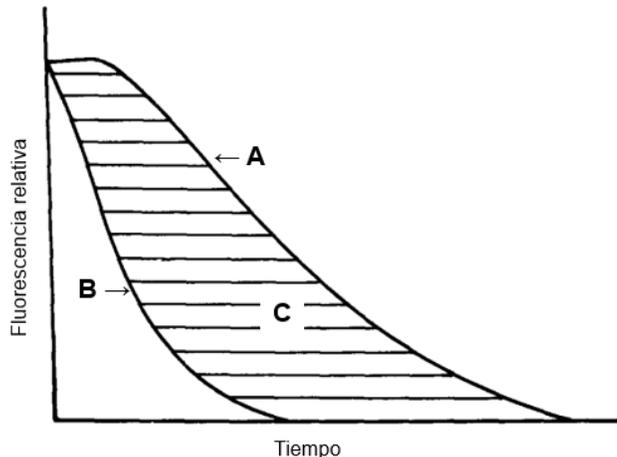


Figura 8. Perfil cinético de un ensayo ORAC-FL. (A) curva de decaimiento de la fluorescencia en presencia de un antioxidante, (B) blanco y (C) área de protección neta bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia en presencia de un antioxidante.

En presencia de compuestos con actividad antioxidante, el área bajo la curva incrementa en forma lineal y proporcional a la concentración de estos siendo la

donación de átomos de hidrógeno el principal mecanismo de acción (HAT) (Ou et al., 2001).

El ensayo ORAC originalmente utilizó ficoeritrina como sonda (Figura 9-1), una proteína cromófora, perteneciente a la familia de las ficobiliproteínas; presente en las algas rojas y que emite una fluorescencia de tonalidad roja-anaranjada (Lang et al., 2024). Sin embargo, en la actualidad se ha privilegiado el uso de la fluoresceína (FL) como molécula diana (Figura 9-2), al ser un colorante orgánico hidrosoluble con un característico color intenso amarillo-verdoso, cuya síntesis resulta relativamente sencilla siendo además un compuesto muy asequible de conseguir comercialmente, lo que la convierte en una herramienta de medición más efectiva (López-Alarcón & Lissi, 2006).

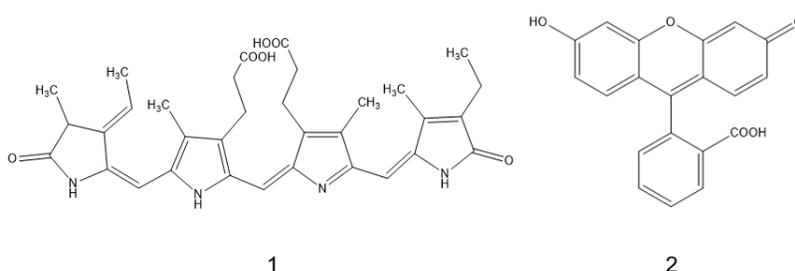


Figura 9. Estructura química de la (1) ficoeritrina y (2) fluoresceína.

Por otra parte, se utiliza un antioxidante de referencia conocido como Trolox (Figura 9-3), siendo un análogo del  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (Figura 9-4). Debido a su naturaleza hidrosoluble y su amplia disponibilidad comercial el Trolox (TX) es universalmente empleado como estándar en curvas de calibración aplicadas en estudios de capacidad antioxidante (Huang et al., 2005).

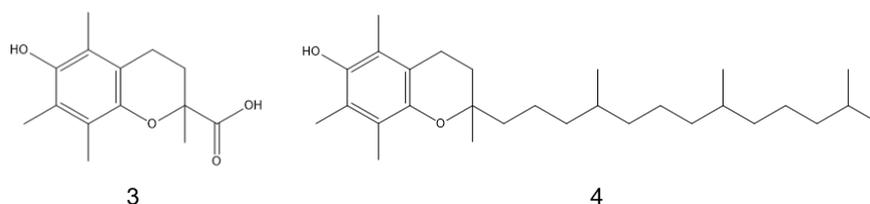


Figura 10. Estructura química del (3) Trolox y (4)  $\alpha$ -tocoferol.

#### **5.3.2.1.1.2 Protocolo experimental**

El análisis ORAC-FL se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Ou et al., (2001). Se utilizó un lector de placas BioTek multimodo modelo Synergy HT y placas de 96 pocillos de poliestireno blanco en la cual se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de FL (24  $\mu\text{M}$ ) y 25  $\mu\text{L}$  de cada extracto (10 mg/mL), por triplicado. La placa se incubó durante 15 min a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de una solución de AAPH (18 mM). La fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 528 nm, registrando los valores cada 60 segundos, por un tiempo total de 120 minutos. Para el blanco se procedió de igual manera, reemplazando la muestra con 25  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato (pH = 7,4).

Adicionalmente, se preparó una curva de calibrado de TX como antioxidante de referencia utilizando concentraciones comprendidas entre 5  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  donde, se midió el decaimiento de la fluorescencia en el tiempo configurando un área bajo cada curva (ABC) la cual fue normalizada e integrada mediante el programa Origin Pro-8.5 SR2 (Origin Lab Corporation, Washington, EUA). La capacidad antioxidante se expresó como valores de ORAC-FL ( $\mu\text{mol-eq TX}/100\text{ g extracto seco}$ ).

#### **5.3.2.1.2 Determinación de la capacidad de absorción de radicales centrados en oxígeno (ORAC-PGR)**

##### **5.3.2.1.2.1 Fundamento teórico**

En particular, el ensayo ORAC podría considerarse como un índice que mide la calidad de los antioxidantes presentes en una muestra. Lo anterior, se logra estableciendo una relación entre valores obtenidos al aplicar la metodología modificando únicamente el tipo de molécula diana utilizada. Un ejemplo de ello ha sido el uso de rojo de pirogalol (PGR) como sonda (López-Alarcón & Lissi, 2006) (Figura 11).

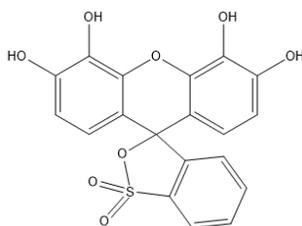


Figura 11. Estructura química del compuesto PGR.

Este compuesto de origen sintético, de tonalidad marrón-rojiza, presenta una banda característica con un máximo de absorción a 540 nm lo que permite evaluar, en el rango del espectro visible, la actividad antioxidante de un compuesto o matriz compleja (Atala et al., 2009).

#### 5.3.2.1.2.2 Protocolo experimental

El análisis ORAC-PGR se llevó a cabo siguiendo el método descrito por López-Alarcón y Lissi, (2006). Se utilizó un lector de placas BioTek multimodo modelo Synergy HT y placas de 96 pocillos de poliestireno transparente en la cual se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de PGR (70  $\mu\text{M}$ ) y 25  $\mu\text{L}$  de cada extracto (10 mg/mL), por triplicado. La placa se incubó por 2 minutos a 40°C. Finalizado el tiempo de incubación se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de una solución de AAPH (18 mM). La absorbancia fue medida a 540 nm, registrando los valores cada 35 segundos por un tiempo total de 120 minutos. Para el blanco se procedió de igual manera, reemplazando la muestra con 25  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato (pH = 7,4).

Se preparó una curva de calibrado de TX como antioxidante de referencia utilizando concentraciones comprendidas entre 85,87  $\mu\text{M}$  y 515,25  $\mu\text{M}$ . La capacidad antioxidante se expresó como valores de ORAC-PGR ( $\mu\text{mol-eq TX}/100\text{ g extracto seco}$ ). Las ABC de cada espectro de absorbancia fueron tratadas como se describe en el punto 5.3.2.1.1.2.

### 5.3.2.1.3 Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

#### 5.3.2.1.3.1 Fundamento teórico

El uso de radicales libres estables a temperatura ambiente como el DPPH permite una medida directa y rápida de la capacidad antioxidante mediante espectrofotometría. En solución metanólica, el compuesto (DPPH) presenta inicialmente una coloración violeta al encontrarse en su forma oxidada. Sin embargo, en presencia de un agente antioxidante se genera una reacción de transferencia electrónica (ET) donde, la solución se tornará amarilla debido a la presencia del grupo picrilo (forma reducida) (Figura 12), presentando una banda de absorción característica a 517 nm (Prevc et al., 2013).

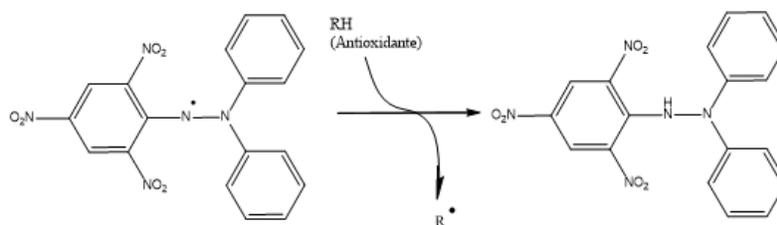


Figura 12. Mecanismo de reacción entre el radical DPPH y un antioxidante (RH).

Es posible, por tanto, cuantificar la capacidad antioxidante mediante espectrofotometría en función de la pérdida de absorbancia del radical (Andzi Barhé & Feuya Tchouya, 2016)

#### 5.3.2.1.3.2 Protocolo experimental

Se evaluó la capacidad antioxidante siguiendo el método descrito por Foti et al., (2004) con algunas modificaciones. Se utilizó un lector de placas BioTek multimodo modelo Synergy HT y placas de 96 pocillos de poliestireno transparente en la cual se adicionaron 190  $\mu$ L de DPPH (40 mg/L) y 10  $\mu$ L de cada extracto (5 mg/mL, por triplicado). La placa se incubó por 15 minutos a 25°C. Finalizado el tiempo de incubación, se leyó la absorbancia a 517 nm. Para el blanco se procedió de igual manera, utilizando únicamente DPPH (40 mg/L). La actividad antioxidante se expresará como un porcentaje de inhibición (%PI) el cual corresponderá a la

capacidad del extracto, a una determinada concentración, de inhibir cierta cantidad de radical DPPH, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$(1) \quad \%PI = \left( \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{extracto}}}{A_{\text{blanco}}} \right) * 100$$

Donde  $A_{\text{extracto}}$ : absorbancia exhibida por el extracto;  $A_{\text{blanco}}$ : absorbancia exhibida por el blanco (en ausencia de extracto).

## **5.4 Estudio del sinergismo o antagonismo en mezclas de polifenoles más abundantes en los extractos**

### **5.4.1 Fundamento teórico**

Los extractos naturales contienen una amplia variedad de componentes entre los que destacan terpenos, fenoles y ácidos orgánicos. Diversos estudios realizados sobre mezclas de extractos sugieren que existe sinergismo entre algunos de los fitocompuestos presentes (Pineda Alonso et al., 1999). El sinergismo está basado en la combinación de metabolitos: a través de interacciones sinérgicas o aditivas, se genera un efecto potenciado que, comparada a la de los compuestos por separado resulta mucho mayor. Lo anterior, se traduce en una mejora de los efectos terapéuticos, realzando la actividad biológica. Sin embargo, en ocasiones se presenta el efecto contrario como consecuencia de interacciones entre moléculas o iones con propiedades fisicoquímicas similares, siendo una acción antagónica el resultado de un efecto combinado resultante entre dos o más especies el cual es inferior a la suma del efecto individual de cada una por separado, disminuyendo la acción biológica esperada (Jaramillo, 2006).

### **5.4.2 Protocolo experimental**

A partir de estudios previos realizados por el grupo de investigación sobre extractos de hoja chía cultivada en el año 2015 se determinó que los ácidos cafeico (AC) y rosmarínico (RO) se encuentran en mayor proporción en los extractos. El rango de concentraciones elegido comprende la mínima y máxima concentración cuantificada de CA y RO, encontrada en los extractos de hoja de chía cultivada el año 2020.

A partir de ello, se evaluó el efecto de un posible sinergismo o antagonismo de la combinación de ambos compuestos sobre la CA mediante el uso de la herramienta Combeneft, seleccionando el enfoque estadístico de Independencia de Bliss (Di Veroli et al., 2016). La CA se evaluó mediante la metodología ORAC-FL, descrita en el punto 5.3.2.1.1.2 para cada combinación. El intervalo de concentraciones evaluado para AC fue de 0,62 – 2,47 mg/g de extracto seco y para RO comprendió concentraciones entre 0,11 – 72,04 mg/g de extracto seco (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación de AC y RO en los extractos seriados de hoja de chía cultivada el año 2020. Datos extraídos de estudios realizados previamente por el grupo de investigación (Zúñiga-López et al., 2021).

Extracto	AC mg/g de extracto seco	RO mg/g de extracto seco
HEX-N	0,631 ± 0,001	0,71 ± 0,01
HEX-B	0,62 ± 0,01	1,08 ± 0,01
DCM-N	1,234 ± 0,001	0,575 ± 0,007
DCM-B	1,7469 ± 0,001	0,11 ± 0,06
AcEt-N	1,818 ± 0,001	21,2 ± 0,2
AcEt-B	2,47 ± 0,02	29,75 ± 0,04
EtOH-N	0,82 ± 0,001	72,04 ± 0,01
EtOH-B	0,73 ± 0,02	63,9 ± 0,9

## 5.5 Capacidad antimicrobiana

### 5.5.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas para los ensayos de actividad antimicrobiana fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25992 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853. Para cada microorganismo, se tomó una crioperla de los cultivos frescos criopreservados a -70°C y se sembró mediante la técnica de agotamiento por estríado en placas Petri desechables con agar Müller-Hinton (AMH). Luego, las placas se incubaron durante 18 - 24 horas a 37°C. La pureza de los cultivos se determinó por inspección visual de colonias y tinción de Gram.

## **5.5.2 Método de difusión en agar**

### **5.5.2.1 Fundamento teórico**

Dentro de los métodos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de productos naturales o sintéticos se encuentra la técnica de difusión por discos en agar. El método se basa en el descrito originalmente por Bauer et al., (1959) y se encuentra estandarizado y recomendado por el NCCLS. Se utiliza un cultivo puro del microorganismo patógeno distribuyéndolo homogéneamente sobre la superficie de un medio de cultivo para luego depositar discos de papel filtro de 6 mm de diámetro embebidos con la sustancia a analizar. Así, por difusión, se generará un gradiente de concentración de la muestra alrededor del disco formando un halo de inhibición, de presentarse actividad antimicrobiana.

Caracterizada por su sencillez y rapidez, esta metodología permite estudiar la sensibilidad bacteriana in vitro, donde se obtienen resultados principalmente cualitativos. El diámetro del halo obtenido dependerá de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco. Además, factores como el espesor de la capa de agar, el pH, la composición del medio de cultivo, las condiciones de incubación y la velocidad de crecimiento del microorganismo deben considerarse para garantizar la correcta aplicación del método (Cona, 2002).

### **5.5.2.2 Protocolo experimental**

Se evaluó la capacidad antimicrobiana siguiendo el método descrito por Bauer et al. (1959), con algunas modificaciones. Se tomaron de 3 – 5 colonias morfológicamente similares del cultivo de referencia (5.5.1) y se suspendieron en solución salina (NaCl) al 0,9%, ajustando la turbidez del inóculo a  $1,5 \times 10^8$  cel/mL (equivalente a 0,5 en la escala de McFarland). Luego, se tomaron 100  $\mu$ L de la suspensión ajustada de cada microorganismo de prueba y se sembraron en superficie en medio AMH. Transcurridos 5 minutos, se colocaron discos de papel filtro estériles de 6 mm de diámetro impregnados con 10  $\mu$ L de extracto. Como control negativo se utilizó DMSO al 5%. Las placas fueron incubadas durante 18 - 24 horas a 37°C. Posteriormente, se realizó la lectura de los halos de inhibición del crecimiento

bacteriano mediante un pie de metro, registrando los resultados en milímetros (mm). Los ensayos se realizaron en triplicado (Figura 13).

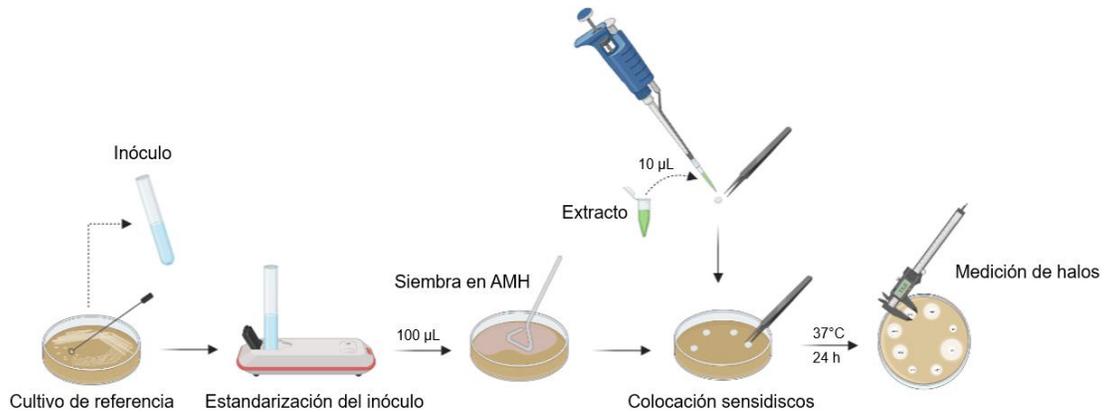


Figura 13. Esquema de trabajo para la determinación de la capacidad antimicrobiana por el método de difusión en agar.

### 5.5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

#### 5.5.3.1 Fundamento teórico

Los métodos de dilución en caldo como las pruebas de susceptibilidad microbiana son utilizados principalmente para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la mínima concentración de antimicrobiano que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (Andrews, 2001).

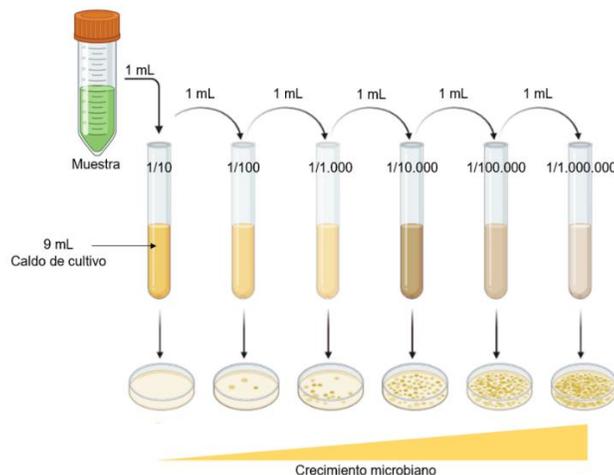


Figura 14. Representación de una determinación de CMI por macrodilución.

En general, son utilizados tubos (macrodilución) (Figura 14) o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes de la muestra a evaluar. El microorganismo ensayado es inoculado en los diferentes tubos o pozos donde, la CMI es determinada finalizada la incubación.

#### **5.5.3.2 Protocolo experimental**

La CMI de los extractos fue determinada siguiendo la metodología recomendada por la NCCLS (Lorian, 1996). Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos disponiendo inicialmente 100  $\mu$ L de caldo Müller-Hinton (CMH) en cada micropozo. Luego, en el pocillo n°1 se añadieron 100  $\mu$ L de extracto previamente disuelto en DMSO al 5%. Luego, de este pocillo se tomaron 100  $\mu$ L y se llevaron al pocillo n°2, realizando sucesivamente microdiluciones seriadas en base 1:2, disminuyendo gradualmente la concentración del extracto. El rango de concentraciones evaluadas para cada extracto fue de 4.096 – 8 ( $\mu$ g/mL).

Para la preparación del inóculo, se tomaron de 3 – 5 colonias morfológicamente similares del cultivo de referencia (5.5.1) y se suspendieron en solución salina (NaCl) al 0,9%, ajustando la turbidez del inóculo a  $3,0 \times 10^8$  cel/mL

(equivalente a 1,0 en la escala de McFarland). Luego, se sembraron 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana estandarizada en cada pocillo. Se incluyó como control positivo el medio de cultivo inoculado con la cepa estudiada. Como control de esterilidad se utilizó el medio de cultivo sin inocular. Cada experimento se realizó en triplicado (Figura 15).

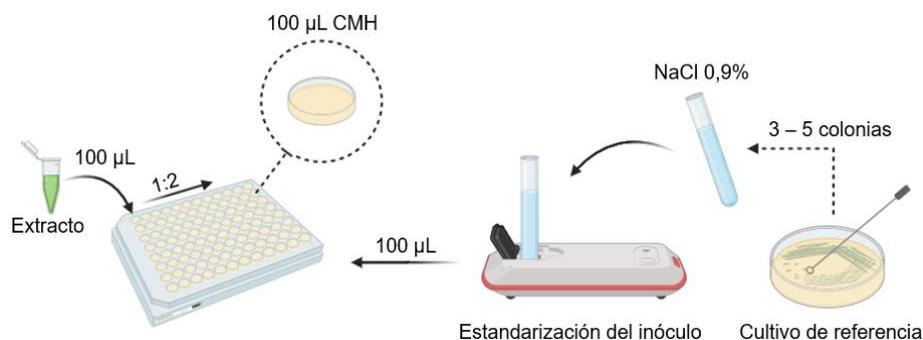


Figura 15. Esquema de trabajo para la determinación de la CMI por microdilución.

Cada placa fue incubada durante 18 – 24 horas, a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó la lectura de las placas en un lector de microplaca, Multiskan GO Thermo Scientific a 530 nm.

## 5.6 Realizar un fraccionamiento del extracto que exhiba la mejor actividad biológica de la serie, siendo esta atribuible a familias de compuestos

### 5.6.1 Reactivos y materiales

Se utilizó acetonitrilo (AcN) y ácido acético glacial adquiridos de Sigma-Aldrich (Missouri, USA).

### 5.6.2 Equipos e instrumentos

El análisis del perfil fenólico de las muestras se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) marca Jasco serie PU-4180 (Tokio, Japón). Se utilizó una columna semipreparativa Ascentis C18 (15 cm x 10 mm) de la marca Sigma-Aldrich (Missouri, USA).

El fraccionamiento de los extractos se llevó a cabo con un colector de fracciones Advantec HF122SC (California, USA).

Para la liofilización de las fracciones se utilizó un liofilizador modelo DC401, Yamato Scientific Co. (Tokyo, Japón).

### **5.6.3 Fundamento teórico**

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es un método físico de separación utilizado para caracterizar y cuantificar muestras complejas. El objetivo principal de esta técnica analítica es la separación basada en las interacciones entre cada componente de la muestra y las dos fases del sistema cromatográfico, denominadas fase móvil y fase estacionaria. La elección de las fases dependerá de la naturaleza de la muestra y de los compuestos que deben aislarse, considerando su estructura, polaridad y solubilidad. A su vez, la técnica HPLC permite purificar y recoger las cantidades deseadas de cada compuesto, utilizando un colector de fracciones situado después de la celda de flujo del detector. Este proceso se denomina cromatografía preparativa (Lucas Tenório et al., 2022).

En la cromatografía preparativa se acopla un colector de fracciones con el propósito de recoger selectivamente el eluato. El equipo es capaz de recolectar fracciones automáticamente según el orden de flujo de los componentes después de la separación de la muestra, según la señal de inicio y final del pico cromatográfico del instrumento, o según el tiempo acorde a un programa preestablecido (Aranyi, 2000).

### **5.6.4 Protocolo experimental**

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis del perfil fenólico del(los) extracto(s) que exhibe(n) la mayor actividad biológica de toda la serie, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Además, se configuró un programa de elución en gradiente, utilizando una fase móvil compuesta de acetonitrilo (A) y ácido acético al 2% (B); el flujo fue de 1 mL/min. Los cromatogramas fueron registrados a 278 y 322 nm. El volumen de inyección fue de 1,0 mL.

La muestra de inyección se preparó a una concentración de 10 mg/mL, utilizando agua Milli-Q como solvente. Para la identificación de los polifenoles se elaboró una batería de estándares cuya concentración fue de 2 mg/mL. Luego, se procedió a inyectar la muestra fortificada con la mezcla de estándares, para la corroboración de los compuestos presentes en los extractos, obteniendo cromatogramas que

luego fueron comparados al obtenido por los estándares en forma individual para la identificación de polifenoles presentes y sus tiempos de retención.

Luego, se llevó a cabo el fraccionamiento del(los) extracto(s) recolectando un total de 20 fracciones por cada uno. Las fracciones obtenidas fueron liofilizadas a  $-45^{\circ}\text{C}$  y 30 Pa; una vez deshidratadas se almacenaron protegidas de la luz, en condiciones de refrigeración, hasta su utilización. Finalmente, se llevó a cabo el estudio de sensibilidad microbiana descrito en el punto 5.5.2.2, para cada fracción obtenida.

## 6 Resultados

### 6.1 Objetivo específico 1. Realizar la extracción de las hojas de cada variante mediante maceración a temperatura ambiente utilizando para ello solventes de polaridad creciente (extracción seriada).

El mayor rendimiento de extracción se obtuvo para la fracción EtOH-N (22,35%), mientras que los extractos obtenidos a partir de hexano y acetato de etilo mostraron los menores rendimientos (Tabla 2). Por otra parte, los disolventes como el diclorometano y el etanol, de polaridad baja y alta respectivamente, fueron más eficientes.

Tabla 2. Rendimiento de la extracción por cada solvente utilizado, para los genotipos de hoja negra (N) y blanca (B).

Genotipo	Masa inicial (g)	Rendimiento de la extracción (%)			
		HEX	DCM	AcEt	EtOH
N	13,14	6,61	15,23	1,56	22,35
B	13,84	7,92	10,76	0,91	19,12

Según lo reportado por Oldoni et al., (2019) la amplia variedad de estructuras químicas presentes en una matriz vegetal y la solubilidad que presenta cada clase de fitoquímicos puede explicar las diferentes capacidades de extracción observadas para los disolventes utilizados en el presente estudio (Oldoni et al., 2019).

Por otra parte, las plantas del género *Salvia* representan una fuente valiosa de compuestos activos como ácidos fenólicos, flavonoides y derivados los cuales suelen estar presentes en las partes aéreas de la planta (Sharifi-Rad et al., 2018b).

Por lo anterior, los resultados obtenidos corroboran la presencia de compuestos mayoritariamente polares, considerando una mayor eficiencia de extracción en etanol, debido a la presencia de sustituyentes OH en la estructura base de las especies bioactivas antes mencionadas (Duarte-Trujillo et al., 2020).

## 6.2 Objetivo específico 2. Estudiar la capacidad antioxidante de los extractos seriados de hojas de chía, cultivadas el año 2020, mediante las técnicas ORAC-FL y ORAC-PGR.

### 6.2.1 ORAC-FL.

Se observa que los extractos seriados de hoja de chía presentan actividad antioxidante al inhibir la oxidación de la sonda, inducida por radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) y/o alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ), a través de tiempos de inducción (Schaich et al., 2015) (Figura 16).

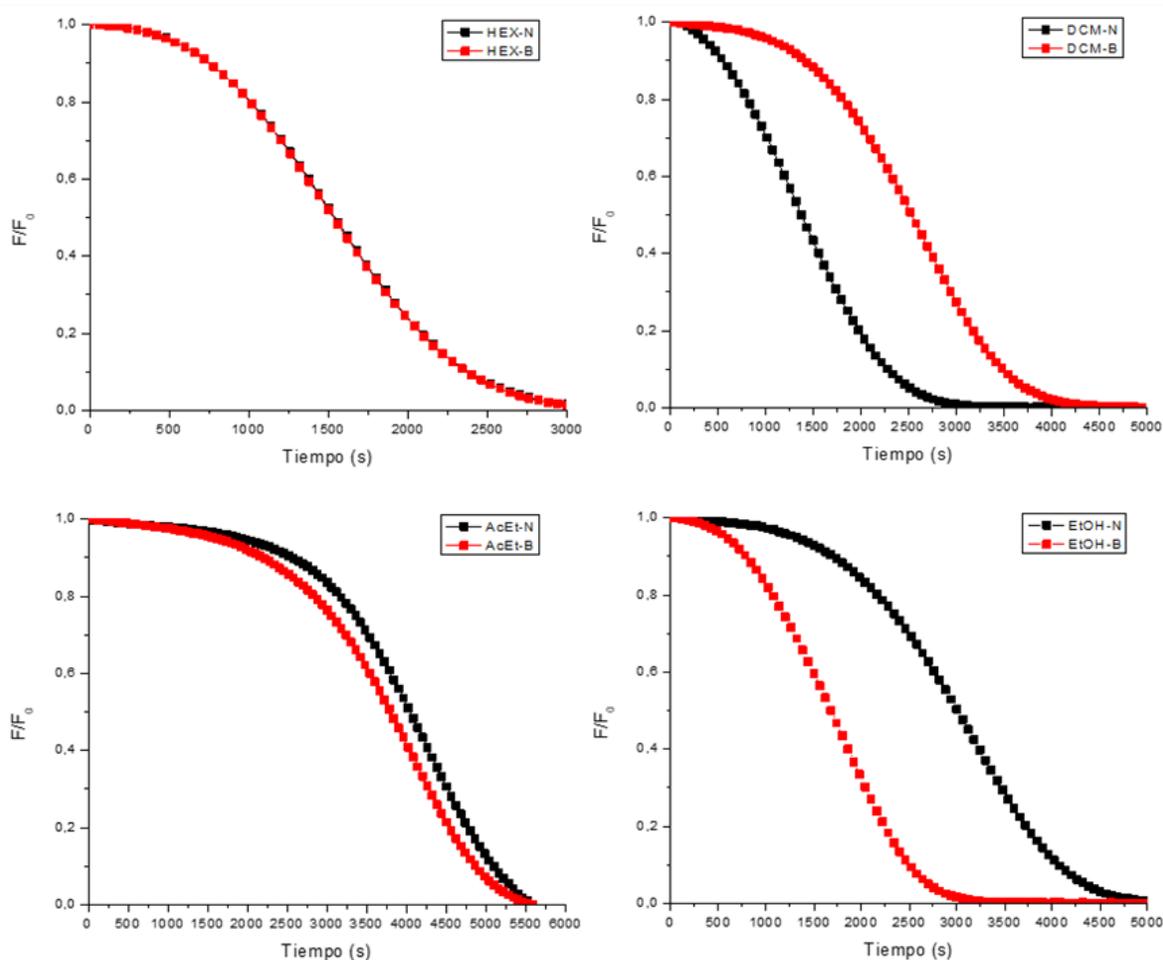


Figura 16. Curvas de decaimiento de la fluorescencia de la molécula sonda (FL) por efecto de radicales libres en presencia de cada extracto, para cada genotipo estudiado.

Luego, se calculó el ABC para cada concentración utilizada de TX al integrar las curvas de decaimiento de la sonda, normalizando previamente con respecto a la fluorescencia a tiempo 0 ( $F_0$ ) y restando el ABC del blanco. La curva de calibración resultante mostró una buena linealidad ( $r = 0,9961$ ) para el ensayo.

Al interpolar las ABC promedio obtenidas para cada extracto en la ecuación lineal de la curva de calibración de TX se obtuvieron valores de capacidad antioxidante expresados como  $\mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$  (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de ORAC-FL obtenidos para cada extracto.

Extracto	CA ( $\mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ )	
	N	B
<b>HEX</b>	1.737 $\pm$ 144	1.720 $\pm$ 97
<b>DCM</b>	1.889 $\pm$ 127	4.363 $\pm$ 504
<b>AcEt</b>	8.351 $\pm$ 900	7.628 $\pm$ 473
<b>EtOH</b>	5.635 $\pm$ 844	2.030 $\pm$ 233

A partir de los resultados obtenidos se observa que el extracto AcEt-N presentó el mayor valor de ORAC-FL de la serie ( $8.351 \pm 900 \mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ ) seguido de AcEt-B ( $7.628 \pm 473 \mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ ). Se evidencia una diferencia significativa entre los extractos etanólicos para cada genotipo, siendo la variante N la que presenta mayor capacidad antioxidante ( $5.635 \pm 844 \mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ ) superando en casi tres unidades a la variante B. Por otra parte, los extractos polares presentaron una baja CA en comparación al resto de la serie, siendo el extracto HEX-B el que presentó el menor valor ( $1.720 \pm 97 \mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ ).

Lo anterior da cuenta que el uso de solventes polares como el acetato de etilo permite la extracción de compuestos que presentan una mayor actividad antioxidante, siendo comparable a la de frutos como la ciruela morada ( $8.239 \pm 129 \mu\text{mol TX}/100 \text{ g muestra seca}$ ), la granadilla ( $8.668 \pm 799 \mu\text{mol TX}/100 \text{ g muestra seca}$ ) o la mandarina ( $8.998 \pm 295 \mu\text{mol TX}/100 \text{ g muestra seca}$ ), siendo reconocidos por su CA (Zapata et al., 2014).

Estos resultados indican la presencia de compuestos mayoritariamente polares, siendo la actividad antioxidante *in vitro* mediada por la capacidad de las estructuras presentes de inhibir la generación de radicales libres a través de la donación de átomos de hidrógeno, principalmente (Barclay & Vinqvist, 2003). Considerando que los valores más altos exhibidos de CA fueron para los extractos AcEt, sería correcto suponer que el potencial antioxidante se debe a la presencia de estructuras principalmente de naturaleza polifenólica.

La relación estructura-actividad de los polifenoles ha sido ampliamente estudiada, donde el grupo hidroxilo fenólico juega un papel clave en la capacidad de apagar radicales libres, así como el número y la posición de estos sustituyentes en el esqueleto base (Lv et al., 2021). Se ha reportado que la presencia de un grupo catecol en el anillo B domina la actividad antiradicalaria (Cheynier et al., 2010). Además, el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 en conjugación con una función 4 – oxo estabilizaría de mejor manera los radicales formados después de la abstracción de H, deslocalizando los electrones  $\pi$  (Lang et al., 2023). Por otra parte, Durán et al., (1993) y colaboradores señalan que el número de hidroxilos del anillo A no influiría en la actividad antioxidante.

Un estudio realizado por Huang y colaboradores demostró que los grupos hidroxilo en el anillo B y C de la quercetina son más efectivos para eliminar los radicales libres que los del anillo A (Figura 17); pudiendo formar complejos con iones metálicos ( $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ ) reduciendo así el efecto catalítico de estas especies activas en la generación de radicales libres, aumentando el efecto antioxidante (Huang et al., 2005). Además, la metilación de los hidroxilos del anillo B (especialmente 3' y/o 4') disminuye significativamente la actividad antioxidante (Maestro Durán & Borja Padilla, 1993).

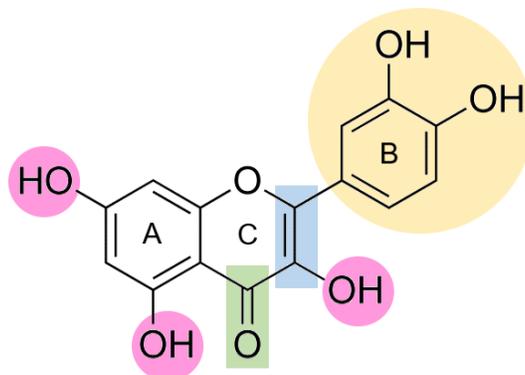


Figura 17. Funciones más relevantes en la estructura de un flavonoide (quercetina) en cuanto a la actividad antioxidante: grupo catecol o anillo B dihidroxilado (en amarillo). Presencia de una insaturación en el anillo C (en azul) y el grupo 4 – oxo (en verde). Grupo hidroxilo (en rosado).

Resulta importante señalar que los flavonoides presentes en las especies vegetales se encuentran principalmente como O-glucósidos los cuales, han sido reportados en la literatura científica como compuestos menos activos desde la perspectiva antioxidante (González-Sánchez et al., 2011; Zhao et al., 2014) donde la localización, estructura y número de los residuos glucosídicos ejercerían un efecto negativo sobre la actividad antioxidante (CA) *in vitro*, dado que el número de grupos OH disponibles se verían reducidos (Lang et al., 2024; Wen et al., 2017). Lo anterior, explicaría la disminución en el valor de la CA para los extractos etanólicos de hoja de chía para ambos genotipos comparada con la fracción AcEt, debido a la presencia de antioxidantes O-glicosilados como la isoquercetina y luteolina, siendo compuestos identificados en extractos de hoja de chía (Amato et al., 2015; Zúñiga-López et al., 2021) los cuales, exhiben una mejor solubilidad en agua y etanol que la aglicona, debido a la naturaleza hidrofílica de las fracciones de azúcar.

## 6.2.2 ORAC-PGR.

Al igual que para el ensayo ORAC-FL se calculó en primera instancia el ABC para cada concentración utilizada del antioxidante de referencia al integrar las curvas de decaimiento de la sonda, normalizando previamente con respecto a la absorbancia a tiempo 0 y restando el ABC del blanco. Al interpolar las ABC promedio obtenidas para cada extracto (Figura 18) en la ecuación lineal de la curva de calibración de TX para ORAC-PGR se obtuvieron valores de capacidad antioxidante expresados como  $\mu\text{mol-eq TX}/100\text{ g extracto seco}$  (Tabla 4).

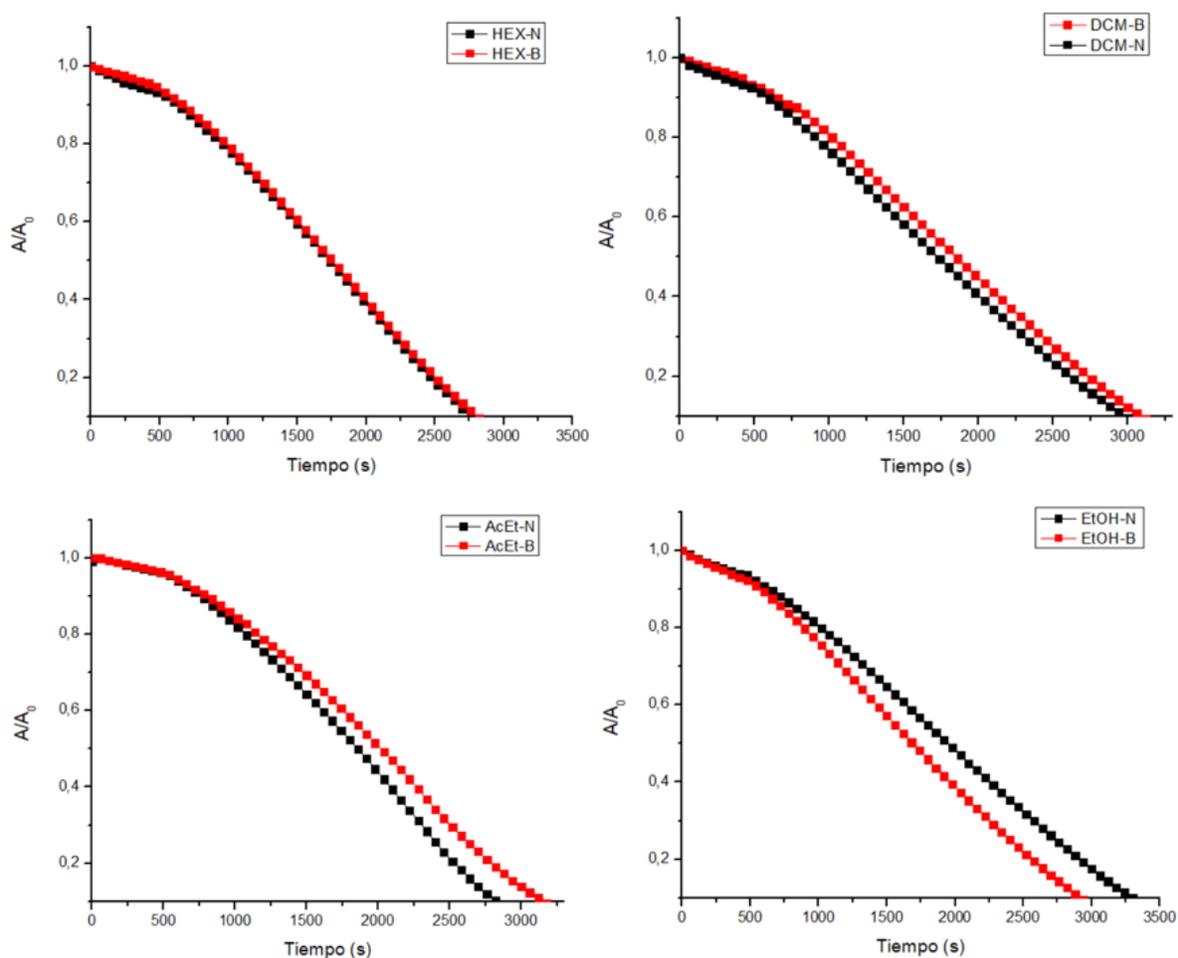


Figura 18. Curvas de decaimiento de la absorbancia de la molécula sonda (PGR) por efecto de radicales libres en presencia de cada extracto, para cada genotipo estudiado.

Tabla 4. Resultados de ORAC-PGR obtenidos para cada extracto.

Extracto	CA ( $\mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ )	
	N	B
<b>HEX</b>	268.905 $\pm$ 4.416	285.257 $\pm$ 25.156
<b>DCM</b>	178.134 $\pm$ 10.259	203.745 $\pm$ 31.439
<b>AcEt</b>	170.274 $\pm$ 22.783	390.209 $\pm$ 19.615
<b>EtOH</b>	362.184 $\pm$ 5.620	142.935 $\pm$ 25.563

Se observa nuevamente que los extractos de naturaleza polar presentan la mayor capacidad antioxidante (CA) de toda la serie. El extracto AcEt-B ( $390.209 \pm 19.615 \mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ ) exhibió la mayor CA seguido del extracto EtOH-N ( $362.184 \pm 5.620 \mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ ). Por otra parte, el extracto EtOH-B presentó el menor valor de CA ( $142.935 \pm 25.563 \mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ ), siendo comparable a la de los extractos DCM-N y AcEt-N. No hubo diferencias significativas entre genotipos para el extracto HEX, presentando ambas variantes una CA superior a los  $200.000 \mu\text{mol-eq TX}/100 \text{ g extracto seco}$ .

Los resultados dan cuenta que los valores ORAC son dependientes de la sonda empleada. Ya que, el extracto AcEt-N presenta el mayor valor de CA de la serie cuando se emplea FL como sonda (ORAC-FL) mientras que al utilizar PRG resulta en uno de los extractos menos activo. López-Alarcón y Lissi (2006) explicaron estas diferencias donde, los valores ORAC-FL estarían condicionados por factores estequiométricos mientras que los valores ORAC-PGR serían más dependientes de la reactividad dado que no se aprecian tiempos de inducción en las cinéticas de decaimiento, incluso en presencia de polifenoles muy reactivos.

Por lo que, el extracto AcEt-N presentaría una mayor concentración de estructuras de naturaleza polifenólica capaces de apagar radicales libres; sin embargo, la velocidad de reacción es más lenta y, por ende, menos reactivos que la sonda PGR. Por el contrario, el extracto AcEt-B exhibió los valores de ORAC-FL/PGR más altos de toda la serie, demostrando que la variante blanca (B) resulta más eficiente en cuanto a la extracción de compuestos que presentan actividad antioxidante donde,

la presencia de sustituyentes donadores de electrones que reducen la entalpía de disociación (BDE) del enlace O–H, aumentarían la velocidad de reacción con los radicales libres presentes en el medio así como la capacidad de donación de átomos de hidrógeno (Atala et al., 2009; Leopoldini et al., 2011).

Lo anterior da cuenta de la complementariedad de ambas técnicas, siendo una herramienta útil en la estimación de la CA de los extractos en estudio. Sin embargo, resulta necesario evaluar otras técnicas que permitan consolidar los resultados obtenidos mediante ORAC-FL/PGR.

### 6.3 Objetivo específico 3. Determinar el porcentaje de inhibición de radicales mediante la técnica de DPPH para cada extracto obtenido.

El análisis mediante la técnica de DPPH se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el punto 5.3.2.1.3.2. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 19.

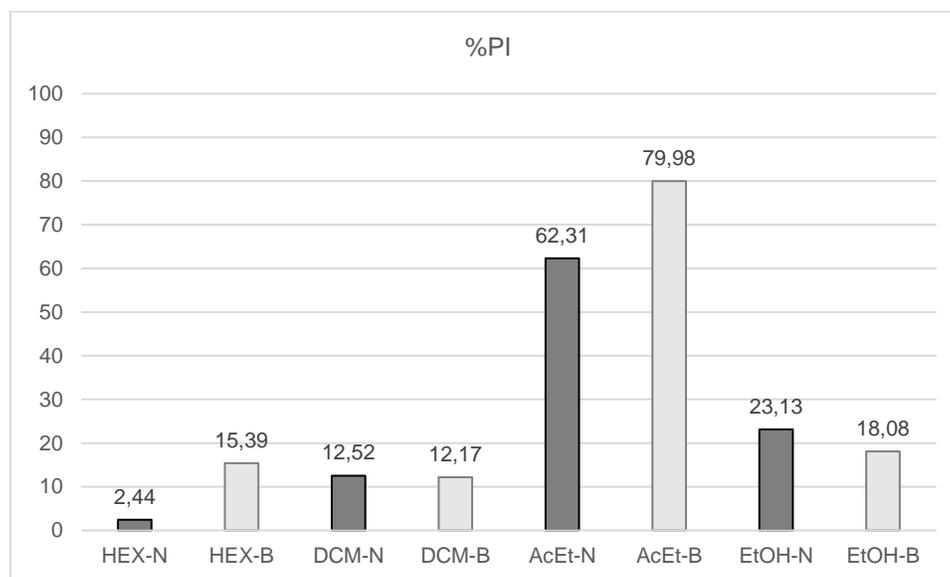


Figura 19. Resultados para el %PI de cada extracto.

Se observa que el extracto AcEt-B presenta el mayor apagamiento de radicales DPPH con un  $79,98 \pm 0,02\%$ , seguido de la variante N con un  $62,31 \pm 0,02\%$ . Caso contrario se observa para el resto de la serie, donde el %PI fue similar para los

extractos apolares y la fracción etanólica, las cuales no superaron en ningún caso el 25% de inhibición de radicales DPPH siendo el menor valor alcanzado por el extracto HEX-N ( $2,44 \pm 0,03\%$ ) en toda la serie.

Foti et al., (2004) atribuyeron la actividad antioxidante medida por este ensayo a la presencia de mecanismos de transferencia de electrones (ET) siendo el paso determinante de la velocidad de reacción la transferencia de electrones desde los aniones fenóxido hacia los radicales DPPH. Además, la estructura plana de algunos compuestos fenólicos permite la deslocalización electrónica (así como los efectos de resonancia) generando así especies radicalarias estables, lo que se traduce en una mayor actividad antioxidante (Andzi Barhé & Feuya Tchouya, 2016). Sin embargo, algunos autores atribuyen las reacciones DPPH principalmente a mecanismos HAT, siendo la abstracción del átomo de hidrógeno del ArOH neutro por DPPH una posible vía de reacción. Por otro lado, Prevc et al., (2023) mencionan que la naturaleza del disolvente es un factor determinante en la reactividad de los antioxidantes frente a los radicales libres. En disolventes apróticos no polares, prevalece la transferencia de átomos de hidrógeno desde un grupo hidroxilo (HAT) mientras que en disolventes polares, como metanol, etanol y agua ocurriría por transferencia de electrones (ET) desde el antioxidante ionizado (Prevc et al., 2013). Considerando que la solubilidad del radical DPPH es mayor en disolventes polares, el mecanismo HAT se convierte en una vía de reacción secundaria, considerando las interacciones del tipo puente de hidrógeno generadas con el solvente lo que interfiere con la liberación de átomos de H y, por tanto, prevalezca el mecanismo ET sobre HAT (Barclay et al, 1999, Foti et al, 2004).

Considerando los resultados obtenidos, es posible afirmar que la CA evaluada por las técnicas ORAC y DPPH dan cuenta del mayor potencial antioxidante de los extractos obtenidos utilizando AcEt como solvente de extracción, para ambos genotipos en estudio. Dicha actividad se ha atribuido a los múltiples mecanismos de acción ejercidos por los compuestos fenólicos presentes en la matriz vegetal.

**6.4 Objetivo específico 5. Estudiar una posible sinergia o antagonismo sobre la capacidad antioxidante de la combinación de ácido rosmarínico y cafeico, siendo los polifenoles presentes en mayor proporción cuantificados en los extractos.**

A partir de estudios previos realizados por el grupo de investigación sobre extractos de hoja chía cultivada en el año 2015 se determinó que los ácidos cafeico (AC) y rosmarínico (RO) se encuentran en mayor proporción en los extractos (2,47 mg/g extracto seco y 72,04 mg/g extracto seco, respectivamente). Así, el intervalo de concentraciones probadas para AC fue de 0,62 – 2,47 mg/g de extracto seco y para RO comprendió concentraciones entre 0,11 – 72,04 mg/g de extracto seco. Los resultados se muestran en las Figuras 20-21.

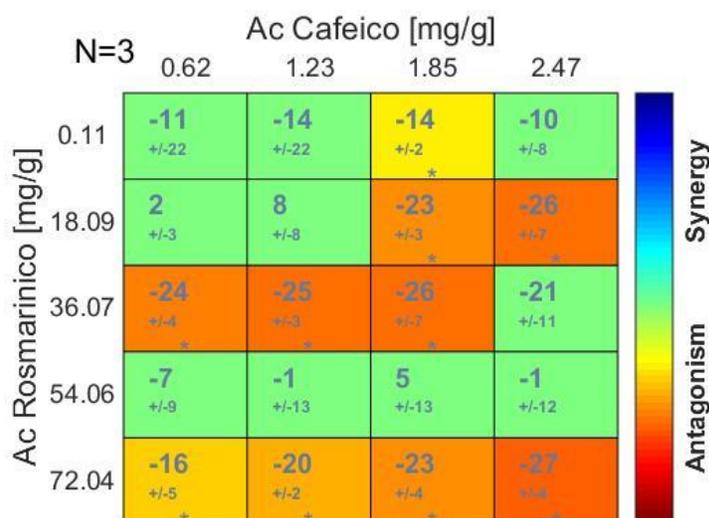


Figura 20. Matriz de combinación obtenida a partir de los valores de RO y CA en términos de sinergia o antagonismo, sobre la CA. (\*) combinaciones con significación estadística ( $p \leq 0,05$ ). Valores no significativos se muestran en verde. Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

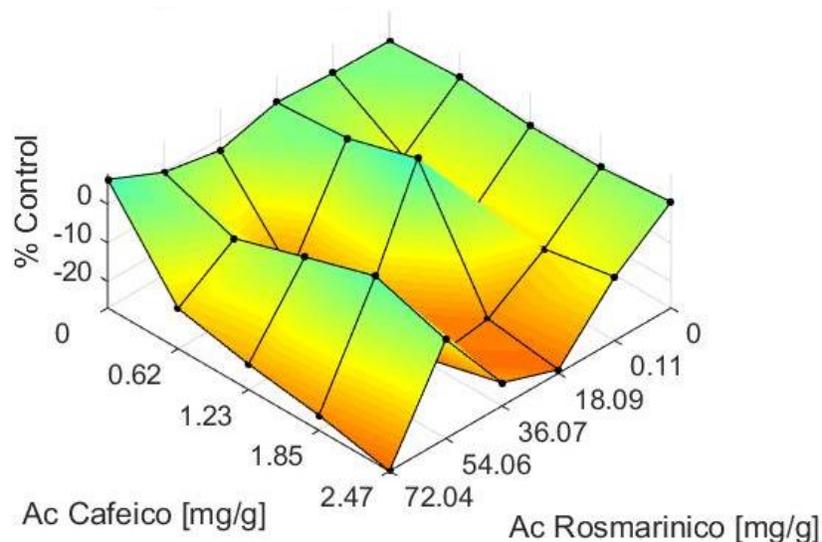


Figura 21. Gráfico de superficie de respuesta de la matriz de combinación obtenida a partir de los valores de RO y CA en términos de sinergia o antagonismo, sobre la CA

La matriz de combinación se obtuvo comparando los valores de CA registrados para cada punto de combinación considerando además que el modelo planteado por la Independencia de Bliss se basa en que el mecanismo de acción de ambos compuestos es independiente y no interfieren entre ellos. Se observa un efecto principalmente antagónico que aumenta proporcionalmente a la concentración de cada compuesto, posiblemente debido a interacciones químicas del tipo puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo. Lo cual, impide la interacción entre el radical libre y el hidrógeno lábil de los sustituyentes OH, disminuyendo la actividad antioxidante final en combinación. Así, para las concentraciones 72,04 mg RO/g de extracto seco y 2,47 mg AC/g de extracto seco, se observa el mayor efecto antagónico entre ambas especies sobre la CA ( $-27 \pm 4$ ) mientras que el menor valor alcanzado fue para la combinación de 0,11 mg RO/g de extracto seco y 1,85 mg AC/g de extracto seco.

Si bien estos compuestos se encuentran en mayor proporción en los extractos de hoja de chía estudiados es posible que otros metabolitos sean los responsables de la actividad antioxidante o que esta sea atribuible a los múltiples mecanismos simultáneos que se desarrollan en la matriz vegetal.

## 6.5 Objetivo específico 6. Estudiar la capacidad antimicrobiana de los extractos seriados mediante el método de difusión en agar.

La capacidad antimicrobiana medida mediante el método por difusión en agar se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el punto 5.5.2.2. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Lectura de los halos de inhibición obtenidos como resultado del ensayo de actividad antimicrobiana por difusión en agar.

		Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Extracto	HEX-N	11,34 ± 0,04	11,28 ± 0,07	10,78 ± 0,04
	HEX-B	11,37 ± 0,03	10,73 ± 0,05	10,80 ± 0,08
	DCM-N	13,33 ± 0,02	13,38 ± 0,03	13,24 ± 0,04
	DCM-B	14,74 ± 0,05	14,08 ± 0,03	13,68 ± 0,07
	AcEt-N	14,55 ± 0,04	14,59 ± 0,04	14,82 ± 0,03
	AcEt-B	14,64 ± 0,04	14,39 ± 0,04	14,24 ± 0,02
	EtOH-N	16,90 ± 0,07	17,10 ± 0,03	16,94 ± 0,03
	EtOH-B	16,57 ± 0,04	16,31 ± 0,04	16,32 ± 0,06
Control positivo	MX	21,23 ± 0,04	21,16 ± 0,04	21,14 ± 0,05
Control negativo	DMSO	n.i.	n.i.	n.i.

(n.i.) No hubo inhibición del crecimiento del microorganismo. MX = moxifloxacino. DMSO = dimetilsulfóxido.

La cepa *Escherichia coli* ATCC 25992 resultó ser más sensible al extracto EtOH-N (17,10 ± 0,03 mm). Así mismo, la sensibilidad frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fue mayor por parte de los extractos etanólicos en comparación con el resto de la serie. Por el contrario, la media del diámetro del halo de inhibición para los extractos apolares fue inferior a 15 mm para todas las cepas, presentando una moderada actividad antimicrobiana. Adicionalmente, ninguno de los extractos en estudio exhibió una actividad comparable a la del antibiótico de referencia MX, el cual alcanzó diámetros de inhibición superiores a 21 mm. A partir de los resultados obtenidos, se observa que

la capacidad antimicrobiana estaría estrechamente vinculada a la polaridad del solvente extractante y en la extracción de metabolitos de naturaleza fenólica.

Zúñiga-López et al. (2021) identificaron 18 metabolitos presentes en extractos secuenciales de hojas de chía (*Salvia hispanica* L.) de fenotipos de semilla blanca y negra donde, las fracciones más polares (EtOH y AcEt) permitieron la extracción de un mayor número de compuestos como fenoles simples (ácido protocatecuico), ácidos hidroxicinámicos (ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico y ácido clorogénico), flavonoides (kaempferol, genisteína, naringenina) y heterósidos (luteolina, vitexina, orientina) (Zúñiga-López et al., 2021). Por otro lado, se han propuesto diversos mecanismos de acción antimicrobiana ligada a la difusión de compuestos de naturaleza polifenólica, los que incluyen la inhibición de mecanismos enzimáticos, las interacciones inespecíficas con proteínas celulares que generan la desestabilización de la membrana y la fuga de los constituyentes celulares o la pérdida de la integridad de la pared celular bacteriana (Guil-Guerrero et al., 2016; Ravichandran et al., 2011; Ruiz-Aragón et al., 2019). Por lo anterior, la presencia de esta clase de compuestos podría explicar que los extractos etanólicos presentaron una mayor actividad antimicrobiana por sobre las fracciones apolares.

## 6.6 Objetivo específico 7. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos mediante el método de microdilución en placa.

La CMI fue evaluada para cada extracto siguiendo la metodología descrita en el punto 5.5.3.2. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados para la CMI de cada extracto.

		CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853
Extracto	HEX-N	n.i.	n.i.	n.i.
	HEX-B	n.i.	n.i.	n.i.
	DCM-N	n.i.	n.i.	n.i.
	DCM-B	4.096	4.096	4.096
	AcEt-N	4.096	8.192	8.192
	AcEt-B	4.096	8.192	8.192
	EtOH-N	2.048	2.048	4.096
	EtOH-B	4.096	4.096	4.096
Control positivo	AP	4	4	4
	MX	16	16	8

(n.i.) No hubo inhibición del crecimiento del microorganismo. AP = ampicilina. MX = moxifloxacino.

En general, los resultados obtenidos fueron homogéneos frente a las cepas ensayadas. Para los extractos apolares (HEX-N/B y DCM-N) no hubo inhibición del crecimiento microbiano a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, se observa que extracto EtOH-N presenta el menor valor de CMI de toda la serie donde, la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25992 se alcanzó a una concentración de 2.048  $\mu\text{g/mL}$ . Para los extractos DCM-B y EtOH-B la CMI fue la misma frente a todos los microorganismos ensayados (4.096  $\mu\text{g/mL}$ ). Las fracciones de AcEt resultaron más eficientes frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (4.096  $\mu\text{g/mL}$ ), independiente del genotipo estudiado. Finalmente, ninguno de los extractos exhibió una CMI comparable a la de los controles positivos.

A pesar del potencial antimicrobiano que presenta el extracto EtOH-N sobre las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25992, las altas concentraciones necesarias para la inhibición de los microorganismos resultan poco competitivas en comparación con los antibióticos sintéticos. Sin embargo, diversos estudios han propuesto la combinación de extractos naturales y antibióticos, observando diversas ventajas como: la disminución de los efectos secundarios del fármaco, así como de la resistencia exhibida por determinados microorganismos y el aumento de los efectos bacteriostáticos o bactericidas de los antibióticos; ofreciendo una alternativa en el tratamiento de infecciones en las que existe multirresistencia o hay posibilidades de fracaso en la aplicación de un solo fármaco (Aiyegoro & Okoh, 2009; Álvarez-Martínez et al., 2020; Atta et al., 2023; Ayaz et al., 2019).

Lo anterior, supone una propuesta interesante para estudios posteriores del grupo de investigación, con el fin de evaluar una posible alternativa terapéutica mediante el uso de extractos naturales a base de hoja de chía en combinación con antibióticos comerciales.

#### **6.7 Objetivo específico 8. Realizar un fraccionamiento del extracto que presente la mayor actividad biológica de la serie y evaluar la capacidad antimicrobiana, atribuible a familias de compuestos.**

Considerando los resultados obtenidos para la capacidad antimicrobiana, se decidió realizar el fraccionamiento del extracto EtOH-N. Para ello, la muestra fue analizada mediante HPLC preparativa. El sistema de HPLC se equipó con una columna preparativa Ascentis (C18, 5  $\mu$ m, 10 x 150 mm, Sigma-Aldrich), que funcionó a 20 °C con un caudal de 1 mL/min. Se utilizaron acetonitrilo (A) y ácido acético al 2% (B) como fases móviles, y el sistema se sometió al siguiente proceso de elución en gradiente: 2% A (0 – 6 min), 15% A (6 – 12 min), 25% A (12 – 20 min), 40% A (20 – 30 min), 50% A (30 – 35 min), 75% A (35 – 40 min), 85% A (40 – 45 min), 95% A (45 – 50 min), 100% A (50 – 60 min).

Los compuestos eluidos se monitorizaron en longitudes de onda de 278 y 322 nm, y los propios eluyentes se recogieron utilizando un colector de fracciones HF122SC (Advantec, Tokio, Japón), que funcionaba en modo temporizador (es decir, recogiendo el eluyente en un tubo cada 20 s). El colector de fracciones se conectó a un sistema de análisis de HPLC en línea y el proceso de fraccionamiento se inició 5 minutos después de la inyección de la muestra.

Se inyectó en el sistema una alícuota de muestra de 1 mL y se fraccionó en veinte porciones. En la Figura 22 se muestra el cromatograma del extracto EtOH-N, logrando una buena separación de la mezcla cruda. Se observan tres zonas con una buena resolución de picos, con tiempos de retención de 6,0 – 19,0 min (zona I), 28,0 – 36,0 min (zona II) y 49,0 – 51,0 min (zona III), logrando la identificación de 6 compuestos, principalmente en la zona II (Anexo V). Cada fracción fue liofilizada y resuspendida en DMSO al 5% para su uso en los ensayos de sensibilidad microbiana.

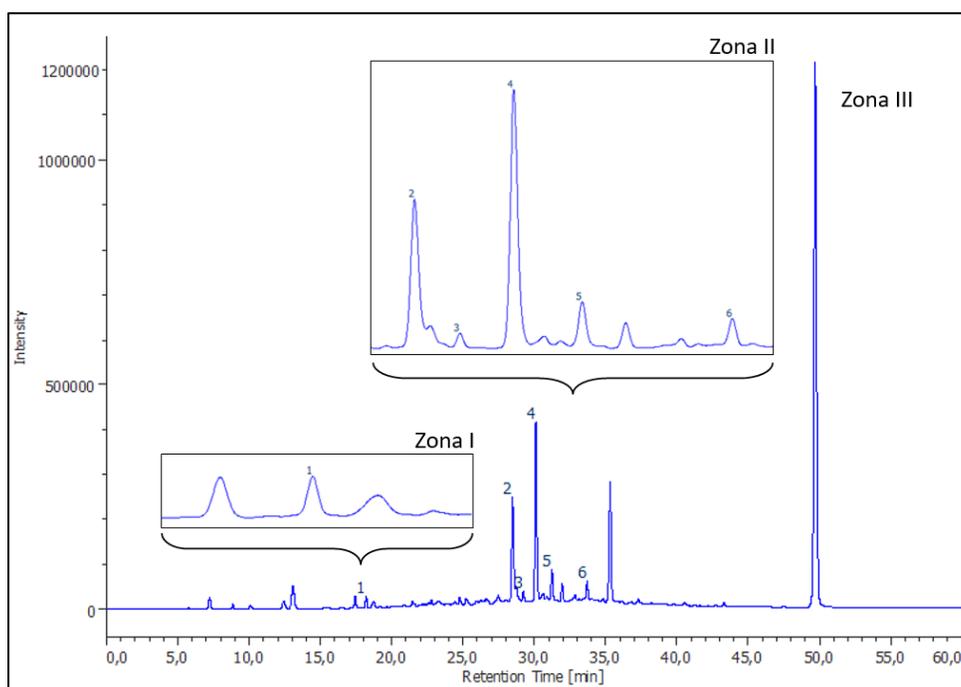


Figura 22. Cromatograma obtenido para el extracto EtOH-N.

Así, se llevó a cabo el método descrito en el punto 5.5.2.2. para cada fracción aislada individualmente del extracto EtOH-N. Los resultados se resumen en la Tabla 7. Se observa, que la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue sensible únicamente frente a las fracciones F8, F9, F10 y F17. Además, del total de 20 fracciones recogidas (Anexo VI), sólo la fracción F17 mostró una leve actividad antimicrobiana frente a los microorganismos ensayados, con excepción de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25992 ( $13,0 \pm 0,5$  mm). Al comparar estos resultados con la sensibilidad obtenida para EtOH-N ( $17,10 \pm 0,03$  mm) se observa que F17 contribuye en un 20 – 38% a la actividad antimicrobiana global del extracto.

Tabla 7. Lectura de los halos de inhibición obtenidos como resultado del ensayo de actividad antimicrobiana por difusión en agar para las fracciones que mostraron actividad frente a los microorganismos ensayados.

		Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853
Fracción	8	$8,5 \pm 0,5$	n.i.	n.i.
	9	$8,1 \pm 0,2$	n.i.	n.i.
	10	$9,1 \pm 0,2$	n.i.	n.i.
	17	$8,2 \pm 0,3$	$13,0 \pm 0,5$	$7,4 \pm 0,2$
Control positivo	MX	$21,9 \pm 0,1$	$21,5 \pm 0,4$	$21,1 \pm 0,2$
Control negativo	DMSO	n.i.	n.i.	n.i.

(n.i.) No hubo inhibición del crecimiento del microorganismo. MX = moxifloxacino.

Considerando los resultados anteriores, se realizó una caracterización cualitativa del perfil del aislado F17 mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de aluminio recubiertas de sílica RP-C18 (Merck, Alemania). En primera instancia, la muestra fue resuspendida en metanol (MeOH) y sembrada en el cromatofolio por contacto, utilizando capilares de vidrio. Se utilizaron estándares de ácido gálico (A), quercetina (Q) y apigenina (E) con la finalidad de comparar tentativamente la presencia de alguna de estas familias en F17. Una vez sembrados los patrones, la placa fue colocada en una cámara de CCF (Camag, Suiza) saturada con una fase móvil compuesta por MeOH/AcEt (1:1). El cromatofolio se dejó secar bajo campana a temperatura ambiente. Luego, se derivatizaron los componentes presentes en la CCF con el reactivo NP/PEG y se observaron bajo luz visible y luz

UV (365 nm). Finalmente, se realizó un registro fotográfico de la placa en las condiciones señaladas (Figura 23).

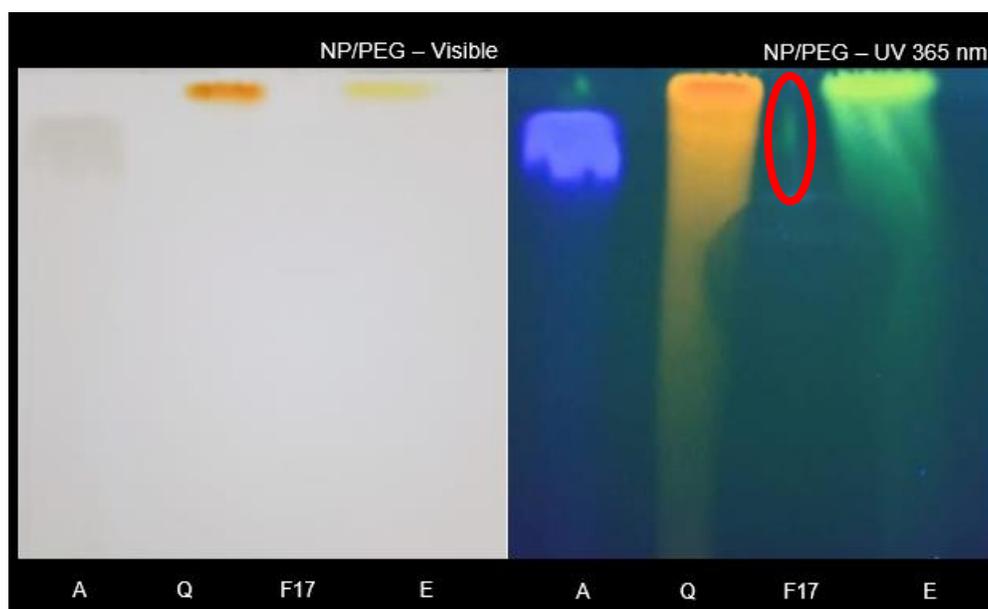


Figura 23. CCF de F17 utilizando el revelador NP/PEG. A la izquierda CCF analizado bajo luz visible. A la derecha CCF analizado bajo luz UV (365 nm). A = ácido gálico; Q = quercetina; F17 = fracción 17; E = apigenina.

Se observa que el perfil del compuesto presente en F17 presenta una tonalidad amarilla que correspondería a una flavona, siendo comparable al estándar apigenina (E) (Wagner & Bladt, 1996).

Finalmente, se buscó dilucidar una posible estructura para el aislado F17 mediante HPLC-MS/MS. Para ello, se utilizó una columna Kinetex de 1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA), con 0,1% de ácido fórmico en agua como disolvente A y acetonitrilo al 90% con un 0,1% de ácido fórmico como disolvente B. La elución en gradiente se optimizó de la siguiente manera: 12% B (0 – 1 min), 99% B (1 – 13,5 min), 12% B (13,5 – 15 min). El caudal fue de 0,4 mL/min y el volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{L}$ . Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se adquirieron en modo de detección de iones positivos en el rango de  $m/z = 50 - 400$  con una resolución establecida en 40.000 donde, la señal más intensa fue de  $m/z = 242,2839$  (Figura 24-A) y su patrón de fragmentación consistió en 3 picos de  $m/z = 186,2216$ ; 142,1592 y 100,1119 (Figura 24-B)

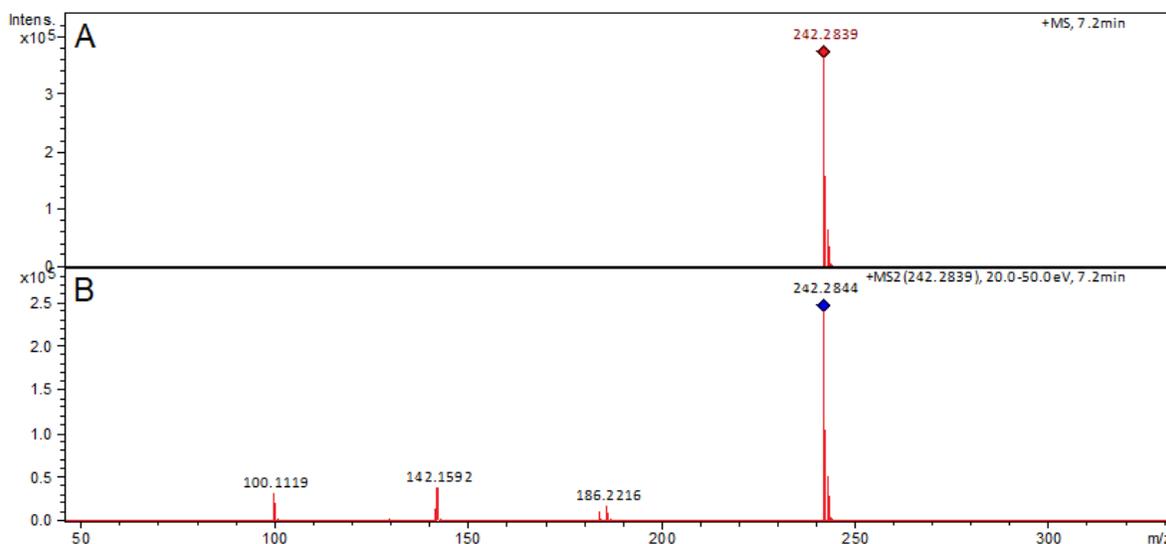


Figura 24. Espectro de masas para F17.

Al comparar los m/z con los registrados en la librería espectral MassBank of North America (MoNA), se identificaron tentativamente los compuestos de fórmula molecular  $C_{15}H_{13}O_3$  (241,2839 g/mol),  $C_{16}H_{33}O$  (241,2531 g/mol) y  $C_{16}H_{35}N$  (241,2769 g/mol).

En función a lo anterior, se observa que la fórmula molecular  $C_{15}H_{13}O_3$  podría eventualmente corresponder a una flavona cuyo esqueleto base es  $C_{15}H_{10}O_2$  pero, en el caso del compuesto en específico este se encontraría sustituido con al menos un grupo OH, concordante con lo determinado a través del tamizaje fitoquímico. Sin embargo, no es posible descartar con sólo este último estudio las restantes fórmulas moleculares presentadas. Por lo que, para futuros estudios sería interesante complementar estos últimos resultados mediante la utilización de otras técnicas como análisis elemental y resonancia magnética nuclear (RMN); logrando esclarecer con una mayor precisión la identidad de la molécula aislada en la fracción F17.

## 7 Conclusiones

Se logró satisfactoriamente la extracción secuencial de hoja de chía de genotipo de semilla negra y blanca, para el cultivo realizado el año 2020, donde el mejor rendimiento se obtuvo para los extractos etanólicos.

Adicionalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos, la capacidad antioxidante (CA) *in vitro*, el extracto AcEt-N presentó la mayor capacidad antioxidante en ORAC-FL. En cambio, el extracto AcEt-B mostró la mayor actividad medida a través de las técnicas ORAC-PGR y DPPH. Por lo cual, se presume que el uso del solvente acetato de etilo permite la extracción de una mayor cantidad de compuestos bioactivos con características antioxidantes.

Considerando los compuestos polifenólicos más abundantes en los extractos de hoja de chía, se determinó la existencia de un antagonismo en la combinación de los ácidos cafeico y rosmarínico frente a la contribución de la CA. Por lo cual, la capacidad antioxidante es atribuida a otros metabolitos presentes en la matriz vegetal como: flavonoides, compuestos heterósidos u otros ácidos hidroxicinámicos.

Asimismo, se determinó que el extracto EtOH-N presentó la mayor actividad antimicrobiana (AA) frente a las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25992 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853. Sin embargo, la CMI obtenida fue mayor en comparación con los antibióticos de referencia.

En base a lo anterior, la fracción F17 obtenida del extracto EtOH-N contribuye en un 20 – 38% a la AA global del extracto, logrando la identificación de un compuesto de masa molecular 241,28 g/mol mediante HPLC-MS/MS.

Finalmente, es posible concluir que los extractos de hoja de chía exhiben actividad antioxidante y antimicrobiana, siendo potencial su uso en la formulación de nuevos agentes terapéuticos o de su aplicación en la industria alimentaria. Además, resulta

necesario realizar estudios futuros enfocados en la relación estructura-actividad de los sistemas fenólicos que permitan comprender con mayor profundidad los mecanismos de acción responsables de estas propiedades biológicas.

## 8 Bibliografía

- Acuña, G. (2003). Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Rev Chil Infect*, 20(1), 7–10.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67–76. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2012.07.014>
- Ahmed, M., Ting, I. P., & Scora, R. W. (1994). Leaf Oil Composition of *Salvia hispanica* L. from Three Geographical Areas. *Journal of Essential Oil Research*, 6(3), 223–228. <https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9698368>
- Aiyegoro, O. A., & Okoh, A. I. (2009). Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1147–1152. <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Álvarez-Martínez, F. J., Barraji3n-Catal3n, E., Encinar, J. A., Rodr3guez-D3az, J. C., & Micol, V. (2020). Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Current Medicinal Chemistry*, 27(15), 2576–2606. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008115650>
- Amato, M., Caruso, M. C., Guzzo, F., Galgano, F., Commisso, M., Bochicchio, R., Labella, R., & Favati, F. (2015). Nutritional quality of seeds and leaf metabolites of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Southern Italy. *European Food Research and Technology*, 241(5), 615–625. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2488-9>
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5–16.
- Andzi Barh3, T., & Feuya Tchouya, G. R. (2016). Comparative study of the antioxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.048>
- Aranyi, A. (2000). 2.7 *High performance liquid chromatography (HPLC) and related techniques* (pp. 240–251). [https://doi.org/10.1016/S1464-3456\(00\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S1464-3456(00)80015-0)
- Atala, E., V3squez, L., Speisky, H., Lissi, E., & L3pez-Alarc3n, C. (2009). Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-

- pyrogallol red methodology. *Food Chemistry*, 113(1), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.063>
- Atta, S., Waseem, D., Fatima, H., Naz, I., Rasheed, F., & Kanwal, N. (2023). Antibacterial potential and synergistic interaction between natural polyphenolic extracts and synthetic antibiotic on clinical isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(3). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103576>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes Naturales y Mecanismos de Protección. *Atenea* 494, 161–172.
- Ayaz, M., Ullah, F., Sadiq, A., Ullah, F., Ovais, M., Ahmed, J., & Devkota, H. P. (2019). Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 308, pp. 294–303). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.050>
- Ayerza, R., & Coates, W. (2006). *Chia, Rediscovering a Forgotten Crop of the Aztecs*.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2022). *Chía: A Hidden Food of the Americas* (pp. 43–86). University of Arizona Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv29sfps7.7>
- Barclay, L. R. C., & Vinqvist, M. R. (2003). *Phenols as Antioxidants* (pp. 839–908). <https://doi.org/10.1002/0470857277.ch12>
- Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
- Bogucka-Kocka, A., Smolarz, H. D., & Kocki, J. (2008). Apoptotic activities of ethanol extracts from some Apiaceae on human leukaemia cell lines. *Fitoterapia*, 79(7–8), 487–497. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2008.07.002>
- Busilacchi, H., Qüesta, T., & Zuliani, S. (2015). La chía como una nueva alternativa productiva para la región pampeana Artículo de divulgación. *Agromensajes*, 41, 37–46.
- Cahill, J. P. (1996). Ethnobotany of chía, *Salvia hispánica* L. (Lamiaceae). In *Economic Botany* (Vol. 57, Issue 4).

- Cheynier, V., Schneider, R., Salmon, J.-M., & Fulcrand, H. (2010). Chemistry of Wine. In *Comprehensive Natural Products II* (pp. 1119–1172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00088-5>
- Cisternas, C., Farías, C., Muñoz, L., Morales, G., & Valenzuela, R. (2022). Composición química, características nutricionales y beneficios asociados al consumo de chía (*Salvia hispanica* L.). *Revista Chilena de Nutrición*, *49*(5), 625–636. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182022000600625>
- Cona, E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev Chil Infect*, *19*, 77–81.
- Corrales, L., & Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, *10*(18), 135–250.
- Di Sapio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., & Severin, C. (2012). Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, Fruto y Semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *11*(3), 249–268. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622739007>
- Di Veroli, G. Y., Fornari, C., Wang, D., Mollard, S., Bramhall, J. L., Richards, F. M., & Jodrell, D. I. (2016). Combenefit: An interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*, *32*(18), 2866–2868. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw230>
- Duarte-Trujillo, A. S., Jiménez-Forero, J. A., Pineda-Insuasti, J., González-Trujillo, C. A., & García-Juárez, M. (2020). Extraction of bioactive substances from *pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) by dynamic maceration. *Acta Biologica Colombiana*, *25*(1), 61–74. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>
- Dubreuil, J. D. (2020). Fruit extracts to control pathogenic *Escherichia coli*: A sweet solution. *Heliyon*, *6*(2), e03410. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03410>
- EFSA. (2009). Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies on a request from the European Commission on the safety of 'Chia seed (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seed' as a food ingredient, No EFSA-Q-2008-008. *The EFSA Journal*, *996*, 1–26.
- Elshafie, H. S., Aliberti, L., Amato, M., De Feo, V., & Camele, I. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of chia (*Salvia hispanica* L.) essential oil.

*European Food Research and Technology*, 244(9), 1675–1682.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-018-3080-x>

Enciso-Martínez, Y., González-Aguilar, G. A., Martínez-Téllez, M. A., González-Pérez, C. J., Valencia-Rivera, D. E., Barrios-Villa, E., & Ayala-Zavala, J. F. (2022). Relevance of tracking the diversity of *Escherichia coli* pathotypes to reinforce food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 374, 109736. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109736>

Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2), 110–122.

Foti, M. C., Daquino, C., & Geraci, C. (2004a). Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH<sup>•</sup> Radical in Alcoholic Solutions. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(7), 2309–2314. <https://doi.org/10.1021/jo035758q>

Foti, M. C., Daquino, C., & Geraci, C. (2004b). Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH<sup>•</sup> Radical in Alcoholic Solutions. *Journal of Organic Chemistry*, 69(7), 2309–2314. <https://doi.org/10.1021/jo035758q>

Giacomelli, C., da Silva Miranda, F., Gonçalves, N. S., & Spinelli, A. (2004). Antioxidant activity of phenolic and related compounds: A density functional theory study on the O-H bond dissociation enthalpy. *Redox Report*, 9(5), 263–269. <https://doi.org/10.1179/135100004225006038>

Gómez-Ramírez, D. P., & Caudillo-Ortega, N. A. (2018). Evaluación de Características que Confiere la Semilla de Chía (*Salvia hispánica* L), en Formulaciones que Enriquecen las Propiedades Nutritivas y Sensoriales de los Alimentos. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 457–460.

González-Sánchez, A., Cabañas-Wuan, Á., Arana-Argáez, V., Hernández-Núñez, E., & Ortiz-Andrade, R. (2011). Citroflavonoides como posible alternativa en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42(3).

Guil-Guerrero, J. L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J. C., Carlosama-Yepez, M., & Ruales, P. (2016). Antimicrobial activity of plant-food by-products:

- A review focusing on the tropics. *Livestock Science*, 189, 32–49. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.021>
- Güzel, S., Ülger, M., & Özay, Y. (2020). Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *International Journal of Secondary Metabolite*, 7(3), 174–180. <https://doi.org/10.21448/ijsm.722574>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- Hernández-Gómez, J. A., & Miranda-Colín, S. (2008). Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispanica*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(2), 105. <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.2.105>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Iglesias Puig, E. (2013). *Mejora del valor nutricional y tecnológico de productor de panadería por incorporación de ingredientes a base de chía (Salvia hispanica L.)* [Tesis de Magíster]. Universidad Politécnica de Valencia.
- Jaramillo, M. V. M. (2006). *Aditividad, Sinergismo y Antagonismo entre Micotoxinas y sus Efectos en Pollos de Engorde*.
- Lang, Y., Gao, N., Zang, Z., Meng, X., Lin, Y., Yang, S., Yang, Y., Jin, Z., & Li, B. (2024). Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. *Journal of Future Foods*, 4(3), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.002>
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>
- Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. Bin. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. In *Nutrients* (Vol. 6, Issue 12, pp. 6020–6047). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
- López-Alarcón, C., & Lissi, E. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. *Free Radical Research*, 40(9), 979–985. <https://doi.org/10.1080/10715760500481233>

- Lorian, V. (1996). *Antibióticos en Medicina de Laboratorio* (4th ed). Williams & Wilkins.
- Lucas Tenório, C. J., Assunção Ferreira, M. R., & Lira Soares, L. A. (2022). Recent advances on preparative LC approaches for polyphenol separation and purification: Their sources and main activities. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 128, pp. 129–146). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.004>
- Lv, Q., Long, J., Gong, Z., Nong, K., Liang, X., Qin, T., Huang, W., & Yang, L. (2021). Current State of Knowledge on the Antioxidant Effects and Mechanisms of Action of Polyphenolic Compounds. *Natural Product Communications*, 16(7). <https://doi.org/10.1177/1934578X211027745>
- Maestro Durán, R., & Borja Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*, 44(2), 101–106. <https://doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i2.1105>
- Makky, S., Abdelrahman, F., Rezk, N., Easwaran, M., & El-Shibiny, A. (2023). *Phages for treatment Pseudomonas aeruginosa infection*. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.03.014>
- Martínez Sánchez, G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm*, 39(3).
- Medellín, A. M. (2011). El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 54(1), 18–27.
- Mohd Ali, N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 171956. <https://doi.org/10.1155/2012/171956>
- Moreno, C., González E, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 69, 185–192.
- Nikmaram, N., Budaraju, S., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Cox, R. B., Mallikarjunan, K., & Roohinejad, S. (2018). Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Science*, 145, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.031>

- Oldoni, T. L. C., Merlin, N., Karling, M., Carpes, S. T., Alencar, S. M. de, Morales, R. G. F., Silva, E. A. da, & Pilau, E. J. (2019). Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. *Food Research International*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108647>
- Organización Mundial de la Salud. (2001). *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos*.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Paniagua, M. V., Prieto Gómez, B., & Contreras Pérez, R. (2004). El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*, 75, 36–43.
- Pasachova Garzón, J., Ramirez Martinez, S., & Munoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25–38.
- Peralta-Pérez, M. R., & Volke, T. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave en la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 75–88.
- Pineda Alonso, D., Salucci, M., Lázaro, R., Maiani, G., & Ferro Luzzi, A. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr*, 13(2), 104–111.
- Planet, P. J. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (pp. 884-889.e2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-75608-2.00155-5>
- Prevc, T., Šegatin, N., Poklar Ulrih, N., & Cigić, B. (2013). DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 109, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.046>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>

- Ravichandran, M., Hettiarachchy, N. S., Ganesh, V., Ricken, S. C., & Singh, S. (2011). Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety*, 31(4), 462–471. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00322.x>
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.062>
- Roohi, T. F. (2020). Review on the miracle role of chia seed (*Salvia hispanica* L.) Nutritional and Bioactive Compounds in the Treatment of Cardiovascular Disorder. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, 9(4). <https://doi.org/10.32553/jbpr.v9i4.780>
- Ruiz-Aragón, J., Del Prado-Montoro, C., Martínez Rubio, C., García-Martín, S., Freyre-Carrillo, C., & Antonio Rodríguez-Iglesias, M. (2019). Antimicrobianos. *Rev Chilena Infectol*, 36(5), 551–555. [www.revinf.cl](http://www.revinf.cl)
- Saavedra, M., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R., Rosa, E., & Simões, M. (2010). Antimicrobial Activity of Phenolics and Glucosinolate Hydrolysis Products and their Synergy with Streptomycin against Pathogenic Bacteria. *Medicinal Chemistry*, 6(3), 174–183. <https://doi.org/10.2174/1573406411006030174>
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015a). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111–125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015b). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111–125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Sharifi-Rad, M., Ozelik, B., Altin, G., Daşkaya-Dikmen, C., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., Alarcón-Zapata, P., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Alves Borges Leal, A. L., Coutinho, H. D. M., Gyawali, R., Tahergorabi, R., Ibrahim, S. A., Sahrifi-Rad, R., Sharopov, F., Salehi, B., del Mar Contreras, M., Segura-

- Carretero, A., ... Sharifi-Rad, J. (2018a). *Salvia* spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 80, pp. 242–263). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.008>
- Sharifi-Rad, M., Ozcelik, B., Altin, G., Daşkaya-Dikmen, C., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., Alarcón-Zapata, P., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Alves Borges Leal, A. L., Coutinho, H. D. M., Gyawali, R., Tahergorabi, R., Ibrahim, S. A., Sahrifi-Rad, R., Sharopov, F., Salehi, B., del Mar Contreras, M., Segura-Carretero, A., ... Sharifi-Rad, J. (2018b). *Salvia* spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 80, pp. 242–263). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.008>
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. In *Food Chemistry* (Vol. 383). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
- Siquet, C., Paiva-Martins, F., Lima, J. L. F. C., Reis, S., & Borges, F. (2006). Antioxidant profile of dihydroxy and trihydroxyphenolic acids. A structure-activity relationship study. *Free Radical Research*, 40(4), 433–442. <https://doi.org/10.1080/10715760500540442>
- Soto-García, M., & Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Squadrito, G. L., & Pryor, W. A. (1998). Oxidative Chemistry of Nitric Oxide: The Roles of Superoxide, Peroxynitrite and Carbon Dioxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(5), 392–403. <http://www.chem.lsu.edu/htdocs/people/glsquadrito/gls.html>.
- Swanson, B. G. (2003). Tannins and Polyphenols. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd ed., Vol. 112, pp. 5729–5733). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01178-0>
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts

- of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.013>
- Ullah, R., Nadeem, M., Khalique, A., Imran, M., Mehmood, S., Javid, A., & Hussain, J. (2016). Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 53, Issue 4, pp. 1750–1758). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1967-0>
- Valdivia-López, M. Á., & Tecante, A. (2015). Chia (*Salvia hispanica*): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 75, pp. 53–75). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2015.06.002>
- Valenzuela, R., Bascuñan, K., Chamorro, R., & Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 y cáncer, una alternativa nutricional para su prevención y tratamiento. *Rev Chil Nutr*, 38.
- Vidal Gutiérrez, M., Torres Moreno, H., Velázquez Contreras, C., Valenzuela Rascón, L. A., & Robles Zepeda, R. E. (2020). Actividad antioxidante y antiproliferativa de seis plantas medicinales del noroeste de México. *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, 22(3), 40–45. <http://biotecnia.unison.mx>
- Wen, L., Zhao, Y., Jiang, Y., Yu, L., Zeng, X., Yang, J., Tian, M., Liu, H., & Yang, B. (2017). Identification of a flavonoid C -glycoside as potent antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.027>
- Wulf, D. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. In *Physiological Reviews* (Vol. 82, Issue 1, pp. 47–95). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Xingú López, A., González Huerta, A., De La Cruz Torrez, E., Sangerman-Jarquín, D. M., Orozco De Rosas, G., & Arriaga, M. R. (2017). Chía (*Salvia hipánica* L.) situación actual y tendencias futuras. In *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (Vol. 8).
- Zapata Díez, C. D., & Zapata Ocampo, P. A. (2019). Estandarización del método ORAC como herramienta básica de análisis de la capacidad antioxidante de diversas sustancias. In *Repositorio Digital Institucional Universidad CES* (pp. 1–15).

- Zapata, S., Piedrahita, A. M., & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 16(1), 25–36. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.20310>
- Zhang, G., Zhang, N., Xu, J., Yang, T., Yin, H., & Cai, Y. (2023). Efficacy and Safety of Vancomycin for the Treatment of Staphylococcus aureus Bacteremia: a Systematic Review and Meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 106946. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106946>
- Zhao, C. L., Chen, Z. J., Bai, X. S., Ding, C., Long, T. J., Wei, F. G., & Miao, K. R. (2014). Structure–activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Molecular Diversity*, 18(3), 687–700. <https://doi.org/10.1007/s11030-014-9520-z>
- Zúñiga-López, M. C., Maturana, G., Campmajó, G., Saurina, J., & Núñez, O. (2021). Determination of Bioactive Compounds in Sequential Extracts of Chia Leaf (*Salvia hispanica* L.) Using UHPLC-HRMS (Q-Orbitrap) and a Global Evaluation of Antioxidant In Vitro Capacity. *Antioxidants*, 10(7), 1151. <https://doi.org/10.3390/antiox10071151>

## 9 Anexos

### 9.1 Anexo I. Taxonomía de la *Salvia hispanica* L.

Tabla 8. Taxonomía de la *Salvia hispanica* L.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Lamiaceae
<b>Tribu</b>	Mentheae
<b>Género</b>	<i>Salvia</i>
<b>Especie</b>	<i>Salvia hispanica</i>

### 9.2 Anexo II. Gráficos de decaimiento de la sonda FL en presencia de TX. Curva de calibración de TX para ORAC-FL.

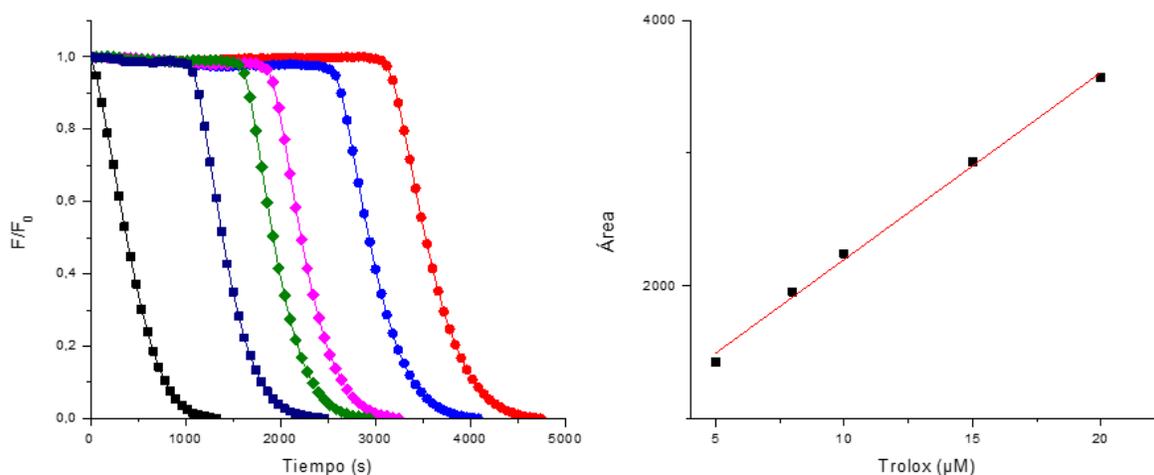


Figura 25. A la izquierda: gráfico de decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de la molécula sonda (FL) por efecto de radicales libres. Las concentraciones de TX son: (■) blanco, (■) 5,0  $\mu\text{M}$ , (◆) 8,0  $\mu\text{M}$ , (◆) 10  $\mu\text{M}$ , (●) 15  $\mu\text{M}$  y (●) 20  $\mu\text{M}$ . A la derecha: relación del ABC y la concentración de TX ( $y = 787,647 + 141,138x$ ;  $r = 0,9961$ ).

### 9.3 Anexo III. Gráficos de decaimiento de la sonda PGR en presencia de TX. Curva de calibración de TX para ORAC-PGR.

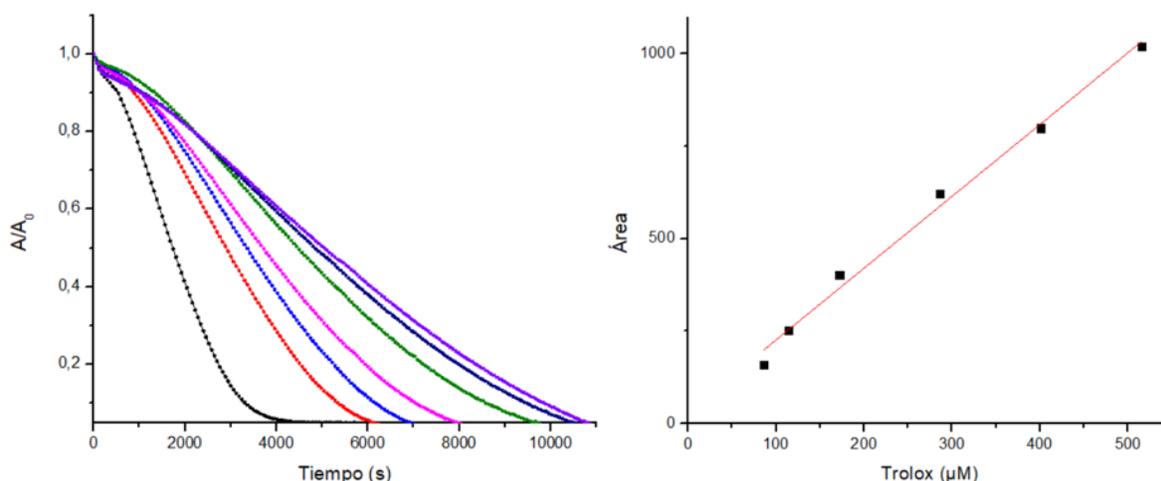


Figura 26. A la izquierda: gráfico de decaimiento de la absorbancia de la molécula sonda (PGR) por efecto de radicales peroxilo. Las concentraciones de TX son: (◻) blanco, (◼) 85,87  $\mu\text{M}$ , (◽) 114,5  $\mu\text{M}$ , (◾) 171,75  $\mu\text{M}$ , (◿) 286,25  $\mu\text{M}$ , (◈) 400,75  $\mu\text{M}$  y (◉) 515,25  $\mu\text{M}$ . A la derecha: relación del ABC y la concentración de TX ( $y = 32,598 + 1,941x$ ;  $r = 0,9961$ ).

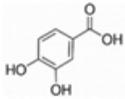
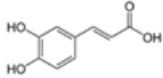
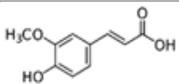
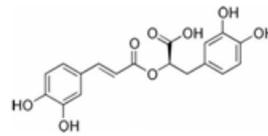
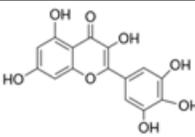
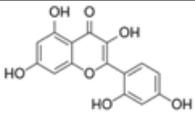
### 9.4 Anexo IV. Gradiente de elución utilizado en el fraccionamiento de EtOH-N.

Tabla 9. Gradiente de elución utilizado en el fraccionamiento de EtOH-N.

Tiempo (min)	%A	%B
0	2	98
6	2	98
12	15	85
20	25	75
30	40	60
35	50	50
40	75	25
45	85	15
50	95	5
55	100	0

## 9.5 Anexo V. Compuestos identificados en el extracto EtOH-N mediante HPLC semipreparativo.

Tabla 10. Tiempos de retención de los compuestos polifenólicos identificados en el extracto EtOH-N.

	Compuesto	Tiempo de retención (tr) [min]	Estructura
1	Ácido protocatecuico	18,2	
2	Ácido cafeico	28,2	
3	Ácido ferúlico	29,3	
4	Ácido rosmarínico	30,0	
5	Miricetina	31,6	
6	Morina	33,9	

## 9.6 Anexo VI. Cromatograma dividido en las 20 fracciones obtenidas para el extracto EtOH-N.

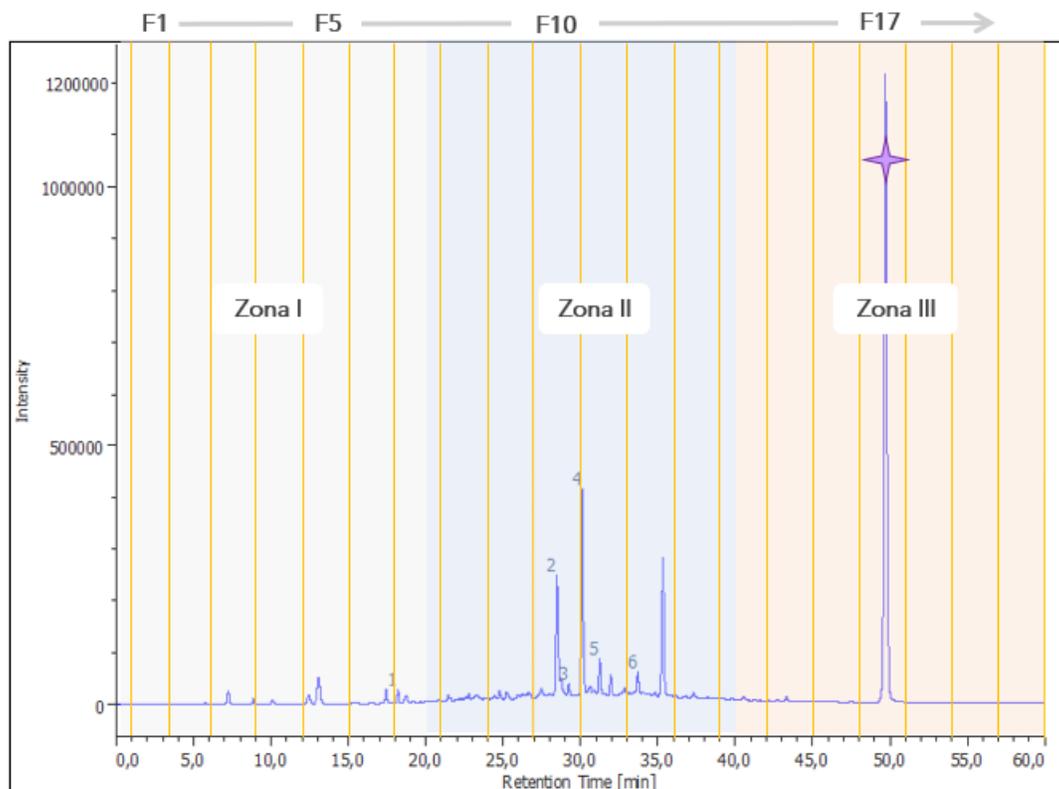


Figura 27. Fraccionamiento del extracto EtOH-N. Con (1) ácido protocatecuico, (2) ácido cafeico, (3) ácido ferúlico, (4) ácido rosmarínico, (5) miricetina, (6) morina y (★) peak más intenso correspondiente a F17.