



**Universidad de Chile**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**Departamento de Química Inorgánica y Analítica**

**Laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes**

# **Determinación de la capacidad antioxidante de las espigas de la planta de chí**

**Memoria para obtener el título de Química**

**Carolina Angélica Soto Leiva**

**Patrocinante y Directora de Memoria:**

**Dra. María Carolina Zúñiga López**

**Santiago de Chile, 2015**



## Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, que durante todo momento me apoyó, pudo comprender toda situación y logró contenerme en los momentos difíciles, ¡los amo con todo mi corazón!. Papás, sin ustedes no hubiese podido lograr todo esto, sé que siempre tendré su apoyo y quiero agradecer toda su dedicación con nosotros, es un orgullo para mí ser su hija. Gracias mamá por tu amor, por tus palabras que siempre fueron precisas y me levantaron el ánimo. Gracias papá por toda la confianza que tuviste en mí, tu preocupación y esfuerzo constante, sé que todo es por nosotros. Hermano, gracias por distraerme con tus conversaciones cuando estaba preocupada, por todo tu ánimo que te caracteriza y compartes conmigo siempre, ¡no sabes cuánto agradezco las veces que me ayudaste cuando olvidaba algo en casa!. A mi pareja, gracias Felipe por tu confianza, amor y palabras de aliento, por tu preocupación en mis estudios y por estar a mi lado siempre. Fueron y son un pilar fundamental en todo este proceso de aprendizaje y crecimiento personal.

A mis profesores del laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes, mi tutora Dra. María Carolina Zúñiga y Dr. Claudio Olea, que siempre entregaron una sonrisa, ustedes reflejan confianza, ser parte de su laboratorio fue muy agradable y fui afortunada al trabajar y ser parte de su equipo de trabajo. Profe Claudio, agradezco su buena disposición y su alegría, muchas gracias por sus enseñanzas, siempre se preocupó de sus alumnos y eso lo valoro mucho. Profe María Carolina, ¡gracias por confiar en mí y por su paciencia!, por apoyarme en todo momento, estoy muy contenta por haber trabajado con usted, es una profesora dedicada y confiable, ha sido una guía constante y un ejemplo para mí.

Agradezco a la Dra. Tatiana Garrido que es parte de mi comisión evaluadora, por su amabilidad que siempre demostró en sus clases, y el tiempo y dedicación otorgada al desarrollo de esta tesis.

¡A mis queridas amigas! Naty y Andre, sin ustedes la universidad hubiese sido muy aburrida, me alegraron siempre y por supuesto, me ayudaron en cualquier problema y siempre me calmaron en todas mis exageraciones. Siempre tendré en mi corazón todos los momentos divertidos que pasamos juntas. Son excelentes amigas, las quiero mucho.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, a Alejandra, que siempre fue muy amable al ayudarme en todo momento, a Christian por su ayuda cordial, a Mauricio por su alegría y disposición, Michel, Francisco, Roberto y Karina por sus gratas conversaciones y gentileza. A todos ustedes muchas gracias por sus enseñanzas, alegría y convertir el laboratorio en un lugar grato.

## ABREVIATURAS

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

**APC:** Ácido protocatecuico.

**AWA:** Solución extractante, Acetona/ Agua nanopura/ Ácido Acético (70.0/ 29.5/ 0.5 % v/v).

**C:** Catequina.

**CA:** Capacidad antioxidante.

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

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

**F<sub>0</sub>:** Fluorescencia inicial a los 0 minutos.

**FL:** Fluoresceína.

**H:** Hesperetina.

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

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

**ORAC-PGR:** Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, medida utilizando la sonda pirogalol rojo.

**PGR:** Pirogalol rojo.

**Q:** Quercetina.

**ROO<sup>•</sup>:** Radical peroxilo.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**Trolox:** Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Antecedentes <i>Salvia hispanica</i> L.....	1
1.2. Capacidad antioxidante.....	4
1.3. Métodos de extracción .....	8
1.4. Mecanismos antioxidantes .....	9
1.5. Métodos de determinación de capacidad antioxidante.....	10
1.6. Métodos cromatográficos .....	12
1.7. Planteamiento del problema.....	13
<b>2. Hipótesis</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>15</b>
3.1. Objetivo general .....	15
3.2. Objetivos específicos .....	15
<b>4. Reactivos y métodos</b> .....	<b>16</b>
4.1. Reactivos.....	16
4.2. Muestras de planta.....	16
4.3. Metodologías.....	17
4.3.1. Extracción con solvente acelerado (ASE).....	17
4.3.2. Extracción asistida con ultrasonido.....	18
4.3.3. Determinación de la capacidad antioxidante por medio de ensayo DPPH .....	18
4.3.4. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC- FL .....	19
4.3.5. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC- PGR .....	21
4.3.6. Caracterización de polifenoles por HPLC-DAD .....	22
4.3.7. Diseño experimental <i>screening</i> factorial .....	23

<b>5. Resultados y discusión</b> .....	<b>25</b>
5.1. Ensayos preliminares .....	25
5.1.1. Extracción con solvente acelerado ASE .....	25
5.1.2. Extracción asistida con ultrasonido.....	27
5.1.3. Comparación de métodos de extracción .....	28
5.2. Optimización de las variables de extracción.....	30
5.2.1 Optimización de los tiempos de extracción mediante evaluación de capacidad antioxidante por ORAC-FL y DPPH.....	31
5.2.2 Optimización del tiempo de maceración .....	38
5.2.3 Comparación de capacidad antioxidante de distintas partes de la planta <i>Salvia hispanica</i> L. con los tiempos de ultrasonido y maceración optimizados.....	39
5.3. Determinación y cuantificación de polifenoles.....	44
<b>6. Conclusión</b> .....	<b>51</b>
<b>7. Referencias</b> .....	<b>53</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>58</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clases de compuestos fenólicos en plantas .....	7
<b>Tabla 2:</b> Tiempos de ultrasonido y maceración obtenidos por análisis multivariable .....	24
<b>Tabla 3:</b> Resultados ensayos ORAC y DPPH para ciclos obtenidos por ASE .....	25
<b>Tabla 4:</b> Porcentaje de inhibición del radical DPPH frente al extracto de planta de chía .....	26
<b>Tabla 5:</b> Resultados ensayos ORAC y DPPH obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido.....	28
<b>Tabla 6:</b> Valores de ORAC-FL y ORAC-PGR para compuestos puros.....	29
<b>Tabla 7:</b> Puntajes Eco-Escala para las metodologías de extracción aplicadas ....	30
<b>Tabla 8:</b> Capacidad antioxidante mediante ensayo DPPH y ORAC-FL de espiga de chía negra .....	32
<b>Tabla 9:</b> Capacidad antioxidante mediante ensayo DPPH y ORAC-FL de la espiga de chía blanca .....	35
<b>Tabla 10:</b> Experimento univariable .....	38
<b>Tabla 11:</b> Tiempos de retención de los compuestos polifenólicos identificados en el extracto de espiga de chía.....	44
<b>Tabla I:</b> Límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y longitud de onda máxima de los polifenoles identificados .....	58
<b>Tabla II:</b> Gradiente de elusión cromatográfica .....	58
<b>Tabla III:</b> Determinación de la capacidad antioxidante mediante metodología ORAC-FL y DPPH de diferentes partes de la planta a 1,5 horas de ultrasonido-72 horas de maceración .....	59
<b>Tabla IV:</b> Áreas de las concentraciones de polifenol en los diferentes extractos de Salvia hispanica L .....	59
<b>Tabla V:</b> Cálculos de puntos penalizados eco-escala analítica.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A) Planta de <i>Salvia hispanica</i> L. en proceso de inflorescencia. B) Semilla y espiga de <i>Salvia hispanica</i> L. ....	2
<b>Figura 2:</b> A) Mujer embarazada bebiendo agua de chía. B) Tributos a dioses Aztecas.....	3
<b>Figura 3:</b> Estructura genérica de una molécula flavonoide.....	7
<b>Figura 4:</b> Estructuras genéricas de algunas clases de flavonoides. ....	8
<b>Figura 5:</b> Estructura de radical DPPH'.....	11
<b>Figura 6:</b> Estructuras de los compuestos fluoresceína, rojo de pirogalol y estándar Trolox. ....	12
<b>Figura 7:</b> Esquema de metodología de extracción con solvente acelerado ASE.	17
<b>Figura 8:</b> A) Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por efecto de los radicales peroxilo. B) relación área bajo la curva del decaimiento versus concentración. ....	20
<b>Figura 9:</b> Gráfico de volumen de extracto de planta de chía vs. Inhibición del radical DPPH'.....	27
<b>Figura 10:</b> A) Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por efecto de los radicales peroxilo. B) relación área bajo la curva del decaimiento versus concentración del compuesto estándar Trolox. ....	32
<b>Figura 11:</b> A) Diagrama de Pareto indicando la influencia de las variables ultrasonido y maceración para la determinación de la capacidad antioxidante de la variedad de espiga negra. B) Diagrama de superficies que indica los tiempos necesarios para la obtención de una mayor capacidad antioxidante con metodología DPPH.....	33
<b>Figura 12:</b> a) Diagrama de Pareto indicando la influencia de las variables ultrasonido y maceración para la determinación de capacidad antioxidante de la variedad de espiga negra. B) Gráfico de superficies que indica los tiempos	

necesarios para la obtención de una mayor capacidad antioxidante con metodología ORAC-FL.....	34
<b>Figura 13:</b> A) Diagrama de Pareto indicando la influencia de las variables ultrasonido y maceración para la determinación de la capacidad antioxidante de la variedad de espiga blanca. B) Gráfico de superficie que indica los tiempos óptimos para la obtención de una mayor capacidad antioxidante con metodología DPPH. ....	36
<b>Figura 14:</b> A) Diagrama de Pareto indicando la influencia de las variables ultrasonido y maceración para la determinación de capacidad antioxidante de la espiga inflorescencia blanca. B) Gráfico de superficie que indica los tiempos necesarios para la obtención de una mayor capacidad antioxidante con metodología ORAC-FL.....	37
<b>Figura 15:</b> Gráfico de barras de los valores de IC <sub>50</sub> obtenidos para cada parte de la planta de chía. ....	40
<b>Figura 16:</b> Gráfico de barras de los valores de ORAC-FL obtenidos para cada parte de la planta de chía. ....	40
<b>Figura 17:</b> A) Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por los radicales peroxilo en presencia de extracto de espiga de <i>Salvia hispanica</i> L. B: Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por los radicales peroxilo en presencia de extracto de semilla de <i>Salvia hispanica</i> L. ....	42
<b>Figura 18:</b> Gráfico de decaimiento de la absorbancia de PGR por efecto de los radicales peroxilo en presencia de extracto de espiga de chía y extracto de semilla. ....	43
<b>Figura 19:</b> Cromatogramas de los compuestos polifenólicos en: espiga (A), hoja (B), semilla (C), tallo (D), espiga inflorescencia negra (E) y espiga inflorescencia blanca (F). ....	46
<b>Figura 20:</b> Curvas de calibración obtenidas por HPLC-DAD. ....	48
<b>Figura 21:</b> Contenido de polifenoles presentes en los diferentes extractos de planta de <i>Salvia hispanica</i> L. ....	49

## Resumen

La tendencia actual en el mundo indica un claro aumento del consumo de alimentos y productos naturales que son nutricionalmente equilibrados. En este contexto, la industria alimentaria debe satisfacer tales demandas, con el uso de productos naturales, como las semillas ancestrales. Hasta la fecha, las investigaciones desarrolladas en relación con el alto valor nutricional y funcional de las semillas de chía, son numerosas. Sin embargo, estudios de plantas de chía son limitados hasta ahora, por lo que se podría deducir, que algunos de los componentes presentes en la semilla también están presentes en la planta, especialmente en la espiga. Por otro lado, las culturas aztecas utilizaban diferentes partes de la planta, por ejemplo, la raíz se utilizó para tratar la diarrea, infusiones de la hojas para aliviar el dolor de cabeza, además, se utilizaron como cataplasmas, para calmar los dolores en las zonas de la piel quemadas o golpeadas.

Hoy en día, la planta es comúnmente tratada como un residuo después de la cosecha de la semilla, la cual podría ser una fuente de antioxidante con un uso industrial inexplorado. Uno de los propósitos de este estudio fue optimizar el método de extracción asistida por ultrasonido, para la espiga de chía, en el cual se obtuvo un tiempo óptimo de extracción de 1,5 horas de extracción con ultrasonido y 72 horas posteriores de maceración.

La capacidad antioxidante de la espiga de chía fue determinada, presentando un  $IC_{50}$  de  $2,47 \pm 0,08$  mg y un Índice ORAC-FL  $0,0419 \pm 0,0003$ . A modo de comparación se realizó la medición de la capacidad antioxidante de otras partes de la planta de chía, donde la hoja fue la que presentó los valores más altos (presentando un  $IC_{50}$  de  $0,28 \pm 0,02$  mg y un índice ORAC-FL  $0,1839 \pm 0,0002$ ).

También, en este estudio se lograron identificar y cuantificar cuatro compuestos polifenólicos, ácido protocatecuico, catequina, quercetina y hesperetina, con tiempos de retención 2,7; 3,7; 24,1 y 25,6 minutos respectivamente.

## Summary

The current trend in the world indicates a clear increase in the consumption of foods and natural products that are nutritionally balanced. In this context, the food industry must meet such demands, with the use of natural products such as ancestral seeds. To date, the research carried out in relation to the high nutritional value and functional chia seeds are numerous. However, chia plant studies are limited so far, so it may be deduced that some of the components present in the seed are also present in the plant, especially in the spike. On the other hand, Aztec cultures used different parts of the plant, for example, the root is used to treat diarrhea, infusions of the leaves to relieve headaches, also were used as poultices to soothe pains areas of the skin burned or beaten.

Today, the plant is usually treated as waste after harvesting the seed, which could be a source of antioxidant with an unexplored industrial use.

One purpose of this study was to optimize the method ultrasound assisted extraction to the chia spike which it was obtained an optimum extraction ultrasound time of 1.5 hours and 72 hours after maceration.

The antioxidant capacity of chia spike was determined, showing an  $IC_{50}$  of  $2.47 \pm 0.08$  mg and  $0.0419 \pm 0.0003$  Index ORAC-FL. As a comparison measurement of antioxidant capacity of other parts of the chia plant is performed, where the leaf was the one with the highest values (showing an  $IC_{50}$   $0.28 \pm 0.02$  mg and  $0.1838 \pm 0,0002$  index ORAC-FL).

Also, in this study we were able to identify and quantify four polyphenolic compounds protocatechuic acid, catechin, quercetin and hesperetin with retention times 2.7, 3.7, 24.1 and 25.6 min respectively.

## 1. Introducción

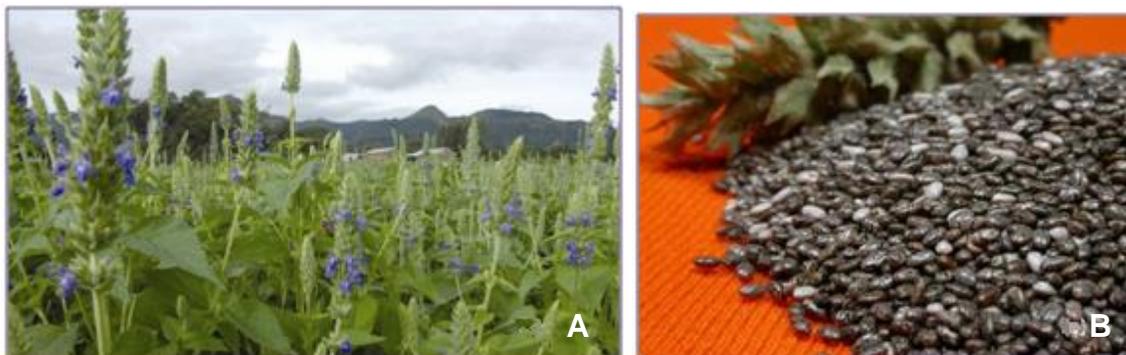
### 1.1. Antecedentes *Salvia hispanica* L.

Existe interés de la población por el consumo de alimentos que presentan una considerable cantidad de nutrientes, proteínas, antioxidantes y que en general superen en beneficios para la salud humana a otros alimentos de consumo común.

Recientes estudios han demostrado que la semilla de chía presenta una composición muy atractiva para la industria, siendo una buena fuente de proteína, con altas cantidades de antioxidantes naturales como compuestos polifenólicos, también con un alto contenido de fibra dietética (cerca al 30% del peso total) y por su alto contenido de ácidos grasos insaturados (ácido  $\alpha$ -linolénico, omega-3). Estas características brindan varios beneficios para el ser humano como la reducción de enfermedades cardiovasculares, obesidad, colesterol y triglicéridos, regulación del tránsito intestinal y previene enfermedades como diabetes tipo II y cáncer <sup>[1]</sup>. Adicionalmente, la chía se ha utilizado como materia prima para la obtención de alimentos funcionales, sobre todo para incrementar el contenido de ácido graso omega-3 en productos alimenticios, como por ejemplo algunos alimentos de origen animal como huevos, lácteos, carnes de aves de corral y conejos y también como ingrediente en productos de panadería <sup>[1,2,3]</sup>.

La *Salvia hispanica* L., mejor conocida como chía (Figura 1 A), pertenece a la familia de las Lamiaceae (familia de la *Mentha Spicata* L. o menta). Es una hierba anual que mide entre un metro y un metro y medio de alto. Los tallos son ramificados, cuadrangulares con vellos cortos y blancos. Las hojas son aserradas con un peciolo de hasta cuarenta milímetros de largo y miden de ochenta a cien milímetros de longitud y cuarenta a sesenta milímetros de anchura. Las flores se producen en espigas terminales o axilares, en grupos protegidos por pequeñas brácteas con largas extremidades puntiagudas. El pedúnculo es corto, el cáliz

persistente en forma de tubo, abultado, estriado y tres dientes agudos, uno más largo que los otros dos. La corola es tubular, de color azul, con cuatro estambres, dos de los cuales son más grandes y estériles. El ovario es discoideo y el estigma bífido. Las semillas (Figura 1 B) son ovales, suaves y brillantes, de un color negro grisáceo con manchas irregulares y se presentan en grupos de cuatro y miden entre 1,5 y 2 mm <sup>[3]</sup>.



**Figura 1: A) Planta de *Salvia hispanica* L. en proceso de inflorescencia. B) Semilla y espiga de *Salvia hispanica* L.**

La palabra chía es una adaptación española de la palabra nahua chian o chien en plural. Actualmente, se utiliza esta misma palabra para nombrar diferentes especies del mismo género como la *Hyptis suaveolens* L., también llamada chía gorda o de distinto género como la *Salvia columbariae* B. y la *Amaranthus leucocarpus* W. llamada chía de chapata o amaranto, pero es la *Salvia hispanica* L. la que ha sido cultivada en ambientes tropicales y subtropicales históricamente, no es muy resistente a las heladas y es plantada desde el nivel del mar, hasta los dos mil quinientos metros de altura. Es nativa del sector correspondiente a Mesoamérica <sup>[1,3]</sup>, región en la cual se originaron diferentes civilizaciones precolombinas y que es considerada uno de los principales centros de domesticación de especies vegetales. Las civilizaciones mantenían un intercambio y similitudes culturales entre las cuales se encuentra el cultivo de la chía. Entre 2600 y 2000 A.C. fue cultivada en el valle de México por las civilizaciones teotihuacanas y toltecas, antes que los aztecas llegaran allí y posteriormente

constituyó uno de los componentes importantes dentro de la dieta azteca, los cuales consideraban que este grano les aportaba energía y era un alimento esencial en las prácticas que requerían exigencia física; pero no sólo lo usaban como alimento, sino que también como bebida (lo que actualmente se conoce como “chía fresca” en algunos lugares de México, Guatemala, El Salvador y Nicaragua), como medicina (por ejemplo, para inducir el parto en la época prehispánica, las mujeres bebían una mezcla de agua con chía y carne de cola de tlacuache <sup>[5,3]</sup>, Figura 2 A), como moneda y su aceite era usado como base para pinturas corporales y faciales <sup>[3,4]</sup>, fabricación de ungüentos perfumados y tuvo un uso preponderante como barniz en las obras pictóricas prehispánicas debido a sus propiedades protectoras, acelerando el secado y aumentando la duración y estabilidad de los colores. Esta semilla y otros cultivos eran utilizados como ofrenda para los dioses durante las ceremonias religiosas, también las naciones conquistadas por los Aztecas pagaban tributos a sus dioses (Figura 2 B), los que incluían la chía <sup>[6,3]</sup>, razones por la cual fue eliminada de la dieta precolombina por los españoles debido a su estrecha asociación con la religión.



Figura 2: A) Mujer embarazada bebiendo agua de chía. B) Tributos a dioses Aztecas.

El cultivo de la chía sobrevivió gracias a pequeños grupos Nahuas que crearon resistencia ante las presiones culturales de los conquistadores y lograron conservar algunas tradiciones precolombinas. Sin embargo, se perdieron usos, variedades y los agricultores no pudieron mecanizar la producción debido al aislamiento de este cultivo durante los últimos quinientos años, siendo este último uno de los motivos por el cual no es uno de los componentes de las dietas modernas como lo son otros cultivos precolombinos, como el maíz y los porotos. La chía que era cultivada por los nahuas y que ahora se produce comercialmente en Argentina <sup>[7]</sup>, Bolivia, Chile <sup>[8]</sup> y México es *Salvia hispanica* L., la cual corresponde a la chía en estudio y a la que se estudió en el siglo XX.

## 1.2. Capacidad antioxidante

El término "capacidad antioxidante" (CA) se utiliza para referirse a la capacidad de los antioxidantes para atrapar radicales, pero en otros casos se habla de la capacidad de inhibir la oxidación. Estos dos conceptos de "capacidades antioxidantes" son diferentes, por lo que la capacidad de los antioxidantes se debe determinar mediante dos factores que deben evaluarse claramente y estos son la velocidad del *scavenging* y la cantidad de radicales atrapados.

Los radicales libres son moléculas e iones con baja energía de activación, reactivos y tiempos de vida media muy corta <sup>[9]</sup>. Una de las consecuencias de la vida en condiciones aeróbicas es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los que incluyen radicales hidroxilos ( $\cdot\text{OH}$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical peróxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), los cuales son formados durante la respiración y como subproductos de reacciones metabólicas en la mitocondria. Debido a la alta reactividad que poseen los radicales de oxígeno, éstos causan un gran daño y representan una amenaza potencial a las células vivas, inhibiendo las funciones de membrana, que afectan a la actividad enzimática y causando daño al ADN <sup>[11]</sup>. Prácticamente todos los organismos aeróbicos han desarrollado un

complejo sistema de defensa antioxidante que comprenden antioxidantes, enzimas antioxidantes atrapadoras de ROS y enzimas de reparación, eliminando el daño oxidativo en el organismo <sup>[10]</sup>. En condiciones fisiológicas normales, hay un equilibrio entre producción de ROS y los mecanismos de *scavenging* capaces de reducir estos derivados de oxígeno, pero este equilibrio se puede romper por diferentes motivos, como la generación exógena de ROS como la radiación ionizante, xenobióticos y contaminación y la generación celular endógena de ROS, desencadenando estrés oxidativo <sup>[11]</sup>. En el contexto de un estrés oxidativo, se oxidan moléculas biológicamente esenciales como lípidos, proteínas, azúcares o ácidos nucleicos, los cuales pierden sus funciones fisiológicas lo que induce a consecuencias dramáticas para el organismo como la generación de enfermedades cardiovasculares, cáncer y aterosclerosis <sup>[10, 12]</sup>.

En la industria alimenticia se adicionan compuestos antioxidantes a los alimentos para preservar sus propiedades organolépticas y evitar la disminución de las concentraciones de las vitaminas presentes. Estos antioxidantes tienen un origen sintético y los más frecuentes son hidroxibutilanisol (BHA por sus siglas en inglés), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (PG) y terbutil hidroquinona (TBHQ). Existen reportes que señalan que BHA y BHT podrían ser tóxicos <sup>[13]</sup> y sumado a que los consumidores han adquirido mayor conciencia respecto a los aditivos en la alimentación, han creado la necesidad de identificar fuentes naturales de antioxidantes que presenten una mayor probabilidad de ser seguros para el organismo y ofrezcan una protección contra el estrés oxidativo.

Desde hace al menos dos décadas se han estudiado plantas como fuentes naturales de antioxidantes para su uso en la industria de los alimentos. La ingesta de suplementos de antioxidantes exógenos que han sido extraídos de plantas, tiene efectos protectores contra el estrés oxidativo <sup>[10]</sup> y muchos de los compuestos aislados que presentaron propiedades antioxidantes han sido polifenoles, los cuales son reconocidos por su protección contra la oxidación de lípidos <sup>[14]</sup>. Se ha incrementado el interés por los polifenoles porque ellos ofrecen propiedades que promueven el bienestar en la salud humana y poseen efectos

terapéuticos contra las enfermedades relacionadas al estrés oxidativo ya mencionadas. Sin embargo, ahora también se sabe que muchos de los compuestos antioxidantes como los polifenoles tienen un comportamiento dual ya que presentan actividad pro-oxidante <sup>[10]</sup>.

Los compuestos polifenólicos son producidos en plantas como metabolitos secundarios, y ellos juegan un rol importante en el crecimiento y reproducción, incluso, brindan protección a la planta de patógenos y predadores <sup>[15]</sup>. Las plantas presentan estrés oxidativo por las altas temperaturas, alta concentración de sales en los suelos, radiación ultravioleta, sequía, bajas temperaturas (heladas) y toxicidad producto por contaminación con metales de transición<sup>[18]</sup>, desencadenando un sistema de defensa antioxidante endógeno, el cual puede ser enzimático o no enzimático. Los componentes no enzimáticos del sistema de defensa antioxidante incluyen el principal tampón celular redox ascorbato (AsA) y glutatión (GSH), así como otros compuestos tales como tocoferoles, carotenoides, y compuestos fenólicos. Estos interactúan con muchos componentes celulares y por supuesto juegan un papel crucial en la defensa antioxidante, actuando como cofactores enzimáticos e interviniendo en procesos de mitosis y elongación celular para senescencia y muerte celular programada <sup>[18]</sup>.

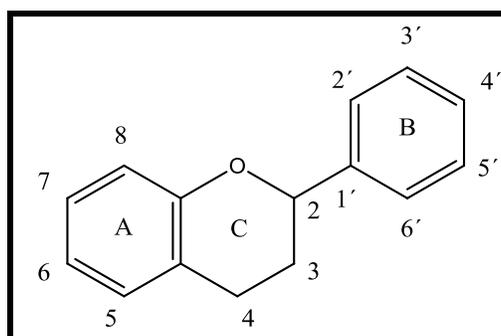
Estos compuestos brindan un alto rango de beneficios fisiológicos al poseer propiedades tales como, antialérgicas, antimicrobiales, antiaterogénicas, antiinflamatorias, antienviejecimiento de la piel <sup>[30]</sup>, antitrombótica, cardioprotectoras y poseen efectos vasodilatadores, además de la ya mencionada capacidad antioxidante <sup>[16]</sup>.

Estructuralmente, los compuestos polifenólicos comprenden un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilos como sustituyentes. Los polifenoles naturales poseen una alta diversidad estructural que va desde simples moléculas tales como los ácidos fenólicos a compuestos altamente polimerizados como los taninos. Las clases de polifenoles se muestran en la Tabla 1, de los cuales, ácidos fenólicos, flavonoides y taninos son considerados como los principales compuestos fenólicos presentes en la dieta.

**Tabla 1: Clases de compuestos fenólicos en plantas.**

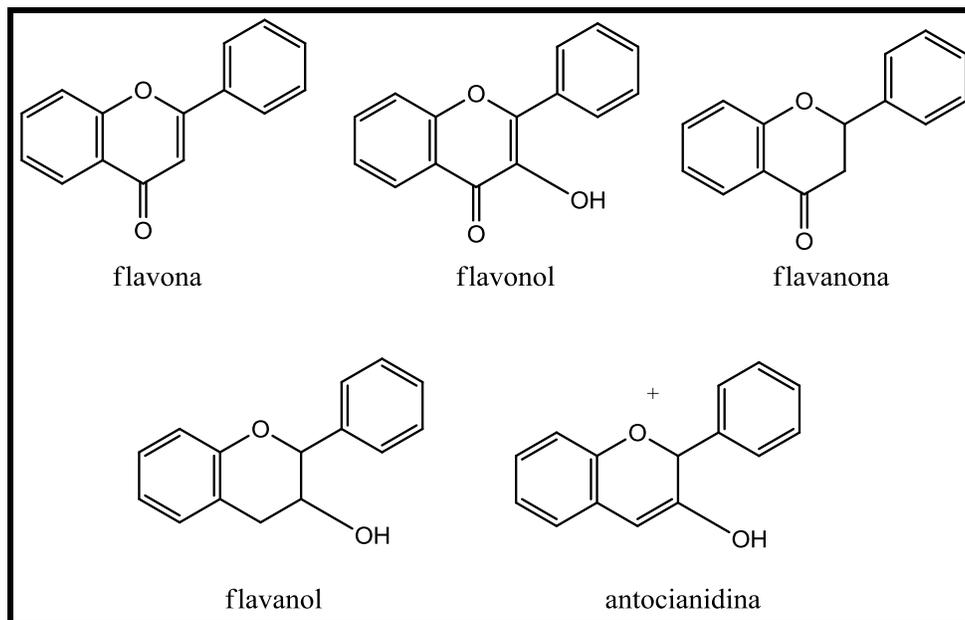
Clase	Estructura (n° de átomos de carbono)
Fenoles simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos hidroxibenzoicos	$C_6-C_1$
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	$C_6-C_2$
Ácidos Hidroxicinámico, fenilpropanoides (cumarinas, isocumarinas, cromonas, cromenos)	$C_6-C_3$
Naftoquinona	$C_6-C_4$
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoides, isoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanós, neolignanós	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas o flavolanos)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Los ácidos fenólicos se dividen en dos subgrupos, los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. Flavonoides constituyen el grupo más grande de los compuestos fenólicos en plantas, siendo más de la mitad de los ocho mil compuestos polifenólicos de origen natural <sup>[16]</sup>; además poseen una estructura que consta de quince átomos de carbono, dispuestos en una configuración de  $C_6-C_3-C_6$ . Esta estructura consiste en dos anillos aromáticos A y B, unidos por 3 carbonos que por lo general, forman un anillo heterocíclico, C (Figura 3).



**Figura 3: Estructura genérica de una molécula flavonoide.**

Las diferentes sustituciones en el anillo C dan resultado en las principales clases de flavonoides, estos pueden ser, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas, flavanonoles y antocianidinas, de los cuales flavonas y flavonoles son los que más se producen y son estructuralmente diversos. Sustituciones en los anillos A y B dan lugar a los diferentes compuestos dentro de cada clase de los flavonoides (Figura 4).



**Figura 4: Estructuras genéricas de algunas clases de flavonoides.**

### 1.3. Métodos de extracción

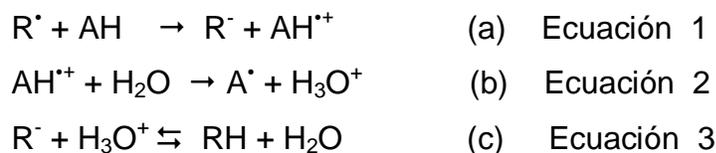
La extracción es un paso muy importante para el aislamiento, identificación y el uso de compuestos polifenólicos y no hay un único método de extracción estándar. La extracción puede ser líquido-líquido, en donde ocurre la transferencia de masa desde una solución líquida que contiene inicialmente uno o más solutos, la cual se mezcla con un disolvente selectivo de diferente densidad; y también

puede ser una extracción sólido-líquido, o lixiviación en donde el transporte de los sólidos contenidos en una matriz sólida migran hacia un disolvente puesto en contacto con la matriz. La utilización de ultrasonido, maceración, maceración con agitación, extracción con solvente acelerado (ASE), extracción con microondas, extracción con fluido supercrítico y la extracción bajo reflujo son las técnicas de extracción más usadas. Debido a su alta eficacia de extracción y el ahorro considerable de tiempo, ASE promete ser una técnica eficaz de extracción, junto a la utilización de ultrasonido.

#### 1.4. Mecanismos antioxidantes

Debido a que los extractos obtenidos de plantas poseen una gran cantidad y variedad de antioxidantes, una manera de cuantificar en conjunto, considerando interacciones, sinergias entre ellos y por otro lado, los pro-oxidantes presentes, es medir la capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante se basa en la transferencia electrónica (ET, *Electron Transfer*) o transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, *Hydrogen Atom Transfer*), estos pueden depender de la especie antioxidante o del radical.

El mecanismo ET involucra tres pasos:



El mecanismo HAT se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno a la especie radical, formando una especie intermediaria que es relativamente más estable (a), pero que reacciona igualmente con otro radical libre (b):

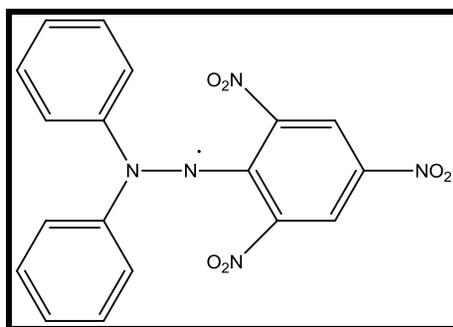


Donde AH es el antioxidante,  $A^{\bullet}$  es el radical antioxidante y  $X^{\bullet}$  es otra especie radical o la misma especie  $A^{\bullet}$ . El primer proceso es un proceso reversible y el segundo irreversible produciendo una especie no radical estable.

### 1.5. Métodos de determinación de capacidad antioxidante

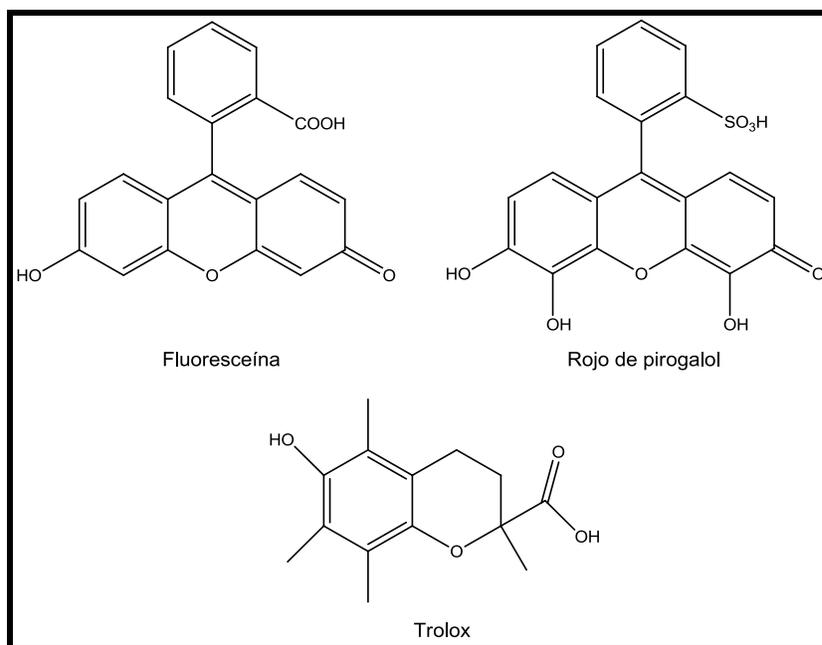
Muchos métodos son utilizados para medir la capacidad antioxidante de alimentos y sistemas biológicos. Algunos ensayos comunes basados en HAT incluyen el ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), PARTs (Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas), LDL oxidation (oxidación de lipoproteínas de baja densidad) y TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter). Algunos ensayos basados en mecanismo ET son: FRAP (*Ferric-reducing ability of plasma*), ABTS (2,2'-bis-azino (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y DDPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), entre otros.

Entre estas metodologías se destaca el ensayo DPPH, el cual permite evaluar directamente las propiedades del antioxidante mediante el *scavenging* del radical DPPH $^{\bullet}$  (Figura 5), el cual posee un electrón de valencia desapareado sobre un átomo de nitrógeno y es de color violeta, decolorándose a amarillo pálido por la reacción con un antioxidante. Al utilizar un solvente prótico como el metanol en este ensayo, el mecanismo antioxidante es por transferencia de electrones (ET).



**Figura 5: Estructura de radical DPPH<sup>•</sup>.**

El ensayo ORAC se basa en la capacidad del antioxidante para atrapar al radical, compitiendo con una molécula sonda, resultando en la supresión del decaimiento de esta molécula sonda; esto es medido por fluorescencia (FL) o absorción visible (PGR). La tasa de *scavenging* de radicales se evalúa por medio de la oxidación de una sonda con alta reactividad, tal como lo es el compuesto PGR y la cantidad de captación de radicales se evalúa mediante la oxidación de una molécula sonda con baja reactividad como la fluoresceína <sup>[24, 25]</sup>. Por medio de una termólisis, estos ensayos mantienen un flujo constante de radicales peróxilos, radical libre presente en la biología humana, y que reacciona con el antioxidante por mecanismo HAT. Para estandarizar los resultados obtenidos, se utiliza el compuesto Trolox, que es un símil hidrosoluble de la vitamina E, obteniendo una pendiente Trolox, que nos permite obtener un índice ORAC. En la Figura 6 se muestran las estructuras de las moléculas sonda FL y PGR, además se muestra la estructura del estándar Trolox.



**Figura 6: Estructuras de los compuestos fluoresceína, rojo de pirogalol y estándar Trolox.**

### 1.6. Métodos cromatográficos

El método más comúnmente utilizado para realizar separaciones analíticas de compuestos estrechamente relacionados en muestras complejas es la cromatografía. La muestra se disuelve en una fase móvil y se hace pasar por una fase estacionaria inmisible, la cual se encuentra fija en una columna o sobre una superficie sólida. Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos, el primero de ellos se basa en la forma en que la fase móvil y la fase estacionaria se encuentran en contacto y la segunda, y más fundamental, se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases.

Se desprenden tres clases generales de cromatografías: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluido supercrítico.

Se encuentran cuatro tipos básicos de cromatografía en la que la fase móvil es un líquido (HPLC): cromatografía de reparto, cromatografía de adsorción, cromatografía iónica y cromatografía de exclusión por tamaño. En HPLC se utilizan tres tipos de bombas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante. Los tipos de detectores corresponden a una propiedad de la fase móvil, así existen de absorbancia (UV con filtros, UV con monocromadores (Detector de Arreglo de Diodos (DAD), IR), fluorescencia, electroquímico, índice de refracción, conductividad, espectrometría de masa, FT-IR y dispersión de luz. La cromatografía de reparto se puede subdividir en cromatografía líquido-líquido y fases unidas químicamente, para esta última, las columnas se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice y poseen rellenos de fase inversa, donde la fase estacionaria es no polar, tratándose de un hidrocarburo generalmente y la fase móvil es relativamente polar (como agua, metanol o acetonitrilo) y de fase normal, que posee fases estacionarias de elevada polaridad (tales como agua o trietilenglicol). En los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución.

La cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) se puede aplicar a una gran variedad de matrices y compuestos, incluyendo productos no volátiles y termolábiles.

### 1.7. Planteamiento del problema

Los antioxidantes naturales procedentes de fuentes residuales pueden ser utilizados para aumentar la vida útil de los alimentos, para prevenir la peroxidación lipídica y proteger a los sistemas vivos de los daños de la oxidación mediante el *scavenging* de ROS. Para la industria es importante que la protección frente a la

oxidación se base en esta capacidad, para retardar o inhibir la rancidez que altera el aroma y sabor en los alimentos, producto de la deterioración oxidativa de los aceites y grasas, que no sólo disminuye la calidad nutricional, también genera compuestos secundarios que podrían ser potencialmente tóxicos <sup>[13]</sup>.

Es en este contexto donde la chía, es una semilla altamente recomendable para el consumo puesto que se compone de proteína (15-25 %), grasas (30-33 %), hidratos de carbono (26-41 %), fibra dietética (el 18-30 %), ceniza (el 4-5 %), minerales, vitaminas, y materia seca (el 90-93 %) y una alta cantidad de antioxidantes <sup>[4, 19, 20]</sup>, los cuales protegen a la semilla contra ciertas condiciones adversas y previenen el deterioro de los aceites esenciales. Los antioxidantes que se han identificado en la semilla de chía son Flavonoles y ácidos fenólicos como miricetina, quercetina, caempferol y ácido caféico, entre otros <sup>[21, 22, 23]</sup>.

La cosecha de la semilla de la chía se lleva a cabo cuando la planta se comienza a marchitar y las espigas contienen las semillas en su interior. Éstas son separadas en el proceso de limpieza de la semilla, donde las espigas son desechadas. Se propone que esta espiga podría ser una nueva fuente orgánica importante de antioxidantes, otorgándole un valor agregado a la espiga, para las cuales los estudios son limitados y no hay estudios sobre las propiedades de la planta, y teniendo el conocimiento que los polifenoles son metabolitos ubicuos de ésta, se espera encontrar capacidad antioxidante en otras partes de la planta de chía como las hojas y tallos, además de comparar la espiga residual (post-cosecha) con la espiga inflorescencia de chía negra y blanca de esta planta, *Salvia hispanica* L.

## **2. Hipótesis**

Dado que la semilla de chía es un alimento que presenta una importante cantidad de antioxidantes, se podrían encontrar estos componentes en la espiga de la semilla de chía, presentando una capacidad antioxidante que hasta ahora no ha sido estudiada y podría utilizarse en la industria alimenticia.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general**

Evaluar la capacidad y reactividad de antioxidantes del extracto de espiga de chía y caracterizar el perfil polifenólico presente en ella.

### **3.2. Objetivos específicos**

- I. Optimizar la extracción por ultrasonido de la espiga de chía y comparación con extracción por solvente acelerado (ASE).
- II. Determinar y analizar la capacidad antioxidante por medio de ensayo DPPH por espectrofotometría.
- III. Determinar y analizar la capacidad antioxidante del extracto de espiga de chía por el método ORAC-FL por fluorometría.
- IV. Evaluar la reactividad de los antioxidantes presentes en el extracto de espiga de chía mediante el método ORAC-PGR por espectrofotometría.
- V. Caracterizar el perfil polifenólico presente en el extracto de la espiga de chía por HPLC-DAD.

## 4. Reactivos y métodos

### 4.1. Reactivos

Fluoresceína (FL), Fluka Analytical. Rojo de Pirogalol (PGR), Sigma-Aldrich. Trolox (ácido-6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Sigma-Aldrich. AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida)), Sigma-Aldrich. DPPH (2,2 difenil-1 picrilhidracilo), Sigma-Aldrich. Catequina ((2R,3S)-2-(3,4-Dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopirano-3,5,7-triol), Sigma-Aldrich. Ácido gálico, (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), Sigma-Aldrich. Ácido protocatecuico, (ácido 3,4-Dihidroxibenzoico), Sigma-Aldrich. Hesperetina, Sigma-Aldrich. Hesperidina, Sigma-Aldrich. Quercetina, (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4*H*-cromen-4-ona), Sigma-Aldrich. 4-metilcatecol, Sigma-Aldrich. Fosfato monopotásico, Sigma Aldrich. Fosfato disódico, Sigma Aldrich. Metanol grado gradiente, Merck Millipore. Agua grado HPLC, Ricca Chemical. Ácido acético, anhídrido glacial grado gradiente, para análisis cromatografía líquida. Merck Millipore. Acetonitrilo, para análisis de cromatografía líquida, Merck Millipore.

### 4.2. Muestras de planta

La espiga de chíá analizada proviene desde Argentina, por la empresa Benexia, la cual comercializa en Chile Semilla de Chíá Benexia<sup>®</sup>, la Fibra de Chíá Benexia<sup>®</sup> y Aceite de Chíá Benexia<sup>®</sup>.

Las partes de la planta analizadas hoja, tallo, espiga inflorescencia de las variedades negra y blanca, fueron obtenidas gracias a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile.

Las muestras de planta se secaron y posteriormente se trituraron para el análisis.

La semilla de chíá desgrasada y sin mucílago se obtuvo gracias a la Escuela de Ingeniería de la Universidad Católica de Chile.

### 4.3. Metodologías

#### 4.3.1. Extracción con solvente acelerado (ASE)

Para la obtención del extracto de chíá se utilizó el método descrito por Wu y col. [31,32]. Se pesó 2 g de espiga de planta de chíá y se mezclaron junto a 5,0 g de arena en una celda de extracción de 22 mL. La extracción se realizó en un equipo ASE<sup>®</sup> 200, con tiempo de extracción estática de 5 min, purga de 60 segundos, 3 ciclos y a una presión de 1500 psi. Se inició la extracción con Hexano/Diclorometano a 70°C, la cual no presentó capacidad antioxidante, seguida de una segunda extracción con Acetona/Agua nanopura/Ácido Acético (AWA, 70.0/ 29.5/ 0.5 % v/v) (3 ciclos cada una) a 80°C. Los extractos con AWA fueron transferidos a un matraz volumétrico de 100 mL y diluidos en AWA hasta un volumen final de 31, 23 y 52 ml para los ciclos 1, 2 y 3 respectivamente y luego fueron analizados. Se muestra un esquema de la metodología en la Figura 7.

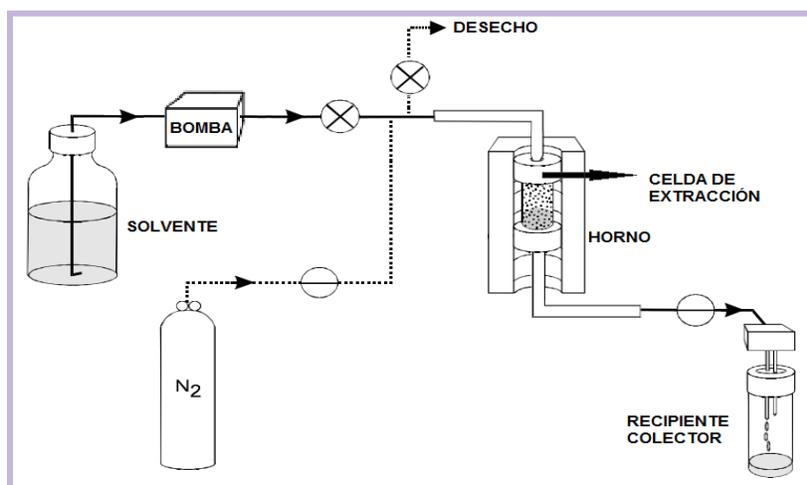


Figura 7: Esquema de metodología de extracción con solvente acelerado ASE.

#### **4.3.2. Extracción asistida con ultrasonido**

Se mezcló un gramo de muestra de planta con 25 mL de solución extractante, Acetona/Agua nanopura/Ácido acético (AWA, 70.0/29.5/0.5 % v/v). La mezcla se preparó en matraces cerrados y sin exposición a la luz durante todo el proceso de extracción. Esta mezcla se sometió a un baño de ultrasonido (44 Khz de frecuencia) durante el tiempo correspondiente a la optimización e inmediatamente se maceró por un tiempo determinado a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota, la cual se centrifugó por 10 minutos a 6600 rpm en microcentrifuga Robo-Spin de LabTech. Se analizó el sobrenadante <sup>[29]</sup>.

#### **4.3.3. Determinación de la capacidad antioxidante por medio de ensayo DPPH**

El estudio se basó en la medida fotométrica del radical DPPH<sup>\*</sup> a 516 nm aproximadamente <sup>[28]</sup>, en el espectrómetro UV-Vis UNICAM.

Previo a la determinación, cuando fue necesario, los extractos de chíá fueron diluidos en metanol, para el extracto de espiga de chíá y semilla no hubo dilución. En cambio para la espiga inflorescencia y tallo se tomaron 350 µL de este extracto y se diluyó en 700 µL de MeOH (33,3 % v/v), de este último, se tomó una alícuota de 240 µL de extracto de hojas de chíá que fue diluida en 960 µL de MeOH (20,0 % v/v). De ésta dilución, cinco alícuotas de los extractos (desde 20 µL a 60 µL), fueron agregada a 3 mL de una solución DPPH<sup>\*</sup> de concentración cercana a 0,09 mM, equivalente a una unidad de absorbancia. Se registró la disminución de las absorbancias de cada solución de DPPH<sup>\*</sup>, después de la incubación en oscuridad durante 15 minutos desde la adición de los volúmenes crecientes de extracto de planta de chíá, lo cual permitió obtener el porcentaje de inhibición del radical libre.

Éstas fueron graficadas en función de los microlitros agregados y mediante regresión lineal se obtuvo el IC<sub>50</sub>, que es la cantidad de extracto de planta de chía capaz de inhibir a un 50% el radical DPPH•, expresado en miligramos de chía.

El porcentaje de inhibición se calcula a partir de la ecuación 6:

$$\%Inhibición = \frac{A-\alpha}{A} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

A = Absorbancia del blanco.

α = Absorbancia de la muestra.

Los experimentos en este ensayo fueron realizados en triplicado.

#### **4.3.4. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC-FL**

Este método mide la degradación oxidativa de la molécula sonda fluoresceína, después de interactuar con el radical peróxido (ROO•) generado térmicamente a partir de AAPH (2,2'-Azo-bis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro <sup>[26]</sup>.

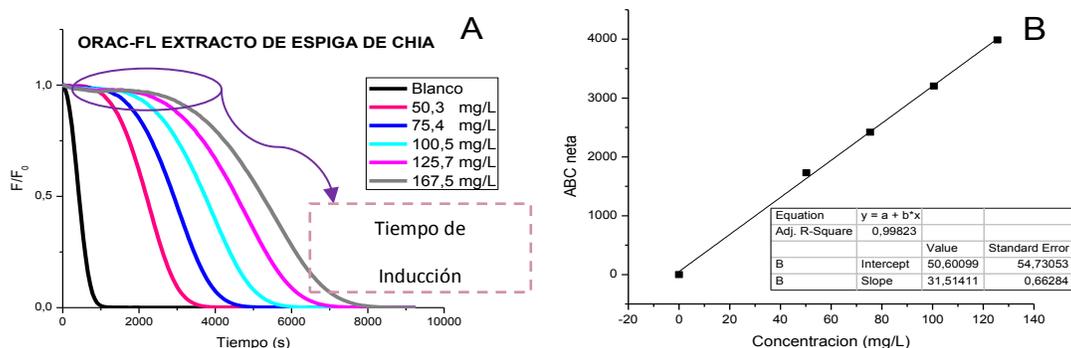
La fluorescencia se midió cada 1 minuto durante un tiempo determinado con una excitación a una longitud de onda de 485 nm y una emisión de 528 nm en un multilector de microplacas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc., utilizando microplacas de poliestireno blancas de 96 celdas. Se utilizó el programa Gen 5 para controlar el multilector.

El volumen final en cada celda de la microplaca fue de 200 µL y el medio de reacción fue buffer fosfato 75 mM a pH 7,4. Usando una micropipeta multicanal se agregaron en cada celda 150 µL de fluoresceína cuya concentración final fue 54,5 nM y alícuotas de 25 µL de extracto de chía diluido en buffer para la obtención de seis diferentes concentraciones, incluida una solución blanco que consta de buffer

fosfato en lugar de extracto de chíá. La microplaca fue preincubada por 15 minutos a 40°C en el multilector y posteriormente se agregaron 25 µL de AAPH, cuya concentración final en cada celda fue 18,75 mM. Se registra la fluorescencia luego de una agitación automática.

Se construyeron curvas de decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo (Figura 8 A). Se calculó el área bajo la curva (ABC) para las diferentes concentraciones del extracto de chíá al integrar el decaimiento de la fluorescencia normalizado con respecto a  $F_0$  ( $F/F_0$ ). El ABC neta de una muestra fue calculado al restar a cada ABC su correspondiente blanco. El ABC neta se relaciona linealmente con la concentración de antioxidante presente, lo que permitió determinar la capacidad antioxidante del extracto a través de la pendiente obtenida mediante la ecuación lineal (Figura 8 B).

Las curvas de decaimiento de la fluorescencia de los ensayos ORAC-FL muestran un tiempo de inducción, el cual indica el tiempo en que la fluoresceína está siendo protegida al reaccionar los compuestos antioxidantes presentes en el extracto de espiga de chíá con los radicales peroxilo generados térmicamente, tal como se observa en la Figura 8 A).



**Figura 8: A) Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por efecto de los radicales peroxilo. B) relación área bajo la curva del decaimiento versus concentración.**

Todos los datos obtenidos fueron procesados utilizando el programa Origin Pro 8 SR2 (Origin Lab Corporation, USA) y se realizaron por triplicado.

Los índices ORAC-FL (Ecuación 7) fueron expresados como Trolox equivalentes [26]. Para la obtención de estos datos se realizaron curvas con diferentes concentraciones de Trolox (Figura 6) como antioxidante, utilizando la misma metodología que en ORAC-FL para el extracto de chía, resultando una pendiente que permitió estandarizar la capacidad antioxidante, al dividir la pendiente obtenida por el compuesto en estudio por la pendiente Trolox obtenida en las mismas condiciones.

$$\text{Índice ORAC}_{\text{FL}} = \frac{m_{\text{AH}}}{m_{\text{Trolox}}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

m AH: Pendiente obtenida para el compuesto antioxidante.

m Trolox: Pendiente obtenida para el estándar Trolox.

#### **4.3.5. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ORAC-PGR**

Este método se basa en la competencia entre el antioxidante y la molécula sonda por el radical peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ) al igual que en el ensayo ORAC-FL.

Se utilizó un multilector de microplacas Synergy de Bio-Tek Instruments, Inc., microplacas de poliestireno transparente de 96 celdas. Se usó el programa Gen 5 para controlar el multilector.

Como molécula sonda se utilizó rojo de pirogalol (PGR), el cual reacciona muy rápidamente con los radicales libres; por lo tanto, es un indicador de la calidad de los antioxidantes presentes en el extracto de planta de chía [27].

El volumen final en cada celda de la microplaca fue de 200  $\mu\text{L}$  y el medio de reacción fue buffer fosfato de concentración 75 mM a pH 7,4. Usando una

micropipeta multicanal se agregaron en cada celda 150  $\mu$ L de rojo de pirogalol 70  $\mu$ M, cuya concentración en celda fue 52,4  $\mu$ M y alícuotas de 25  $\mu$ L de extracto de chíá diluido en buffer para la obtención de seis diferentes concentraciones, incluida una solución blanco que consta de buffer fosfato en lugar de extracto de chíá. La microplaca fue preincubada por 15 minutos a 40°C en el multilector y posteriormente se agregaron 25  $\mu$ L de AAPH, cuya concentración final en cada celda fue 0,1 M.

En el ensayo ORAC-PGR se realizó el mismo tratamiento de datos que en el ensayo ORAC-FL, pero nos proporcionaría un índice de reactividad, relacionado con la velocidad de reacción del antioxidante al medir la absorbancia a 540 nm.

#### **4.3.6. Caracterización de polifenoles por HPLC-DAD**

Para realizar una caracterización polifenólica se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con un detector de arreglo de diodos (DAD) Agilent Technologies 1200 system, utilizando una columna C18e Chromolith® HighResolution de 100-4,6 mm de diámetro y 10 cm de largo, sistema de bomba cuaternaria e inyección automática, el volumen de inyección (loop) fue de 20  $\mu$ L. La adquisición de datos se realizó a las longitudes de onda máxima de cada compuesto (Tabla I, Anexo).

La composición de la fase móvil en el programa de elución óptimo utilizado consiste en acetonitrilo (A)- ácido acético 2 % (B) (Tabla II, Anexo).

Los compuestos estándares utilizados fueron: ácido gálico, catequina, hesperidina, 4-metilcatecol, quercetina, hesperetina y ácido protocatecuico.

Para la determinación de los tiempos de retención de los polifenoles, se inyectaron individualmente 0,50 mM de cada compuestos en fase móvil 2% ácido acético:acetonitrilo (90:10% v/v).

Para la identificación, se prepararon estándares 0,50 mM de cada uno de los polifenoles en fase móvil (2% ácido acético:acetonitrilo (90:10% v/v)). Se agregaron alícuotas de 2  $\mu\text{L}$  de los estándares a 1 mL de los extractos; luego se inyectaron éstas mezclas y los cromatogramas obtenidos se compararon con los de los extractos de planta de chía. La identificación se basó en el aumento de las áreas de las señales de los extractos, cuyos tiempos de retención fueron los obtenidos con los estándares originales.

Una vez identificados los polifenoles presentes en el extracto de espiga de chía, se procedió a su cuantificación. Para la cuantificación se utilizaron curvas de calibración. Se prepararon diluciones en fase móvil de cada polifenol, cuyas concentraciones corresponden a 0,05; 0,1; 0,15; 0,20 y 0,25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cada una de estas disoluciones fue inyectada en el cromatógrafo para obtener su área que es proporcional a su concentración. La concentración de los extractos se calcula interpolando en una curva de calibración que relaciona el área del pico de cada polifenol en función de la concentración.

#### **4.3.7. Diseño experimental *screening* factorial**

Para el diseño y planificación de la optimización de la extracción de las partes de planta de chía, se usaron las espigas de chía blanca y negra, evaluando la capacidad antioxidante de estos extractos; al obtener un máximo de capacidad antioxidante, obtenemos un óptimo en la extracción.

Se utilizó un método estadístico para estudiar el efecto de los dos factores experimentales involucrados: tiempo de ultrasonido y tiempo de maceración. Para esto, se usó el programa *Statgraphic Plus* versión 5.1 con el cual se realizó un diseño experimental *screening* factorial  $2^2$  con tres centros. Se estableció un tiempo mínimo y máximo para cada factor experimental, siendo 0,5 y 1,5 horas para la extracción en ultrasonido; 1 y 24 horas de tiempo de maceración. En la

Tabla 2 se muestran todas las posibles combinaciones al azar entre los valores máximos y mínimos para las dos variables de extracción con un punto central repetido tres veces que arrojó el programa.

**Tabla 2: Tiempos de ultrasonido y maceración obtenidos por análisis multivariable.**

Tiempo ULTRASONIDO [horas]	Tiempo MACERACIÓN [horas]
1,5	1
1	12,5
1,5	24
0,5	1
1	12,5
0,5	24
1	12,5

Los resultados del diseño de la optimización se realizaron por triplicado y a partir de ellos se pudo analizar qué factor tiene significancia estadística para los ensayos experimentales DPPH y ORAC-FL, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), para los cuales se consideran significativos aquellos resultados con valores de  $p \leq 0,05$ .

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Ensayos preliminares

Se prepararon dos soluciones de extracto de espiga de chíá, uno de ellos se obtuvo mediante extracción asistida con ultrasonido y maceración y la segunda solución se obtuvo por extracción con solvente acelerado de modo exploratorio para verificar que los extractos presentaran capacidad antioxidante, por medios de las metodologías ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH, ya que son los primeros ensayos realizados para este tipo de planta.

#### 5.1.1. Extracción con solvente acelerado ASE

En la extracción con solvente acelerado se emplearon tres ciclos para 2 gramos de espiga de chíá, los ciclos 1, 2 y 3 respectivamente. Los ciclos fueron analizados independientemente en cada ensayo y los resultados se muestran en la Tabla 3:

**Tabla 3: Resultados ensayos ORAC y DPPH para ciclos obtenidos por ASE.**

Extracto de espiga de chíá	Pendiente promedio ORAC-FL [ABCn/mgL <sup>-1</sup> ]	Pendiente promedio ORAC-PGR	DPPH promedio IC <sub>50</sub> [mg]
<b>CICLO 1</b>	17 ± 3	-	Sin evaluar
<b>CICLO 2</b>	12,9 ± 0,7	-	9,16 ± 0,03
<b>CICLO 3</b>	16,8 ± 0,1	-	Sin evaluar

En el ensayo ORAC-FL se aprecia una disminución no significativa de la capacidad antioxidante entre el CICLO 1 y CICLO 2, y un aumento en el ciclo final (CICLO 3), que es estadísticamente igual al valor del CICLO 1. Dado estos

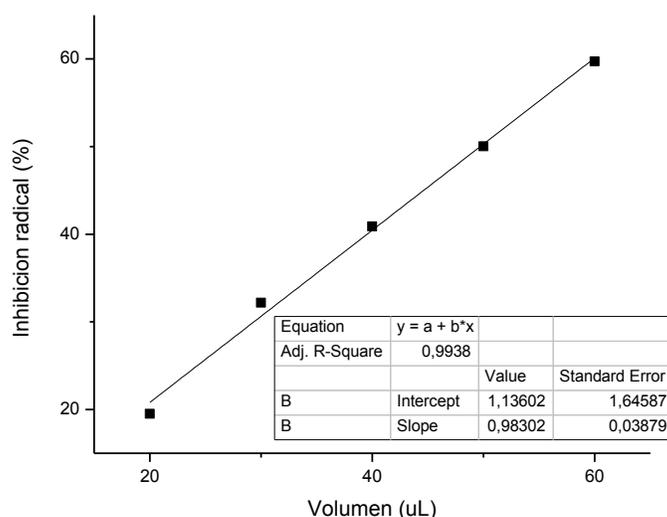
resultados, se infiere que en CICLO 1 se logra la extracción de compuestos antioxidantes que se encuentran en la superficie de la planta y son de fácil extracción, posteriormente en el CICLO 2 se comienzan a romper los tejidos vegetales ya debilitados en el CICLO 1, debido a la presión ejercida por el solvente y el tiempo de contacto, y finalmente los compuestos que permanecían en las membranas celulares son liberados a la solución extractante en el CICLO 3. Dado que los valores obtenidos en el tercer ciclo son tan altos como los obtenidos en el primero, se especula que en un cuarto y/o quinto ciclo se lograría extraer la mayoría de los compuestos antioxidantes de la muestra de espiga de chíá. Cabe mencionar, que no se obtuvieron resultados en el ensayo ORAC-PGR, lo cual se discutirá más adelante.

La evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH se realizó sólo en el extracto de espiga obtenido en el CICLO 2, dado que muestra una menor capacidad antioxidante en ensayo ORAC-FL, de esta manera se obtiene un valor referencial del IC<sub>50</sub> mínimo obtenido para este método de extracción, para luego ser utilizado en los ensayos posteriores. Como ejemplo del procedimiento del cálculo, se muestra en la Tabla 4 los porcentajes de inhibición del radical.

**Tabla 4: Porcentaje de inhibición del radical DPPH frente al extracto de planta de chíá.**

<b>µL de extracto de chíá</b>	<b>Cantidad de planta de chíá [mg]</b>	<b>Absorbancia de la muestra</b>	<b>Porcentaje de inhibición del radical DPPH</b>
<b>20</b>	0,16	0,979743	19,48 %
<b>30</b>	0,25	0,825378	32,17 %
<b>40</b>	0,33	0,719421	40,88 %
<b>50</b>	0,41	0,608199	50,02 %
<b>60</b>	0,49	0,490206	59,72 %

Desde el gráfico de volumen de extracto de planta de chía vs. inhibición del radical, se desprende una ecuación de la recta que permite obtener el volumen y posteriormente los miligramos necesarios de espiga de chía para inhibir el 50% del radical DPPH•, lo que se muestra en la Figura 9. El resultado IC<sub>50</sub> para este ejemplo es 0,41 mg y el IC<sub>50</sub> promedio obtenido es 0,38 ± 0,04 mg.



**Figura 9. Gráfico de volumen de extracto de planta de chía vs. Inhibición del radical DPPH•.**

### 5.1.2. Extracción asistida con ultrasonido

En esta metodología de extracción, el tiempo de ultrasonido y maceración posterior utilizados fueron 0,5 horas y 1 hora, respectivamente. La cantidad de muestra fueron 2 gramos en 50 mL de la misma solución extractante utilizada en ASE. Los resultados obtenidos para los ensayos ORAC y DPPH se muestran en la Tabla 5:

**Tabla 5: Resultados ensayos ORAC y DPPH obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido.**

Extracto de chía	Pendiente promedio ORAC-FL [ABCn/mgL <sup>-1</sup> ]	Pendiente promedio ORAC-PGR	DPPH IC <sub>50</sub> [mg]
Espiga	31 ± 1	-	3,34 ± 0,04.

Como se puede observar en la tabla 5, el ensayo ORAC-PGR no presentó capacidad antioxidante al igual que en ASE.

### 5.1.3. Comparación de métodos de extracción

La pendiente promedio obtenida en ORAC-FL para la extracción asistida con ultrasonido es 1,8 veces mayor que la pendiente promedio obtenida por ASE en el ciclo que presentó mayor capacidad antioxidante (CICLOS 1).

Por otro lado, en el ensayo DPPH se observa que la extracción asistida por ultrasonido disminuyó 2,74 veces la cantidad de espiga de chía necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH<sup>\*</sup> comparada con el ciclo 2 aunque esta relación puede disminuir comparada con los otros ciclos, se infiere que el valor IC<sub>50</sub> obtenido en ASE será mayor que el obtenido por este método de extracción debido a la poca diferencia entre las pendientes obtenidas en ORAC-FL.

Los dos métodos de extracción ASE o extracción asistida con ultrasonido no presentaron valores de capacidad antioxidante por el ensayo ORAC-PGR, lo cual podría indicar que el extracto de espiga no presenta antioxidantes lo suficientemente reactivos. Este es un inconveniente de la metodología ORAC, ya que está influenciada tanto por la reactividad del antioxidante y/o por el número de radicales que cada molécula sonda puede atrapar. Los resultados pueden

depender de la molécula sonda empleada. López-Alarcón y Lissi <sup>[27]</sup> muestran la diferencia entre los ensayos ORAC en la Tabla 6, que se muestra a continuación:

**Tabla 6: Valores de ORAC-FL y ORAC-PGR para compuestos puros.**

Compuesto	ORAC-FL	ORAC-PGR
Quercetina	10,7 ± 0,4	11,5 ± 0,4
Kaempferol	10,2 ± 0,3	8,8 ± 0,7
Ácido gálico	1,2 ± 0,03	11,1 ± 0,7
Catequina	6,76 ± 0,22	1,3 ± 0,2
Ácido caféico	4,37 ± 0,24	0,2
Trolox	1	1
Rutina	6,01 ± 0,25	0,1
Ácido protocatecuico	6,7 ± 0,31	0,05

Se observa que para los compuestos quercetina y Kaempferol, los valores de ORAC, ya sea con molécula sonda FL o PGR son similares. En cambio, no así para el ácido gálico que muestra un valor ORAC-PGR 9,25 veces mayor que el obtenido para ORAC-FL. Por otro lado, catequina muestra que el valor de ORAC-FL es 8,3 veces mayor que ORAC-PGR, así como ácido caféico, rutina y ácido protocatecuico muestran un valor de ORAC-FL 5,5; 60,1 y 134 veces mayor que para ORAC-PGR, respectivamente. Observando los bajos valores de ORAC-PGR en algunos compuestos, a pesar de presentar altos valores de ORAC-FL, se deduce que los extractos de espiga presentarían la misma relación entre ensayos ORAC, es decir, presentan un mayor grado de captación de los radicales libres, sin embargo, la reactividad es baja.

Con los resultados obtenidos hasta ahora, se infiere que mediante una optimización en el tiempo de ultrasonido y maceración de extracción se puede potenciar el aumento de la actividad antioxidante de este método, ya que presenta mejores resultados en este análisis preliminar. Además en este método se emplearía una menor cantidad de solvente, disminuyendo la contaminación medioambiental. Es por esto que en la extracción asistida con ultrasonido de este

trabajo, se disminuyó el volumen de solvente al utilizar 0,5 g de muestra para el cual se necesitan 12.5 mL, pero manteniendo la relación entre la cantidad de espiga por volumen de solución extractante, disminuyendo aún más la contaminación ambiental. Es posible apreciar la diferencia entre ambas metodologías mediante una eco-escala presentada en la Tabla 7.

**Tabla 7: Puntajes Eco-Escala para las metodologías de extracción aplicadas.**

Técnica de extracción	Puntaje Eco-Escala analítica
<b>ASE</b>	77
<b>Asistida por ultrasonido</b>	83

En esta eco-escala presentada por A. Galuszka y col. <sup>[33]</sup>, se asume que una metodología ideal tiene un puntaje de 100 y se penaliza con puntaje asignado para cada parámetro que signifique un daño para el ecosistema. Con el puntaje obtenido se verifica si la metodología utilizada es una metodología verde. Los puntajes mayores a 75 puntos representan excelente metodología verde. Si el puntaje es mayor a 50, representa una aceptable metodología verde. Los puntajes menores de 50, representa una inadecuada metodología verde.

Ambas metodologías presentan un alto puntaje y representan una excelente metodología verde, sin embargo, ASE resulta ser una metodología más contaminante que la extracción asistida por ultrasonido. Los cálculos para la obtención de estos resultados se muestran en el Anexo, Tabla V.

## **5.2. Optimización de las variables de extracción**

La optimización se realizó por medio de un análisis multivariable mostrado en la Tabla 2 (punto 4.3.7.) que permitió evaluar la influencia del tiempo de ultrasonido y del tiempo de maceración en la capacidad antioxidante con el fin de determinar

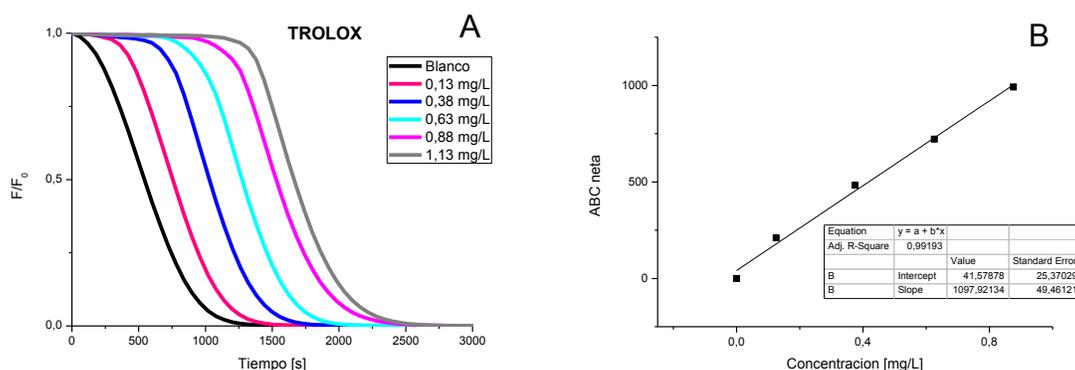
una combinación que otorgue un óptimo en la extracción por el método de extracción asistida con ultrasonido.

Los métodos de extracción tradicionales de antioxidantes desde los tejidos vegetales son maceración y reflujo. Estos métodos dependen en gran medida de la agitación para mejorar la solubilidad y la eficiencia de la transferencia de masa de los antioxidantes entre la muestra y la solución extractante, por lo general, requieren de mucho tiempo de extracción y alta temperatura. Sin embargo, la extracción asistida por ultrasonido es un método de extracción capaz de extraer altas cantidades de compuestos activos, otorga mayor pureza del producto final y consume sólo una fracción de tiempo y energía. Este método se basa en romper la pared celular, permitiendo una difusión del disolvente a través de la matriz celular, lo que permite la extracción de los contenidos desde la célula vegetal. Por lo tanto, la extracción asistida con ultrasonido consigue una mayor penetración de un disolvente en un tejido vegetal y la extracción de los compuestos de la planta es más eficaz que la extracción con simple maceración y como se observó para la espiga de chíca, también es mejor que ASE.

La aplicación de ultrasonido para la extracción de contenidos de antioxidantes parece ser un método de extracción eficiente, que puede ser implementado fácilmente.

### **5.2.1 Optimización de los tiempos de extracción mediante evaluación de capacidad antioxidante por ORAC-FL y DPPH**

Para obtener el índice ORAC y así poder comparar los resultados, se calculó la pendiente Trolox. La Figura 10 muestra una curva de decaimiento de fluorescencia y su respectivo valor de pendiente, de las cuales se obtiene un promedio para Trolox que fue de  $1093 \pm 8$  [ABCn/mg $L^{-1}$ ]. Este valor se reemplazó posteriormente en la ecuación 7 (mostrada en el punto 4.3.4.), para obtener el Índice ORAC-FL.



**Figura 10: A) Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por efecto de los radicales peroxilo. B) Relación área bajo la curva del decaimiento versus concentración del compuesto estándar Trolox.**

El diseño experimental mostrado en la Tabla 2 se aplicó al extracto de espiga de chíca variedad negra. En la Tabla 8 se indican los tiempos de extracción para las dos variables y los valores de capacidad antioxidante obtenidos para el diseño experimental.

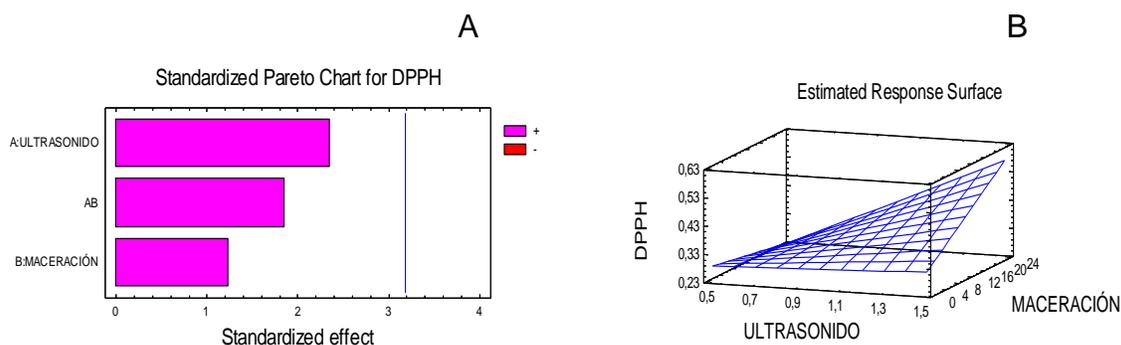
**Tabla 8: Capacidad antioxidante mediante ensayo DPPH y ORAC-FL de espiga de chíca negra.**

Tiempo ULTRASONIDO	Tiempo MACERACIÓN	DPPH IC <sub>50</sub> [mg]	Pendiente ORAC-FL	Índice ORAC-FL
1,5	1	0,28	114,9 ± 0,5	0,1051 ± 0,0005
1	12,5	0,42	131,2 ± 0,4	0,1200 ± 0,0004
1,5	24	0,528	165 ± 2	0,151 ± 0,002
0,5	1	0,24	134,3 ± 0,1	0,1229 ± 0,0001
1	12,5	0,39	130 ± 1	0,119 ± 0,002
0,5	24	0,19	138 ± 1	0,126 ± 0,001
1	12,5	0,43	148 ± 2	0,135 ± 0,002

Los valores de IC<sub>50</sub> mostrados en la Tabla 8 son inversamente proporcionales a los valores IC<sub>50</sub> obtenidos en el ensayo DPPH, ya que el programa entrega como resultado óptimo los tiempos de ultrasonido y maceración en los que se obtiene un

mayor valor para la capacidad antioxidante y la información que entrega el ensayo DPPH es que al tener como resultado un  $IC_{50}$  elevado, se necesita una mayor cantidad de miligramos de espiga para inhibir el 50 % del radical DPPH', es decir, representa una menor capacidad antioxidante.

Paralelamente, se obtienen los diagramas de Pareto para cada metodología de capacidad antioxidante, los cuales entregan información sobre la significancia de las diferentes variables. En la Figura 11 A), se muestra el diagrama de Pareto obtenido para el ensayo DPPH, el cual indica que las variables no son significativas para el análisis ( $p\text{-value} > 0,05$ ), sin embargo, al analizar la influencia de las variables independientemente y en conjunto, se obtienen valores positivos, indicando que al aumentar el tiempo de las variables, existe un aumento no significativo en los valores de capacidad antioxidante y por lo tanto la extracción de éstos.

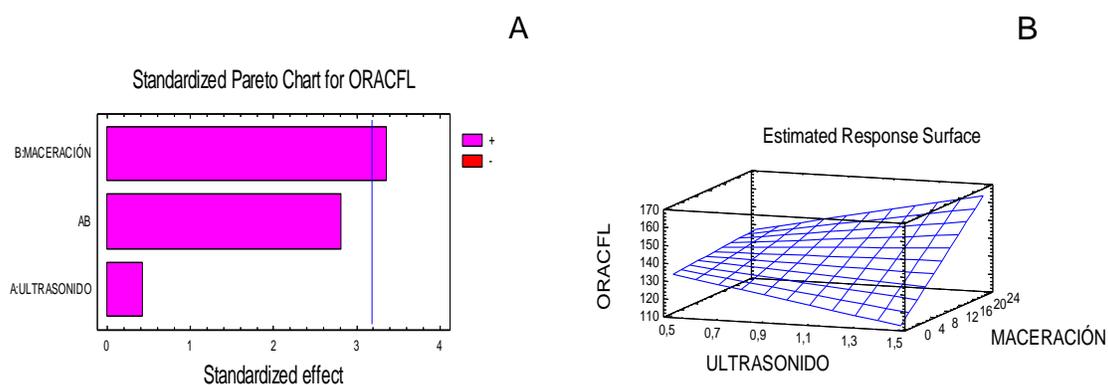


**Figura 11: A) Diagrama de Pareto indicando la influencia de las variables ultrasonido y maceración para la determinación de la capacidad antioxidante de la variedad de espiga negra. B) Diagrama de superficie que indica los tiempos necesarios para la obtención de una mayor capacidad antioxidante con metodología DPPH.**

El gráfico de superficies mostrado en la Figura 11 B) nos muestra los tiempos de extracción óptimos para el ensayo DPPH. Se observa este valor en 1,5 horas de ultrasonido y 24 horas de maceración, en donde se obtiene la máxima capacidad antioxidante. Si se observa el eje del tiempo de maceración, éste tiene una pendiente positiva y muy pronunciada lo que nos indica que si sobrepasamos las

24 horas, la extracción de los antioxidantes será mayor. No así para el eje del tiempo de ultrasonido, ya que es probable que un aumento del tiempo podría provocar la degradación de los antioxidantes.

En el diagrama de Pareto para ORAC-FL mostrado en la Figura 12 A) se observa que la maceración es una variable positiva y significativa ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ), mientras que el ultrasonido y la interacción de ambas variables (AB) son positivas, pero no significativas ( $p\text{-value} > 0,05$ ). Estos resultados coinciden con los obtenidos con la metodología DPPH, exceptuando que la variable de tiempo de maceración es significativa. Esta diferencia se debe a que la metodología ORAC-FL es realizada por medio de fluorimetría la cual es más sensible que espectrofotometría. Por otro lado, el radical utilizado en ORAC-FL es peroxilo, el cual posee un tiempo de vida media de 3-10 s. y es más reactivo que el radical DPPH<sup>\*</sup>, que es un radical estable.



**Figura 12: a) Diagrama de Pareto indicando la influencia de las variables ultrasonido y maceración para la determinación de capacidad antioxidante de la variedad de espiga negra. B) Gráfico de superficie que indica los tiempos necesarios para la obtención de una mayor capacidad antioxidante con metodología ORAC-FL.**

El gráfico de superficies mostrado en la Figura 12 B) nos muestra los tiempos de extracción óptimos para obtener una mayor capacidad antioxidante en el ensayo ORAC-FL. Se observa un máximo en la capacidad antioxidante a 1,5 horas de ultrasonido y 24 horas de maceración, al igual que en el ensayo DPPH.

Si observamos la pendiente del eje del tiempo de maceración, es pronunciada y positiva, al igual que para el ensayo DPPH, lo cual también nos indicaría que a mayores tiempos de maceración, mayor sería la extracción de los antioxidantes. Por otro lado, si observamos el eje del tiempo de ultrasonido, se observa que a tiempos cortos de maceración hay una disminución de la extracción; pero a tiempos cercanos a 24 horas de maceración hay una leve pendiente positiva al aumentar el tiempo de ultrasonido.

Por otro lado, como una manera de confirmar los resultados de la optimización mostrados anteriormente, se realizó el mismo procedimiento pero con la variedad de espiga de chía blanca. Los resultados se muestran en la Tabla 9:

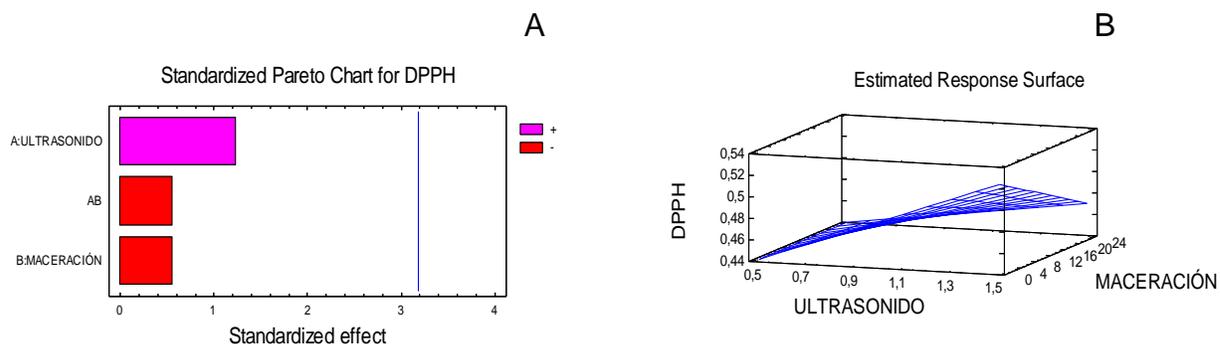
**Tabla 9: Capacidad antioxidante mediante ensayo DPPH y ORAC-FL de la espiga de chía blanca.**

Tiempo ULTRASONIDO	Tiempo MACERACIÓN	DPPH IC <sub>50</sub> [mg]	Pendiente ORAC-FL	Índice ORAC-FL
1	12,5	0,49	150 ± 2	0,137 ± 0,002
1,5	1	0,5	156,8 ± 0,4	0,1433 ± 0,0004
1,5	24	0,45	167 ± 1	0,1531 ± 0,0009
0,5	1	0,42	143,4 ± 0,8	0,1312 ± 0,0007
1	12,5	0,53	158 ± 2	0,145 ± 0,002
1	12,5	0,47	139 ± 2	0,127 ± 0,002
0,5	24	0,42	169 ± 3	0,155 ± 0,003

Los valores de IC<sub>50</sub> presentados en la Tabla 9, son inversamente proporcionales al valor obtenido en el ensayo DPPH, al igual que los valores presentados en la Tabla 8.

Para el extracto de espiga blanca no existe una correlación entre los dos métodos de determinación de capacidad antioxidante como lo fue con la espiga negra. El diagrama de Pareto para el ensayo DPPH mostrado en la Figura 13 A), indica que el tiempo de ultrasonido es una variable positiva y no significativa ( $p\text{-value} > 0,05$ ), mientras que la maceración y ambas variables (AB) presentan un efecto negativo

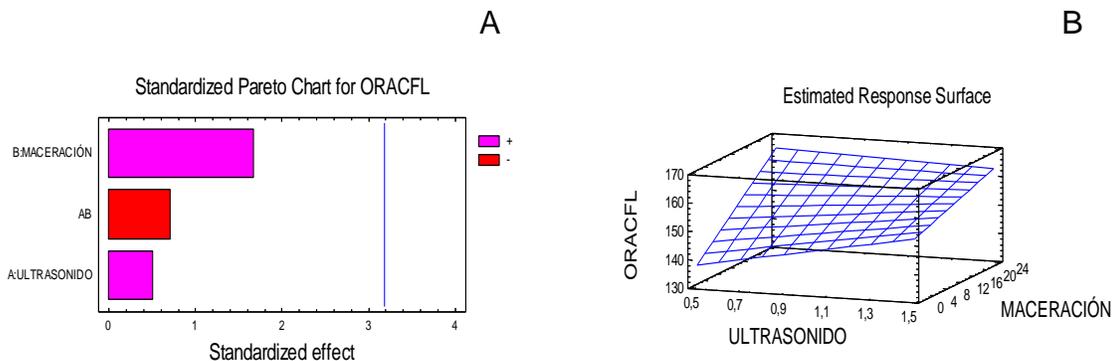
en la extracción, pero no significativo ( $p\text{-value} > 0,05$ ), ya que al superar 1 hora de maceración, la capacidad antioxidante disminuye. Debido a que estos resultados no son significativos no pueden ser comparados con los obtenidos con la espiga de chíá negra.



**Figura 13: A) Diagrama de Pareto indicando la influencia de las variables ultrasonido y maceración para la determinación de la capacidad antioxidante de la variedad de espiga blanca. B) Gráfico de superficie que indica los tiempos óptimos para la obtención de una mayor capacidad antioxidante con metodología DPPH.**

En la Figura 13 B), se muestra el gráfico de superficie en el que se observan los tiempos óptimos para la obtención de una mejor capacidad antioxidante en el extracto, estos tiempos corresponden a 1,5 horas de ultrasonido y 1 hora de maceración.

En el diagrama de Pareto mostrado en la Figura 14 A), para la metodología ORAC-FL se observa que ambas variables son positivas y no significativas en la capacidad antioxidante ( $p\text{-value} > 0,05$ ). Sin embargo, la interacción de ambas variables (AB) es negativa, indicando que al aumentar el tiempo en ambos métodos de extracción, la capacidad antioxidante tiende a disminuir.



**Figura 14: A) Diagrama de Pareto indicando la influencia de las variables ultrasonido y maceración para la determinación de capacidad antioxidante de la espiga inflorescencia blanca. B) Gráfico de superficie que indica los tiempos necesarios para la obtención de una mayor capacidad antioxidante con metodología ORAC-FL.**

El gráfico de superficie mostrado en la Figura 14 B), muestra que los tiempos óptimos de ultrasonido y macerado para obtener una máxima capacidad antioxidante son 0,5 y 24 horas respectivamente.

Desde los cuatro diagramas de Pareto y gráficos de superficie, se puede inferir que un aumento en el tiempo de ultrasonido no tiende a degradar a los compuestos antioxidantes presentes en la espiga, ya que el programa de análisis no la arrojó como una variable negativa. Estos resultados se comparan con estudios que revelan un aumento significativo en la capacidad antioxidante total después de 10 minutos de ultrasonido a frecuencias entre 20 a 490 kHz, y que después de 30 minutos, el valor de CA se mantiene más alto que el valor inicial obtenido (0 minutos) en muestras de frutas <sup>[29]</sup>. En el extracto de espiga de chíá tampoco existen cambios significativos relacionados con el tiempo de ultrasonido, a causa de que el tiempo mínimo empleado fueron 30 minutos y porque el tiempo de ultrasonido no tiene efectos negativos en la CA a 44 kHz.

La maceración es la variable significativa en la extracción para el fenotipo negro en metodología ORAC-FL y a la vez fue la variable con efectos negativos para la capacidad antioxidante en el fenotipo blanco. Se puede inferir que la variedad blanca presenta una composición polifenólica diferente, que podría ser más fácil

degradar al aumentar los tiempos de exposición a fuentes de ROS. De acuerdo a los resultados de optimización obtenidos hasta ahora y debido a las diferencias entre la variedad de chía blanca y negra, es que se procedió a una segunda optimización univariable donde se dejó constante el tiempo de ultrasonido y se varió el tiempo de maceración debido a que la mayoría de los gráficos de superficie mostraban una pendiente positiva y pronunciada para todos los experimentos realizados.

### 5.2.2 Optimización en tiempo de maceración

Dado que para la espiga de chía de variedad negra se obtuvo que el tiempo de maceración fue significativo, se pretende encontrar el tiempo óptimo de esta variable para un máximo de la capacidad antioxidante. Por este motivo se procede a aumentar el tiempo de maceración para una misma muestra, hasta observar una disminución en la capacidad antioxidante, para así determinar el máximo en la extracción. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10:

**Tabla 10: Experimento univariable.**

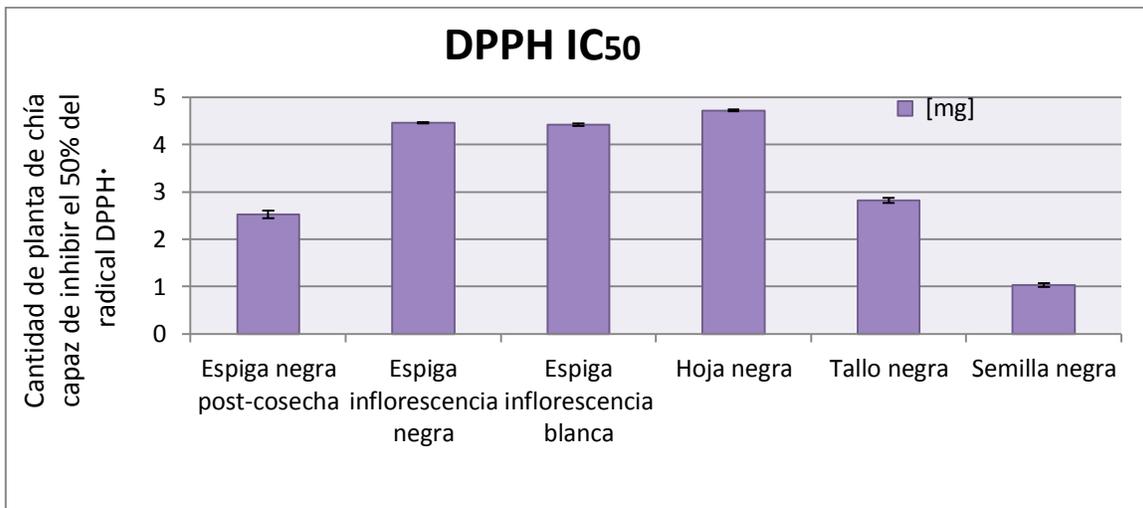
Tiempo ULTRASONIDO	Tiempo MACERACIÓN	DPPH IC <sub>50</sub> [mg]	Pendiente ORAC-FL	Índice ORAC-FL
1,5	1	0,33 ± 0,02	118,4 ± 0,3	0,1083 ± 0,0008
1,5	12	0,37 ± 0,04	137,3 ± 0,4	0,1256 ± 0,0004
1,5	24	0,327 ± 0,006	141,0 ± 0,1	0,1290 ± 0,0001
1,5	48	0,32 ± 0,04	145 ± 1	0,133 ± 0,001
1,5	72	0,28 ± 0,02	201,0 ± 0,2	0,1839 ± 0,0002
1,5	96	0,35 ± 0,01	137,2 ± 0,8	0,1255 ± 0,0008

Nuevamente existe una correlación entre los métodos DPPH y ORAC-FL para los diferentes extractos de planta del fenotipo negro. Se obtiene que el tiempo óptimo

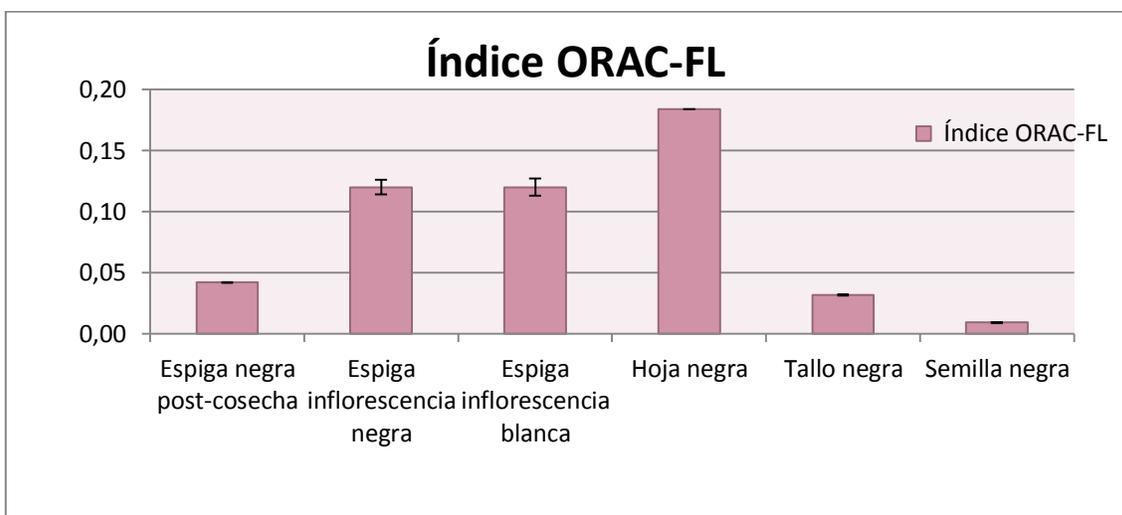
de maceración es 72 horas, en el cual se obtiene un valor  $IC_{50}$  de  $0,28 \pm 0,02$  mg, siendo ésta la cantidad de planta de chía necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH' y un índice ORAC-FL de  $0,1839 \pm 0,0002$ . Después de este tiempo, la actividad antioxidante disminuye, en un 31,7% y 9,7% para los ensayos ORAC-FL y DPPH, respectivamente, posiblemente por la mayor exposición de los antioxidantes al sufrir interacciones con luz y oxígeno, ya que estos dos factores son algunos de los responsables de la degradación de los compuestos orgánicos. Aunque los tiempos de optimización de las variables no sean los mismos para los dos fenotipos de espiga de chía negra y blanca, se utilizó en los siguientes ensayos los tiempos óptimos obtenidos para el fenotipo negro, los cuales corresponden a 1,5 horas de ultrasonido y 72 horas de maceración. Esto se basa en que la variedad blanca se encuentra mezclada en los cultivos de la variedad negra y es esta última la que es ampliamente comercializada, por lo que en las cosechas de las plantaciones de chía se obtienen como material residual las espigas mezcladas de estos dos fenotipos, siendo la variedad blanca la que se encuentra en una proporción inferior en el cultivo <sup>[3]</sup>.

### **5.2.3 Comparación de la capacidad antioxidante de distintas partes de la planta *Salvia hispanica* L. con los tiempos de ultrasonido y maceración optimizados.**

Ya obtenida la optimización de los tiempos extracción para obtener una máxima capacidad antioxidante, se procedió a evaluar esta capacidad en diferentes partes de la planta de chía. En las Figuras 15 y 16 se muestran los resultados obtenidos para los ensayos DPPH y ORAC-FL, respectivamente. En la Tabla III presentada en Anexo, se muestran los resultados de estos ensayos.



**Figura 15:** Gráfico de barras de los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para cada parte de la planta de chíá, en condiciones optimizadas de maceración y ultrasonido.



**Figura 16:** Gráfico de barras de los valores de ORAC-FL obtenidos para cada parte de la planta de chíá.

En la Figura 15 se muestran los valores de IC<sub>50</sub> inversamente proporcionales a los valores obtenidos para este ensayo, de esta manera se observa una relación con la Figura 16, que representa la capacidad antioxidante obtenida en el ensayo ORAC-FL.

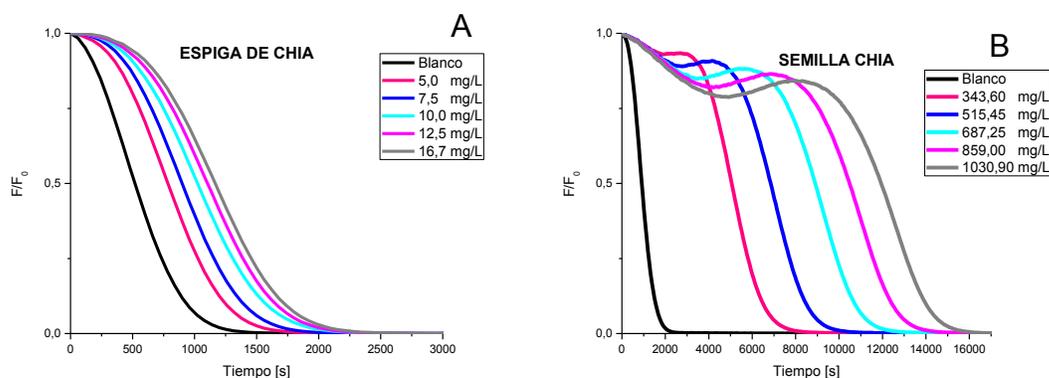
La capacidad antioxidante del extracto de hoja obtenido mediante ambos ensayos, DPPH y ORAC-FL es mayor que para los otros extractos estudiados de *Salvia hispanica* L. En el ensayo DPPH se obtiene que el  $IC_{50}$  del extracto de hoja es 8,8 veces inferior que el extracto de espiga (inversamente proporcional a la capacidad antioxidante) y es 4,39 veces mayor en el ensayo ORAC-FL. Por lo tanto, la hoja es la que debería contener mayor cantidad de compuestos antioxidantes. Esta diferencia explicaría por qué los pueblos precolombinos utilizaban las hojas como cataplasma en la inflamación e infusión para el dolor de cabeza en la medicina folclórica mexicana <sup>[3]</sup>.

De los extractos de diferentes partes de la planta que son considerados desechos (por lo tanto, descartando la semilla), el tallo es la parte de la planta que presenta menor capacidad antioxidante en el ensayo ORAC-FL. Se podría explicar este pobre rendimiento a que el tallo cumple una función de sostén de hojas, flores, espigas y semillas en el caso de la *Salvia hispanica* L. y no una función de protección a la planta como si lo es la espiga a la semilla o las grandes hojas a la planta en sí. Como se ha mencionado antes, los polifenoles cumplen un rol importante en la protección de las plantas, y es a estos compuestos a los que se les atribuye mayormente la actividad antioxidante.

Por otro lado, se esperaba que la semilla de chía presentara la mayor capacidad antioxidante en este trabajo. esto puede ser explicado ya que la semilla contiene grandes cantidades de mucílago y aceite los cuales deben ser retirados antes de extraer los antioxidantes, por lo tanto, las posibles causas de su bajo rendimiento (En ORAC-FL es 20,5 y 4,68 veces menor a la hoja y espiga respectivamente y es 14,2 y 1,61 veces mayor a la hoja y espiga respectivamente en el ensayo DPPH) son el tiempo de almacenamiento, el método de desgrasamiento, la extracción del mucílago o la necesidad de una solución extractante diferente (una extracción lipofílica podría sumarse al ensayo ORAC-FL hidrofílico aumentando la capacidad antioxidante). Finalmente, las espigas inflorescencia de las variedades de chía negra y blanca, son estadísticamente iguales respecto a los valores obtenidos en los índice ORAC-FL y los valores de  $IC_{50}$ , siendo la segunda parte de la planta que

presenta una mayor capacidad antioxidante después de la hoja, independiente del fenotipo, indicando que en la etapa anterior a la formación de la semilla, la espiga presenta mayor contenido de polifenoles, los cuales pierde al finalizar el proceso de cosecha, dado que una de las funciones de los polifenoles guarda relación con el desarrollo y crecimiento de la planta, además de su protección, por lo que se esperaba que la espiga inflorescencia mostrase una capacidad antioxidante mayor a la espiga post-cosecha.

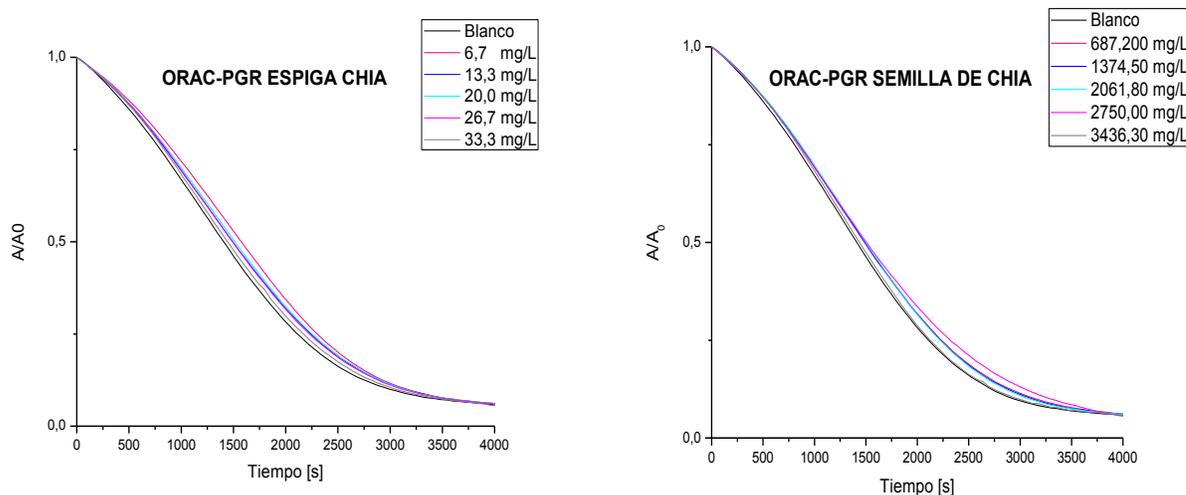
Los gráficos de decaimiento de la intensidad de fluorescencia y gráfico de relación del área bajo la curva del decaimiento vs concentración para el extracto de espiga y semilla se muestran a continuación en la Figura 17:



**Figura 17: A) Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por los radicales peroxilo en presencia de extracto de espiga de *Salvia hispanica* L. B: Gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de fluoresceína por los radicales peroxilo en presencia de extracto de semilla de *Salvia hispanica* L.**

En la Figura 17 B se observa el decaimiento de la fluoresceína al utilizar como antioxidante el extracto de semilla de chía y al compararlo con el extracto de espiga de chía post-cosecha (Figura 17 A), se aprecia que las curvas de decaimiento de la semilla presentan una irregularidad; esto puede ser atribuido a la cantidad de aceite que no fue retirado 100% totalmente de la semilla o la presencia de mucílago, los cuales son un interferente en la metodología.

Se realizó una nueva evaluación del ensayo ORAC-PGR utilizando los tiempos de optimización de ultrasonido y maceración obtenidos anteriormente para el extracto de espiga y semilla de chía, obteniendo baja reactividad. Los gráficos de decaimiento de la absorbancia de rojo de pirogalol se muestran en la Figura 18:



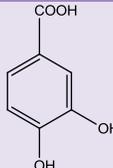
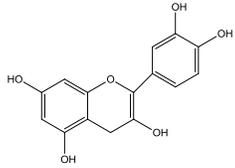
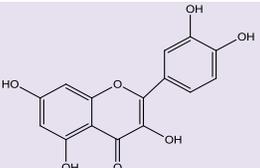
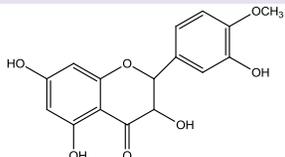
**Figura 18:** Gráfico de decaimiento de la absorbancia de PGR por efecto de los radicales peroxilo en presencia de extracto de espiga de chía y extracto de semilla.

A pesar de la optimización se observa en la Figura 18 que el ensayo ORAC-PGR presenta una baja reactividad que no puede ser cuantificada, ya sea para los extractos mostrados en la Figura 18, como para los extractos de las diferentes fracciones de la planta de *Salvia hispanica* L, a pesar de utilizar diferentes rangos de concentraciones de cada extracto. La explicación de este resultado fue descrito en el punto 5.2.

### 5.3. Determinación y cuantificación de polifenoles

Se determinó la presencia de cuatro polifenoles en los extractos de espiga de chíá, los cuales fueron: ácido protocatecuico, catequina, quercetina y hesperetina. Los tiempos de retención de los polifenoles estándar identificados se muestran en la Tabla 11:

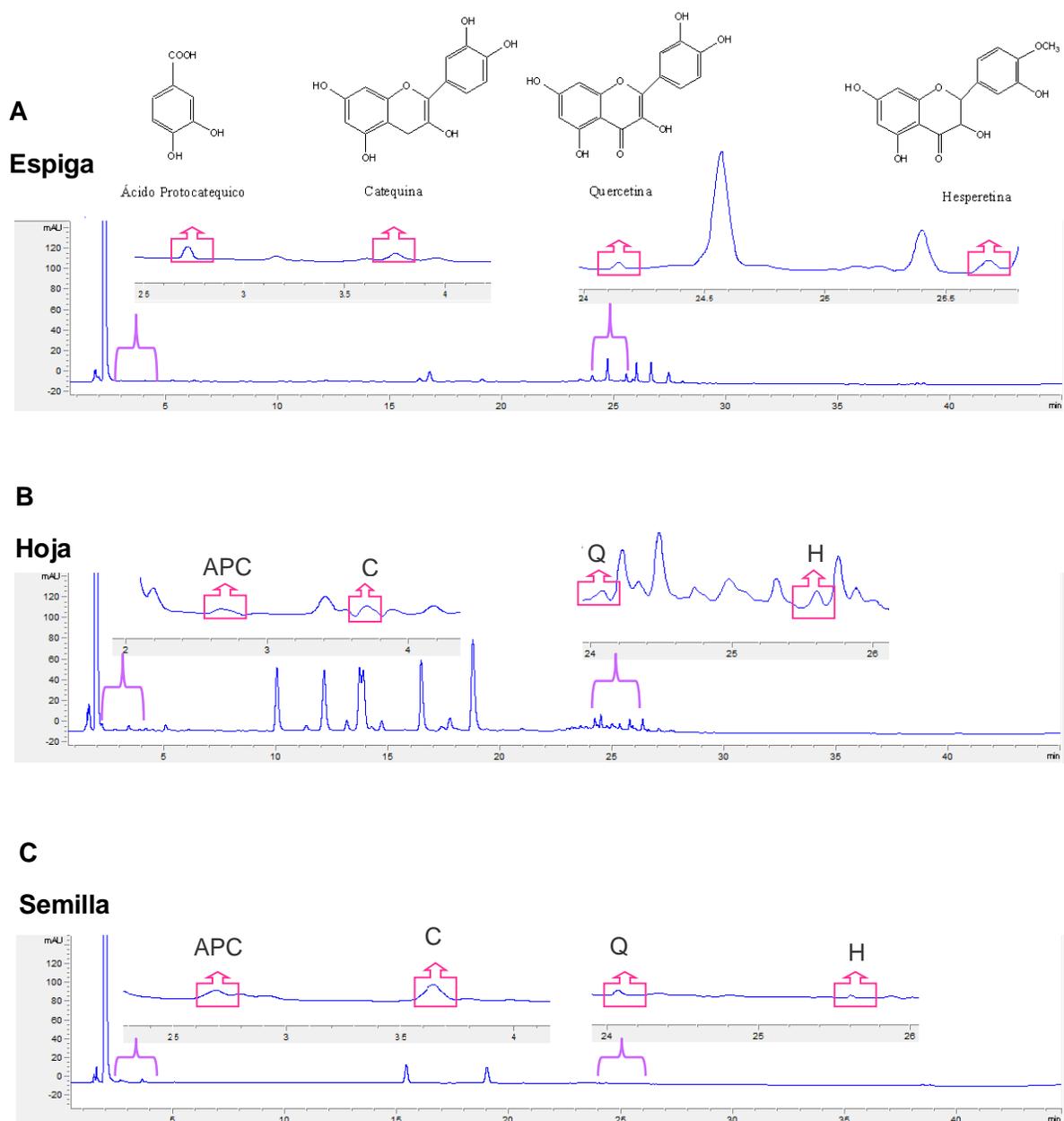
**Tabla 11: Tiempos de retención de los compuestos polifenólicos identificados en el extracto de espiga de chíá.**

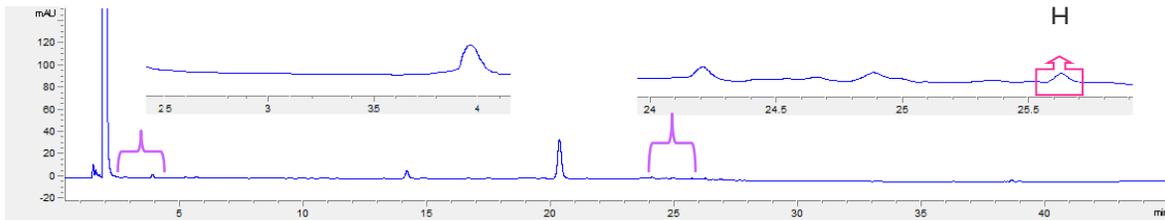
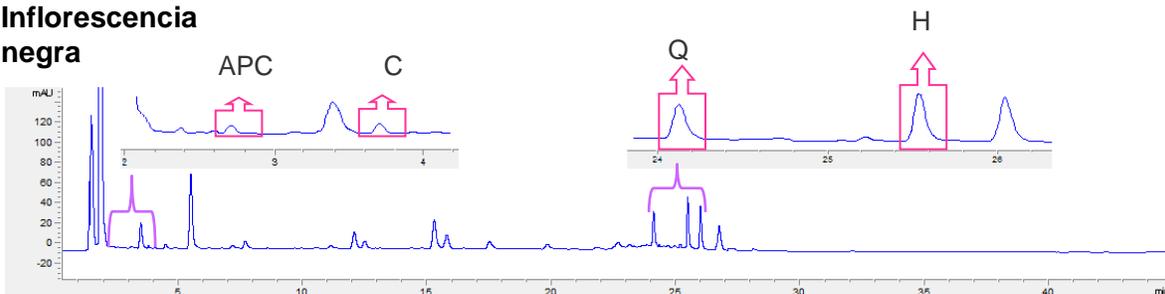
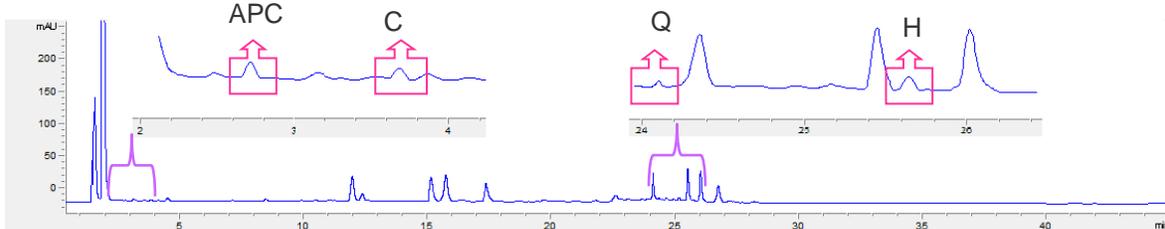
Polifenol	Tiempo de retención ( $t_R$ ) [min]	Estructuras
1) <b>Ácido Protocatecuico (APC)</b>	2,7	
2) <b>Catequina (C)</b>	3,7	
3) <b>Quercetina (Q)</b>	24,1	
4) <b>Hesperetina (H)</b>	25,6	

La presencia del flavonoide quercetina se ha descrito para la semilla <sup>[8]</sup>, pero dado que no se encuentra en la literatura una determinación del perfil polifenólico de la espiga de chíá su identificación no estaba comprobada. Los demás flavonoides y

el ácido hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, no han sido reportados para esta planta.

En la Figura 19 se muestran los cromatogramas de los extractos de planta de chíá obtenidos a 280 nm, cuyos picos no han sido descritos en la literatura.



**D****Tallo****E****Inflorescencia  
negra****F****Inflorescencia  
blanca**

**Figura 19: Cromatogramas de los compuestos polifenólicos en: espiga (A), hoja (B), semilla (C), tallo (D), espiga inflorescencia negra (E) y espiga inflorescencia blanca (F).**

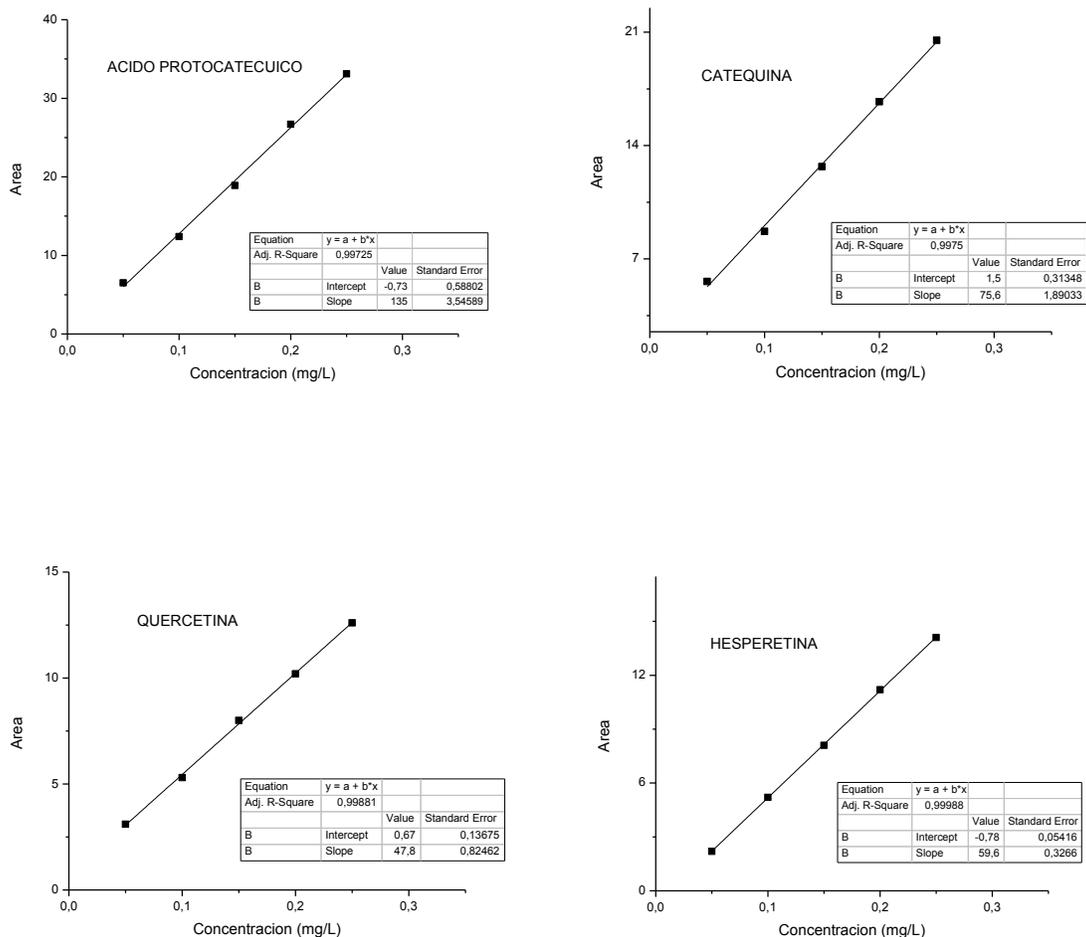
Se aprecia una notable relación entre los cromatogramas correspondientes a la espiga inflorescencia de los fenotipos negro y blanco (Figura 19 E y F, respectivamente). La variación de este perfil polifenólico está directamente relacionada con las diferentes partes de la planta. Se puede observar también, que el extracto de tallo solo posee la hesperetina como flavonoide identificado y se aprecian pocas señales de compuestos polifenólicos. Eso explicaría su baja capacidad antioxidante. Por otro lado, el extracto de hoja resulta ser el extracto

que presenta el mayor contenido de compuestos polifenólicos, lo que explicaría su mayor capacidad antioxidante.

La estructura de los compuestos polifenólicos se relaciona con la actividad antioxidante y se ha demostrado que el anillo B en la estructura de los flavonoides, es generalmente el sitio de mayor importancia para la transferencia de Hidrógeno [17]. La actividad aumenta cuando el anillo B posee un grupo catecol, como en el caso de la catequina y quercetina. Por otro lado, el doble enlace entre C-2 y C-3, combinada con el grupo 4-oxo en el anillo C, también potencia la actividad antioxidante, ya que permite la deslocalización de electrones  $\pi$  entre los anillos B y C, lo que contribuye a la estabilización de radicales, después de la donación del átomo de H. El grupo 3-OH también aumenta la capacidad antioxidante en combinación con el doble enlace entre C-2 y C-3, sin embargo, la eficacia de este grupo estaría relacionada con la presencia del grupo 4-carbonilo.

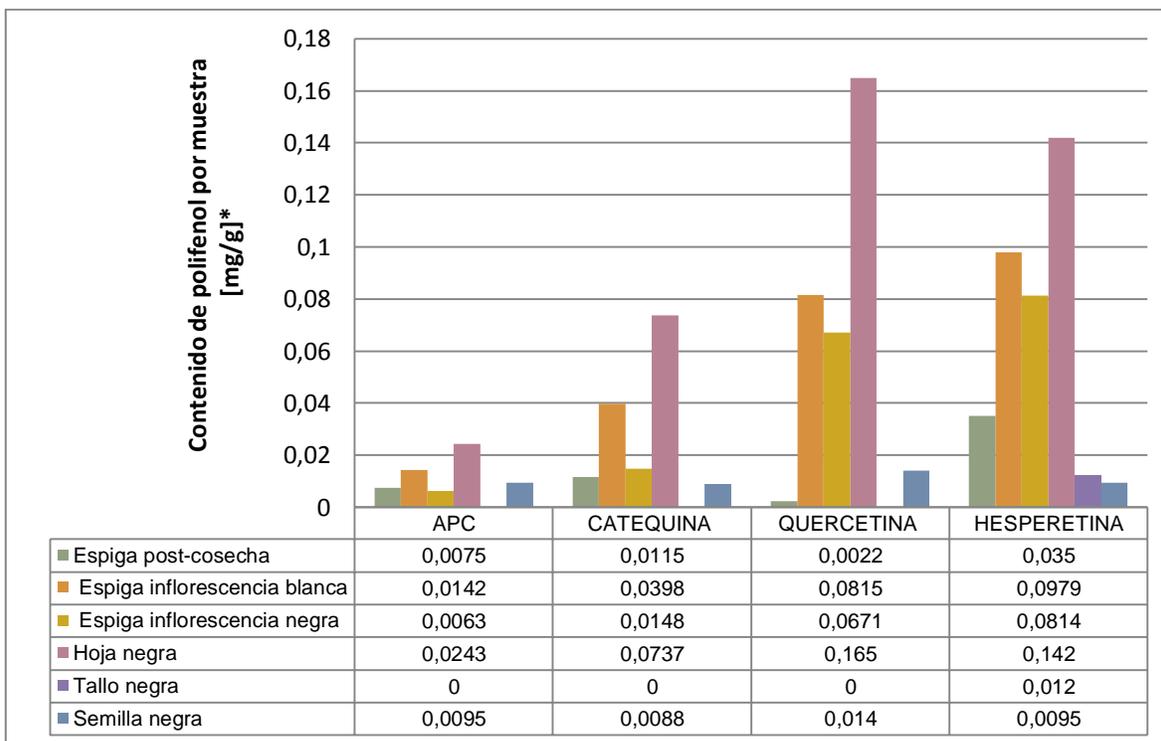
En el caso del ácido hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, la actividad antioxidante depende de la posición de los grupos hidroxilo en relación con el grupo COOH [16]. En general, para los ácidos fenólicos, la sustitución de grupos hidroxilos incrementa la actividad antioxidante, como es el caso del ácido gálico que es un compuesto trihidroxilado, el cual muestra alta capacidad antioxidante [16]. Cabe destacar que en este estudio se trabajó con el extracto de planta y al estar presentes antioxidantes y pro-oxidantes, pueden existir sinergias o disminuciones en la capacidad antioxidante.

Para la cuantificación los polifenoles identificados en el extracto de espiga de chíá, se obtuvieron curvas de calibración que presentaron una respuesta lineal en un rango de concentración entre 0,05-0,25 mgL<sup>-1</sup>, con un coeficiente de correlación lineal de 0,9972; 0,9975; 0,9988 y 0,9998 para los compuestos ácido protocatecuico, catequina, quercetina y hesperetina, respectivamente. Las curvas de calibración se muestran en la Figura 20. Los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) se muestran en Anexo, Tabla I.



**Figura 20: Curvas de calibración obtenidas por HPLC-DAD.**

En la Figura 21, se observa la variación del contenido de los polifenoles identificados en cada extracto de *Salvia hispanica* L. analizados. La Tabla IV del Anexo, detalla el área obtenida para cada polifenol en los extractos de planta de chíá.



**Figura 21: Contenido de polifenoles presentes en los diferentes extractos de planta de *Salvia hispanica* L.**

**\*Expresado en base seca.**

La Figura 21 muestra que la espiga de chíá post-cosecha contiene el compuesto hesperetina en mayor concentración, siendo 0,035 mg/gr de espiga.

En la literatura se encuentra que un gramo vaina del trigo sarraceno presenta 134 mg de APC <sup>[16]</sup>, por lo que el contenido en la espiga es 17866 veces menor que es presentado por este otro desecho agro-industrial. La catequina se presenta en la espiga de chíá en mayor cantidad que el compuesto APC, el cual es 1,5 veces mayor y la quercetina es el compuesto de menor presencia de los polifenoles identificados, siendo aproximadamente 16 veces menor que el contenido de hesperetina. La vaina del trigo sarraceno presenta 25 mg/gr de quercetina <sup>[16]</sup>, por lo que la espiga post-cosecha es inferior en contenido de quercetina que este desecho.

La espiga inflorescencia blanca es mayor en contenido de polifenoles identificados que la espiga inflorescencia negra. La semilla, por otro lado, presenta una baja presencia de los compuestos polifenolicos identificados, lo que se correlaciona con su baja capacidad antioxidante, al igual que el tallo, que de los compuestos identificados, sólo presenta hesperetina.

Por otro lado, la hoja es la parte de la planta que presenta mayor contenido de ácido procatecuico, catequina, quercetina y hesperetina. Su contenido de APC es 0,0243 mg/gr de hoja, por lo que éste polifenol es el compuesto de menor presencia en la hoja. Respecto al contenido de catequina presente en la hoja, se podría realizar una comparación con las hojas de té verde <sup>[34]</sup>; las cuales presentan una concentración en una de sus variedades de 231 mg de catequina por gramo de hoja, siendo 3134,3 veces mayor que la hoja de Salvia hispánica; esta comparación es sólo referencial, para así poder dimensionar las diferencias entre las hojas de este desecho agro-industrial y las hojas de una planta que es ampliamente conocida por su alto contenido de catequina y sus respectivos beneficios antioxidantes <sup>[34]</sup>. El flavonoide quercetina es el compuesto polifenólico identificado de mayor presencia en la hoja de la planta de chíá, teniendo 0,165 mg/gr de hoja. El contenido de hesperetina en la hoja de la planta fue 0,142 mg/gr. Cabe recordar que la hoja presenta la mayor capacidad antioxidante en los ensayos ORAC-FL y DPPH, por lo que se podría inferir que la cantidad de otros polifenoles presentes no identificados también es mayor en esta fracción de planta y por lo tanto, su máxima actividad es una acción sinérgica de todos ellos y no se atribuye en totalidad a los polifenoles identificados, es decir, existe una correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles en cada parte de la planta.

## 6. Conclusión

En general los objetivos propuestos en este trabajo de tesis se cumplieron satisfactoriamente. Se optimizó metodología analítica para extraer los antioxidantes presentes en la espiga de la planta de chíá, por medio de extracción asistida con ultrasonido. Las condiciones óptimas fueron: tiempo de extracción en ultrasonido 1,5 horas y tiempo de maceración 72 horas. Por otro lado, el uso del ultrasonido como método de extracción resultó ser el método que entrega una mayor capacidad antioxidante en las soluciones extracto, en comparación a ASE (extracción con solvente acelerado), y resulta ser mejor metodología verde.

Los ensayos para medir capacidad antioxidante ORAC-FL y DPPH, resultaron ser adecuados para medir los extractos de la espiga de la planta de chíá. No así el ensayo ORAC-PGR, del cual no se obtuvieron valores. El ensayo DPPH reveló que el  $IC_{50}$  (mg. necesarios para inhibir un 50% del radical DPPH<sup>\*</sup>) de la espiga de chíá es  $2,47 \pm 0,08$  mg. Mediante ensayo ORAC-FL se determinó que la espiga posee actividad antioxidante, cuyo índice ORAC- FL es  $0,04191 \pm 0,0003$ .

La cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (DAD), resultó ser una técnica adecuada para el análisis de los extractos de la espiga de la planta de chíá. Se identificaron y cuantificaron cuatro polifenoles en la espiga: ácido protocatecuico, catequina, quercetina y hesperetina cuyos contenidos en la espiga son 0,0075; 0,0115; 0,0022 y 0,035 mg/gr, respectivamente.

A modo de comparación se midieron otras partes de la planta, donde la hoja es la que presenta mayor CA en los ensayos DPPH y ORAC-FL y mayor concentración de polifenoles. Las espigas inflorescencia de fenotipos negro y blanco presentan diferencias no significativas para ambos ensayos. En el ensayo DPPH, el tallo presenta mayor CA que la espiga, siendo la semilla la que presenta la menor CA.

En el ensayo ORAC-FL, la espiga de chía post-cosecha presenta mayor CA que el tallo y la semilla.

Por lo tanto, se concluye que la planta de chía que hasta hoy es desechada luego de la cosecha de la semilla, presenta CA y compuestos polifenólicos, por lo que este producto natural inexplorado hasta ahora puede tener una futura aplicación en la industria alimentaria.

## 7. Referencias

1. M. Sandoval-Oliveros, O. Paredes-López. Isolation and Characterization of Proteins from Chia Seeds (*salvia hispanica* L.). *J. Agricultural and Food Chemistry*. 61 (2013). 193-201.
2. O. Martínez-Cruz, O. Paredes-López. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*. 1346 (2014). 43-48.
3. R. Ayerza, W. Coates. Chia: Redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas. 1<sup>a</sup> ed. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA. 2006.
4. V. Ixtaina, S. Nolasco, M. Tomás. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*. 28 (2008). 286–293.
5. Codex Florentino. 1579, historia general de las cosas de la Nueva España, Fray Bernardino de Sahagún. Libro II, traducido y editado por Charles E. Debbles y Arthur J.O. Anderson. Santa Fe. Nuevo México y Salt Lake City. Escuela de investigación Americana y la editorial de la universidad de Utah, 1963. [<http://www.arqueomex.com/S2N3nChias84.html>].
6. Códex Mendoza. 1542. Edición de Francisco del Paso y Troncoso, 1925. México D.F., México: Museo Nacional de Arqueología, Historia y Etnografía. [<https://polemologia.wordpress.com/2014/07/02/facsimilar-digital-del-codice-mendoza/>].

7. W. Coates, R. Ayerza, Production potencial of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*. 3 (1996). 229-233.
8. R. Silva, É. Aguilar, S. Alves, A. Teixeira, M. Nogueira, M. Maróstica, Chemical Characterization and antioxidant potencial of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.), *LWT-Food Science and Technology*, 59 (2014), 1304-1310.
9. S. Knak Jensen, Oxidative stress and free radicals, *J. of Molecular Structure (THEOCHEM)* 666-667 (2003), 387-392.
10. G. Smirnova, Z. Samoylova, N. Muzyka, O. Oktyabrsky, Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 46 (2009). 759-768.
11. J. Klauning, Z. Wang, X. Pu, S. Zhou, Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogénesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 254 (2011). 86-99.
12. M. Mitjavila, J. Moreno. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochemical Pharmacology*, 84 (2012). 1113-1122.
13. A. Moure, J. Cruz, D. Franco, J. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. J. Núñez, J. C. Parajó. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72 (2001). 145-171.

14. A. Hagerman, K. Riedl, G. Jones, K. Sovik, N. Ritchard, P. Hartzfeld, T. Riechel, High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46,1887-1892.
15. L. Bravo, Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*, 56 (1998). 317-333.
16. N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman. Polyphenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*. 99 (2006). 191-203.
17. P. Trouillas, P. Marsal, D. Siri, R. Lazzaroni, J. Duroux. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry*. 97 (2006). 679–688.
18. R. Rodrigo, M. Libuy, Chapter 5: Modulation of Plant Endogenous Antioxidant Systems by Polyphenols, *Polyphenols in Plants Isolation, Purification and Extract Preparation*, (2014). 65-85.
19. P. Porras, M. Jiménez, M. Sosa-Morales, M. E., Palou E. and López-Malo A. Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *International Journal of Food Science and Technology*. 49(2004). 571–577.
20. E. Reyes-Caudillo, A. Tecante, M. A. Valdivia- López, Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds presents in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, *Food Chemistry*. 107 (2008). 656-663.

21. S. K. Jeong, H. J. Park, B. D. Park, I. H. Kim. Effectiveness of topical chia seed oil on pruritus of end-stage renal disease (ESRD) patients and healthy volunteers. *Annals of Dermatology*. 22 (2010). 143–148.
22. I. Fernández, R. Ayerza, W. Coates, S. M. Vidueiros, N. Slobodianik, A.N. Pallaro. Nutritional characteristics of chia, *Actualización en Nutrición*. The University of Arizona, Tucson, Arizona, USA, (2006). 23-25.
23. S. M. Taga, E. E. Miller, D. E. Pratt. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61 (1984). 928–931.
24. M. Takashima, M. Horie, M. Shichiri, Y. Hagihara, Y. Yoshida, E. Niki. Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: A rational basis and practical application. *Free Radical Biology and Medicine* 52 (2012), 1242-1252.
25. H. J. Forman, K. J. A. Davies, F. Ursini, How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo, *Free Radical Biology and Medicine*. 66 (2014). 24-35.
26. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001). 4619-4626.
27. C. López-Alarcón, E. Lissi. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with Peroxyl Radicals. *Free Radical Research*. 40 (9) (2006). 979–985.

28. D. Villaño, M.S. Fernández-Pachón, M.L. Moyá, A.M. Troncoso, M.C. García-Parrilla. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, vol 71 (2007), 230–235.
29. A. Golmohamadi, G. Möller, J. Powers, C. Nindo. Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonic sonochemistry*. (2013).
30. F. Mena, A. Mena, J. Tréton. Polyphenols against Skin Aging. *Polyphenols in Human Health and Disease, Volume 1* (2014). 819-830.
31. X. Wu, L. Gu, J. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, G. Beecher, R. L. Prior. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Foods Composition and Analysis*. 17 (2004). 407-422.
32. X. Wu, J. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, G. Beecher, R. L. Prior., Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *J. Agric. Food Chem*, 52 (2004), 4026-4037.
33. A. Galuszka, P. Konieczka, Z. M. Migaszewski, J. Namiesnik. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*. 37 (2012). 61-72.
34. A. Zanwar, S. Badole, P. Shende, M. Hegde, S. Bodhankar. Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease. Chapter 2: Polyphenols in Human Health and Disease. (2014), 267-271.

## ANEXO

Tabla I: Límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y longitud de onda máxima de los polifenoles identificados.

Polifenol	LOD [mgL <sup>-1</sup> ]	LOQ [mgL <sup>-1</sup> ]	Longitud de onda máxima [nm]
APC	0,079	0,262	273
CATEQUINA	0,085	0,250	280
QUERCETINA	0,051	0,173	254
HESPERETINA	0,016	0,0547	290

Tabla II: Gradiente de elusión cromatográfica.

Tiempo	A %	B %	C%	D %	Flow	Presión
0	8	92	0	0	1	40
2	9	91	0	0	1	40
4	10,2	89,8	0	0	1	40
6	11,2	88,8	0	0	1	40
8	12,5	87,5	0	0	1	40
10	13,5	86,5	0	0	1	40
12	14,8	85,2	0	0	1	40
14	15,9	84,1	0	0	1	40
16	17	83	0	0	1	40
18	18,2	81,8	0	0	1	40
20	19,1	80,9	0	0	1	40
24	38	62	0	0	1	40
28	44	56	0	0	1	40
32	52,5	47,5	0	0	1	40
36	62	38	0	0	1	40
40	70	30	0	0	1	40
45	8	92	0	0	1	40

Tabla III: Determinación de la capacidad antioxidante mediante metodología ORAC-FL y DPPH de diferentes partes de la planta a 1,5 horas de ultrasonido- 72 horas de maceración.

Extracto de planta de chíá	DPPH IC <sub>50</sub> [mg]	Pendiente ORAC-FL	Índice ORAC-FL
<b>Espiga negra post-cosecha</b>	2,47 ± 0,08	45,8 ± 0,3	0,0419 ± 0,0003
<b>Espiga inflorescencia negra</b>	0,54 ± 0,01	131 ± 6	0,120 ± 0,006
<b>Espiga inflorescencia blanca</b>	0,58 ± 0,03	131 ± 7	0,120 ± 0,007
<b>Hoja negra</b>	0,28 ± 0,02	201,0 ± 0,2	0,1839 ± 0,0002
<b>Tallo negra</b>	2,18 ± 0,05	34,5 ± 0,4	0,0316 ± 0,0004
<b>Semilla negra</b>	3,97 ± 0,04	9,80 ± 0,05	0,00896 ± 0,00005

Tabla IV: Áreas de las concentraciones de polifenol en los diferentes extractos de *Salvia hispanica* L.

Área	Espiga post-cosecha	Espiga inflorescencia blanca	Espiga inflorescencia negra	Hoja negra	Tallo negra	Semilla negra
<b>APC</b>	3,3 ± 0,9	7,54 ± 0,07	2,8 ± 0,4	12,82 ± 0,05	N.D.	4,6 ± 0,3
<b>CATEQUINA</b>	4,99 ± 0,09	14,5 ± 0,6	6,14 ± 0,08	24,4 ± 0,4	N.D.	4,2 ± 0,6
<b>QUERCETINA</b>	1,1 ± 0,3	17,5 ± 0,7	13,9 ± 0,5	33,2 ± 0,1	N.D.	3,2 ± 0,3
<b>HESPERETIN A</b>	7,7 ± 0,6	24,4 ± 0,5	19,3 ± 0,8	34,1 ± 0,2	3,1 ± 0,8	1,6 ± 0,6

N.D.: No Detectado.

**Tabla V: Cálculos de puntos penalizados eco-escala analítica.**

<b>Eco-escala: 100- Total de puntos penalizados</b>	<b>Extracción ASE</b>		<b>Extracción Asistida con Ultrasonido</b>	
	<b>Dato</b>	<b>Puntaje</b>	<b>Dato</b>	<b>Puntaje</b>
<b>Acetona</b>	74,2 mL	8	8,75 mL	4
<b>Agua nanopura</b>	31,2 mL	0	3,7 mL	0
<b>Ácido acético</b>	0,5 mL	4	0,06 mL	4
<b>Energía kWh ≤ 1,5</b>	0,38 kWh	1	0,35 kWh	1
<b>Desecho &gt;10 mL</b>	106 mL	5	12,5 mL	5
<b>Riesgo laboral (evap.)</b>		3		3
<b>Calor aplicado</b>		2		0
<b>Puntaje penalizado total</b>		23		17
<b>Puntaje Eco-escala</b>		77		83

