

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



**“Optimización de la extracción de compuestos  
antioxidantes desde hojas de *Salvia hispanica* L de  
dos fenotipos distintos utilizando extracción por  
solvente acelerado en distintas etapas  
morfológicas.”**

**Tesis presentada para optar al grado de Magíster en Química y  
Memoria para optar al Título de Químico por:**

**VALENTINA FERNANDA OYARZO DÍAZ**

**Directora de Tesis: Dra. María Carolina Zúñiga.**

**Santiago, Chile**

**Julio 2023**

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

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

**VALENTINA FERNANDA OYARZO DÍAZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química y Título de Químico.

**Directora de Tesis:**

**Dra. María Carolina Zúñiga.**

Facultad Cs. Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile.

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Edwar Fuentes. (presidente)**

Facultad Cs. Química y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

---

**Dr. Alexis Aspée.**

Facultad de Química y Biología  
Universidad de Santiago de Chile

---

**Dr. Mario Simirgiotis.**

Facultad de Ciencias  
Universidad Austral de Chile

---

## **Agradecimientos**

Cerrando este ciclo de mi vida, le agradezco a la persona más importante, mi mamá. Gracias por todo el apoyo y amor que me has brindado, por siempre creer en mi y alentarme en todas las decisiones de mi vida, este logro es de ambas, te amo muchísimo.

Gracias a mi familia, mi pololo Gonzalo, mis hermanos Natalia y Rodrigo, mis sobrinos Vicente y Florencia, y a mi perrita Sayén, por ser el pilar fundamental de mi vida y siempre estar cuando los necesito, los amo.

Gracias a la profesora Maria Carolina Zuñiga López, por recibirme en su laboratorio, por enseñarme, guiarme, y formarme siempre para ser una mejor profesional, por dedicar su tiempo y conocimiento.

Gracias a la mejor compañera de laboratorio, Gabriela Maturana, por ser una persona fundamental en todo mi proceso de tesis, gracias por siempre estar dispuesta a enseñarme hasta que aprendiera, por escucharme cuando estaba cansada, por alentarme y creer en mí.

Gracias a mis amigos de la universidad, por las risas, los llantos, el estudio, los carretes, y la amistad.

Y finalmente dedicarle este título a mi abuelo, que donde sea que esté, sé que está feliz y orgulloso de mi.

## Abreviaturas

%APA: Porcentaje de apagamiento

AAPH: 2,2'-Azobis-(2-aminodinopropano)

ABC: Área bajo la curva

Ác. Caf.: Ácido cafeico

ANOVA: Test estadístico de análisis de varianza

ASE: Extracción con solvente acelerado (siglas en inglés)

AWA: Extractante Acetona/Agua/Ácido acético

CA: Capacidad antioxidante

CAC: Contenido de ácido cafeico

CAT: Catalasa

Cl: Ionización química

CFT: Contenido fenólico total

col.: Colaboradores

DAD: Detector de arreglo de diodos

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG: Equivalente de ácido gálico

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ET: Equivalente de Trolox

F: Fluorescencia en tiempo t

F<sub>0</sub>: Fluorescencia inicial

FC: Ensayo de Folin-Ciocalteu

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (siglas en inglés)

FLD: Detector de fluorescencia

GP: Glutación peroxidasa

HAT: Mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IC<sub>50</sub>: Concentración necesaria para apagar un 50% del radical libre

MAE: Extracción asistida por microondas (siglas en inglés)

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

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

SFE: Extracción por fluidos supercríticos.

SOD: Superóxido dismutasa

TROLOX: Ácido- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

tr: Tiempo de retención

RL: Radical libre

UAE: extracción asistida por ultrasonido (siglas en inglés)

## Tabla de contenido

1	Introducción.....	15
1.1	Antecedentes <i>Salvia hispanica</i> L.....	15
1.2	Capacidad antioxidante y estrés oxidativo.....	18
1.2.1	Radicales libres y estrés oxidativo.....	18
1.2.2	Capacidad antioxidante.....	19
1.3	Compuestos fenólicos.....	19
1.4	Extracción de polifenoles desde plantas.....	22
1.5	Metodologías para evaluar la capacidad antioxidante in vitro.....	24
1.5.1	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	24
1.5.2	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH.....	25
1.6	Cuantificación e identificación de polifenoles.....	26
1.6.1	Contenido fenólico total.....	26
1.7	Métodos cromatográficos.....	27
2	Planteamiento del problema.....	29
3	Hipótesis.....	29
4	Objetivos.....	30
4.1	Objetivo general.....	30
4.2	Objetivos específicos.....	30
5	Materiales y métodos.....	30
5.1	Reactivos.....	30
5.2	Tratamiento de las muestras.....	31
5.3	Extracción.....	32
5.3.1	Análisis previos a la optimización.....	32

5.3.2	Optimización de la extracción con solvente acelerado .....	33
5.3.3	Extracción por ultrasonido. ....	35
5.3.4	Extracción con cruce de solventes. ....	36
5.4	Determinación de la capacidad antioxidante. ....	36
5.4.1	ORAC-FL.....	36
5.4.2	ORAC-PGR .....	37
5.4.3	Ensayo DPPH.....	38
5.5	Cuantificación e identificación de polifenoles. ....	38
5.5.1	Determinación del contenido fenólico total .....	38
5.5.2	Determinación del perfil fenólico mediante HPLC-FLD-DAD .....	39
5.6	Análisis estadístico .....	41
6	Resultados y discusión .....	42
6.1	Optimización de la extracción de compuestos antioxidantes con el modelo multivariable $3^3 + 3$ centros, por medio de ORAC-FL.....	42
6.1.1	Determinación de la cantidad de ciclos previo a la optimización. ....	42
6.1.2	Optimización de la extracción con solvente acelerado (ASE).....	44
6.2	Determinación de la capacidad antioxidante mediante ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH de dos fenotipos de <i>Salvia hispánica</i> L, en tres etapas de crecimiento de la planta. ....	52
6.2.1	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC-FL. ....	52
6.2.2	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC-PGR.....	55
6.2.3	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH .....	56

6.3	Determinación del contenido fenólico total mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu de dos fenotipos de <i>Salvia hispanica</i> L. en tres etapas de crecimiento de la planta. ....	58
6.4	Caracterización del perfil fenólico por HPLC-DAD de extractos de <i>Salvia hispanica</i> L. de dos fenotipos de semillas, en tres etapas de crecimiento de la planta. ....	60
6.4.1	Cuantificación de ácido cafeico .....	61
6.4.2	Cuantificación de ácido rosmarinico .....	63
6.5	Comparación de la extracción asistida con ultrasonido previamente optimizada, con la extracción con solvente acelerado optimizada.....	65
6.5.1	Ensayo ORAC- FL.....	65
6.5.2	Ensayo ORAC-PGR. ....	67
6.5.3	Ensayo DPPH.....	69
6.5.4	Ensayo Folin-Ciocalteu.....	71
6.5.5	Caracterización del perfil fenólico por HPLC-DAD.....	73
6.6	Comparación entre la extracción ASE con solvente AWA y la extracción asistida por ultrasonido con solvente 55%:45% H <sub>2</sub> O:ETOH. ....	77
6.6.1	Determinación de la capacidad antioxidante por los ensayos ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH.....	77
6.6.2	Cuantificación e identificación de polifenoles. ....	79
7	Conclusiones .....	83
8	Bibliografía.....	84
9	Anexos.....	91

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Total de experimentos a realizar, con los valores codificados y decodificados. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Detalle de los doce estándares de polifenoles utilizados para la identificación y cuantificación del perfil fenólico de los extractos de hoja de chía. Se incluyen los tiempos de retención, las longitudes de onda de máxima absorbancia ( $\lambda_m$ ) de cada compuesto además de las longitudes de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) en los casos correspondientes. ....	40
<b>Tabla 3.</b> Test HSD Tukey, 95% confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. ....	43
<b>Tabla 4.</b> Resultados de ORAC-FL de los 5 primeros ciclos de cada extracción, utilizando como solvente H <sub>2</sub> O, ETOH, 1:1 (v/v) H <sub>2</sub> O:ETOH. ....	43
<b>Tabla 5.</b> Resultados de los 30 experimentos del modelo multifactorial con los factores decodificados, expresados por ORAC-FL [mg ET/ 1g h.s]. ....	45
<b>Tabla 6.</b> Resultados multivariantes para evaluar la calidad del modelo. ....	46
<b>Tabla 7.</b> Valores óptimos de los factores codificados. ....	49
<b>Tabla 8.</b> Valores del ensayo ORAC-FL de las 6 muestras analizadas. ....	53
<b>Tabla 9.</b> Valores del ensayo ORAC-PGR de las 6 muestras analizadas. ....	55
<b>Tabla 10.</b> Valores del ensayo DPPH de las 6 muestras analizadas. ....	57
<b>Tabla 11.</b> Valores del ensayo Folin-Ciocalteu de las 6 muestras analizadas. ....	58
<b>Tabla 12.</b> Correlación entre los ensayos ORAC-FL, ORAC-PGR, DPPH y Folin-Ciocalteu. ....	59
<b>Tabla 13.</b> Valores de la cuantificación de ácido Cafeico por HPLC-DAD. ....	63
<b>Tabla 14.</b> Valores de la cuantificación de ácido Rosmarínico por HPLC-DAD. ....	64
<b>Tabla 15.</b> Valores del ensayo ORAC-FL de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	66
<b>Tabla 16.</b> Valores del ensayo ORAC-PGR de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	68
<b>Tabla 17.</b> Valores del ensayo DPPH de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	70

<b>Tabla 18.</b> Valores del ensayo Folin-Ciocalteu de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	72
<b>Tabla 19.</b> Valores de la concentración de ácido cafeico de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	74
<b>Tabla 20.</b> Valores de la concentración de ácido rosmarínico de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	75

## Índice de figuras

<b>Fig 1.</b> Cultivo de chía en la estación experimental Pan de Azúcar INIA Intihuasi. ...	15
<b>Fig 2.</b> Subclasificación de los flavonoides.....	21
<b>Fig 3.</b> Subclasificación de los no flavonoides.....	22
<b>Fig 4.</b> Curvas de decaimiento de los análisis ORAC-FL (a) y ORAC-PGR (b) .....	25
<b>Fig 5.</b> Mecanismo de reacción del antioxidante con el DPPH. ....	26
<b>Fig 6.</b> Reducción del compuesto Folin. ....	27
<b>Fig 7.</b> Diseño experimental del cultivo de chía realizado para el desarrollo de este trabajo. ....	31
<b>Fig 8.</b> Esquema del equipo ASE. ....	35
<b>Fig 9.</b> Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL en función del número de ciclos de la extracción con solvente acelerado utilizando como solvente 1:1 (v/v) H <sub>2</sub> O: ETOH. ....	42
<b>Fig 10.</b> Diagrama de pareto estandarizado para ORAC-FL.....	47
<b>Fig 11.</b> Gráfico de efectos principales para el ensayo ORAC-FL.....	47
<b>Fig 12.</b> Superficie de respuesta estimada, con el factor temperatura constante. ....	49
<b>Fig 13.</b> Superficie de respuesta estimada, con el factor tiempo constante. ....	50
<b>Fig 14.</b> Superficie de respuesta estimada, con el factor composición de solvente constante.....	50
<b>Fig 15.</b> Gráfico de resultados ORAC-FL de las 6 muestras analizadas.....	53
<b>Fig 16.</b> Gráfico de resultados ORAC-PGR de las 6 muestras analizadas.....	55
<b>Fig 17.</b> Gráfico de resultados del ensayo DPPH de las 6 muestras analizadas. ....	56
<b>Fig 18.</b> Gráfico de resultados del ensayo Folin.Ciocalteu de las 6 muestras analizadas.....	58
<b>Fig 19.</b> Cromatograma del tercer muestreo de ambos fenotipos. ....	60
<b>Fig 20.</b> Pico cromatográfico de ácido cafeico.....	62
<b>Fig 21.</b> Gráfico de resultados de la cuantificación de ác. Cafeico por HPLC-DAD..	62
<b>Fig 22.</b> Pico cromatográfico de ácido rosmarínico. ....	63
<b>Fig 23.</b> Gráfico de resultados de la cuantificación de ác. Rosmarínico por HPLC-DAD.....	64

<b>Fig 24.</b> Gráfico de resultados ORAC-FL de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.....	66
<b>Fig 25.</b> Gráfico de resultados ORAC-PGR de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.....	68
<b>Fig 26.</b> Gráfico de resultados del ensayo DPPH de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.....	70
<b>Fig 27.</b> Gráfico de resultados del ensayo Folin-Ciocalteu de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	72
<b>Fig 28.</b> Gráfico de resultados de la concentración de ác cafeico de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	73
<b>Fig 29.</b> Gráfico de resultados de la concentración de ác. rosmarínico de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido. ....	75
<b>Fig 30.</b> Gráfico de resultados de los ensayos ORAC-FL (A), ORAC-PGR (B), y % apagamiento DPPH (C), para la Comparación entre la extracción ASE con solvente AWA y la extracción asistida por ultrasonido con solvente 55%:45% H <sub>2</sub> O:ETOH. .	77
<b>Fig 31.</b> Resultados de la cuantificación por HPLC-DAD de ácido rosmarínico (a), ácido cafeico (B), y determinación de polifenoles totales por el ensayo Folin-Ciocalteu (C), para la comparación entre la extracción ASE con solvente AWA y la extracción asistida por ultrasonido con solvente 55%:45% H <sub>2</sub> O:ETOH. ....	80

## Resumen

Originaria de México y Guatemala, la *Salvia hispanica* L, comúnmente conocida como chía, perteneciente a la familia de las Lamiaceae, es una planta herbácea que posee compuestos bioactivos beneficiosos para la salud humana. En las últimas décadas, los estudios científicos se han centrado en su semilla, la que contiene omega-3, proteínas, fibra dietética, vitaminas, minerales y una amplia gama de compuestos fenólicos. Estos últimos también están presentes en las hojas, las que se descartan después de la cosecha de la semilla. Los compuestos fenólicos poseen actividades biológicas como antibacteriana, anticancerígena, antiinflamatoria, antioxidante, entre otros, lo que convierte a la hoja de chía en una fuente importante de estos compuestos, lo que representa una alternativa de revalorización de este órgano de la planta de chía. Sin embargo, existen muy pocos estudios científicos de órganos como las hojas.

La mayor desventaja de las metodologías de extracción convencionales es el tiempo elevado de extracción, así como el tipo de solvente utilizado. Para mejorar esto, se han desarrollado nuevas tecnologías implementando solventes más verdes y buscando disminuir el volumen y toxicidad de los solventes de extracciones tradicionales (hexano y diclorometano) como lo son el H<sub>2</sub>O y el etanol entre otros, considerados solventes con seguridad alimenticia.

Para asegurar una mejor eficiencia de extracción, en este proyecto se realizó una optimización de la extracción de compuestos antioxidantes a partir de hojas de chía mediante modelos quimiométricos, utilizando la extracción con solvente acelerado (ASE), evaluando 3 variables: composición de solvente (H<sub>2</sub>O, etanol, 50%-50% H<sub>2</sub>O:etanol), tiempo estático de extracción (3, 10 y 17 minutos) y temperatura de extracción (45, 80 y 115°C). Por medio del modelo  $3^3 + 3$  centros se buscó generar una superficie de respuesta que maximice la capacidad antioxidante determinada mediante ORAC-FL. Luego se aplicó el procedimiento de extracción optimizado en el análisis de muestras de hoja de chía de dos fenotipos de semillas diferentes (blanca y negra) en 3 etapas distintas del desarrollo de la planta, evaluando su capacidad antioxidante mediante ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH, su contenido de

polifenoles totales por Folin Ciocalteu, y la caracterización de los polifenoles presentes en las muestras mediante HPLC-DAD. Posteriormente se realizó la comparación con la extracción asistida con ultrasonido previamente optimizada.

Las condiciones óptimas para la extracción con solvente acelerado fueron: 3 ciclos de extracción de 17 min cada uno a 115°C con una composición de 55% H<sub>2</sub>O y 45% ETOH a una presión constante de 1500 psi. Para los dos fenotipos de hoja de chía que se analizaron en diferentes etapas de desarrollo, se obtuvo en la mayoría de los análisis la misma tendencia, siendo la segunda fecha de muestreo donde se obtuvieron más compuestos con capacidad antioxidante, mayor cantidad de polifenoles, y una mayor concentración de compuestos como el ácido cafeico y el ácido rosmarinico.

Finalmente, al comparar los resultados obtenidos en esta tesis, con la extracción por ultrasonido optimizada en estudios anteriores, la extracción ASE demostró ser más eficiente, obteniendo resultados significativamente mayores en todos los análisis.

## Summary

Originally from Mexico and Guatemala, *Salvia hispanica* L, commonly known as chia, belonging to the Lamiaceae family, is a herbaceous plant that has bioactive compounds that are beneficial to human health. In recent decades, scientific studies have focused on its seed, which contains omega-3, protein, dietary fiber, vitamins, minerals, and a wide range of phenolic compounds. The latter are also present in the leaves, which are discarded after the seed is harvested. Phenolic compounds have biological activities such as antibacterial, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, among others, which makes the chia leaf an important source of these compounds, which represents an alternative to revalue this organ of the chia plant. However, there are very few scientific studies of organs such as leaves.

The biggest disadvantage of conventional extraction methodologies is the long extraction time, as well as the type of solvent used. To improve this, new technologies have been developed implementing greener solvents and seeking to reduce the volume and toxicity of traditional extraction solvents (hexane and dichloromethane) such as H<sub>2</sub>O and ethanol, among others, considered food-safe solvents.

To ensure better extraction efficiency, in this project an optimization of the extraction of antioxidant compounds from chia leaves was carried out by means of chemometric models, using accelerated solvent extraction (ASE), evaluating 3 variables: solvent composition (H<sub>2</sub>O, ethanol, 50%-50% H<sub>2</sub>O:ethanol), static extraction time (3, 10 and 17 minutes) and extraction temperature (45, 80 and 115°C). Through the model 3<sup>3</sup> + 3 centers, we sought to generate a response surface that maximizes the antioxidant capacity determined by ORAC-FL. Then the optimized extraction procedure was applied in the analysis of chia leaf samples from two different seed phenotypes (white and black) in 3 different stages of plant development, evaluating their antioxidant capacity using ORAC-FL, ORAC-PGR and DPPH, its total polyphenol content by Folin Ciocalteu, and the characterization of the polyphenols present in the samples by HPLC-DAD. Subsequently, comparison was made with previously optimized ultrasound-assisted extraction.

The optimal conditions for accelerated solvent extraction were: 3 extraction cycles of 17 min each at 115°C with a composition of 55% H<sub>2</sub>O and 45% ETOH at a constant pressure of 1500 psi. For the two chia leaf phenotypes that were analyzed at different stages of development, the same trend was obtained in most of the analyses, with the second sampling date where more compounds with antioxidant capacity were obtained, a greater amount of polyphenols, and a higher concentration of compounds such as caffeic acid and rosmarinic acid.

Finally, when comparing the results obtained in this thesis, with the ultrasound extraction optimized in previous studies, the ASE extraction proved to be more efficient, obtaining significantly higher results in all the analyses.

## 1. Introducción.

### 1.1 Antecedentes *Salvia hispanica* L.

La *Salvia hispanica* L, mostrada en la figura 1, conocida comúnmente como chía, es una planta anual perteneciente a la familia Lamiaceae. Es una especie nativa del sur de México y norte de Guatemala (Andrés Xingu López, 2017), esta planta crece aproximadamente de 1 a 2.5 metros de altura, y presenta una raíz que puede alcanzar hasta un metro de profundidad, el tallo es generalmente de color verde, ramificado, aromático, cuadrangular y pubescente. Las hojas crecen de manera opuesta, de forma oval-elípticas, de 1 a 5 cm de ancho, y de 5 a 15 cm de longitud, son de base cuneada, y ápice agudo, el peciolo de las hojas es de 1 a 4 cm, en la parte superior de la planta y de 4 a 8 cm en las ramificaciones inferiores. La flor es hermafrodita, pudiendo ser de color violeta, azul, morada, blanca y blanquiazul, las cuales crecen en grupos en espigas. La semilla es monoespermica, ovoide y alcanzan 2.3 mm de longitud, 1.2 mm de diámetro y en promedio 1.2 mg de peso (Di Sapia, Bueno, Busilacchi, & Quiroga, 2012).



**Fig 1.** Cultivo de chía en la estación experimental Pan de Azúcar INIA Intihuasi.

Esta planta se ha utilizado desde hace varios siglos, se conoce que los Teotihuacanos (100 AC-600 DC) fueron posiblemente de las primeras culturas civilizadas de América que utilizaron la chía, donde en un estudio arqueológico se encontró que las semillas de esta planta formaron parte de las ofrendas dedicadas a

sus deidades y muertos (Cahill, 2004). Sin embargo, en la Mesoamérica precolombina fue cuando la chía comenzó a ser utilizada como un producto de gran importancia en el ámbito alimenticio y medicinal. Su semilla se utilizaba como alimento energizante, además de extraer de ella aceites para consumo humano y producción de pinturas. A pesar de ello, con la llegada de los españoles el cultivo de chía disminuyó considerablemente, debido a la restricción religiosa de su cultivo y la incorporación de nuevos productos de origen animal y vegetal (trigo, cebada, la caña, cártamo, ganado vacuno y ovino) en áreas cultivadas con chía, produciendo un cambio en la alimentación de la población de la zona (Cahill, 2004).

Actualmente se ha vuelto a impulsar el cultivo de chía debido a la información florklórica, a la búsqueda y el interés de la población mundial en alimentos funcionales, donde la semilla de chía se destaca por poseer una alta cantidad de fibra, aminoácidos, polifenoles y por sobre todo ácido graso  $\alpha$ -linolénico (omega-3) (da Silva Marineli, 2014; Reyes Caudillo, 2008). A partir de este conocimiento es que la chía comenzó a generar más curiosidad científica, principalmente debido al gran contenido de omega 3 de su semilla, concentrando el interés científico, dejando de lado hojas, tallos y espigas, por no tener valor nutricional comprobado hasta la fecha. La planta de chía genera una gran cantidad de biomasa (tallos, hojas, raíces, inflorescencia) durante su ciclo natural, debido a que la semilla se forma en la etapa final de este ciclo, por lo tanto, hay que esperar el desarrollo total de la planta. Silva & col (2018) realizaron un cultivo experimental de 122 días a contar del día de la siembra, y se lograron encontrar 32 g de masa seca total por planta, si este valor corresponde al 10% de la materia verde, con una densidad de plantación de 50.000 plantas por hectárea, se podría disponer de 3 ton de materia verde por hectárea. Si de esto, el 5% corresponde a hoja, se producirían 500 Kg de hoja verde por hectárea al año (Silva & col, 2018).

Amato & col (2015) en su trabajo orientado a determinar la calidad nutricional de la semilla, además de estudiar la semilla, ellos identificaron tentativamente 34 polifenoles a partir de extractos metanólicos de hojas de chía, mediante HPLC-MS.

Dentro de los polifenoles identificados se encuentran el ácido rosmarinico, ácido cafeico, orientina, vitexina, apigenina y quercetina, entre otros. (Amato, y otros, 2015). Por su parte, Elshafie y col (2018) informaron que el aceite proveniente de las hojas de chía, posee como principales constituyentes sesquiterpenos con una mayoría de cariofilenos, enfatizando en su efecto antimicrobiano. Por otro lado Kiani & col (2020) realizaron por primera vez una síntesis verde de nanopartículas de paladio por medio de extractos de hojas de *Salvia hispánica* L, utilizándola como un compuesto reductor ecológico, responsable de reducir el metal, formar la nanopartícula y evitar el crecimiento de esta, además de enfatizar su fuerte actividad antibacteriana.

Estos estudios, entregan las primeras luces del potencial uso de las hojas de chía, siendo importante estudiar con mayor profundidad esta matriz, para así dar valor comercial a esta materia prima que se trata como desecho o como fertilizante de suelo.

En trabajos anteriores del grupo del laboratorio de radicales libres y antioxidantes, guiados por la Dra. María Carolina Zúñiga se ha estudiado la capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles de hojas, tallos y espigas de chía mediante las técnicas ORAC-FL (Capacidad de absorción de radicales oxígeno, utilizando fluoresceína como sonda), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y Folin-Ciocalteu respectivamente, además de lograr la identificación y cuantificación de algunos polifenoles. En un primer estudio, Soto y col (2015) lograron determinar que la hoja es la que presenta mayor capacidad antioxidante y una mayor concentración de polifenoles frente a otros órganos de la planta (Soto, 2015). Posteriormente, también se ha estudiado la capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles de 6 fenotipos de chía cultivados en invernadero, sometidos a dos niveles de riego (20% y 70%), en diferentes etapas de desarrollo de la planta. Este estudio informa que el muestreo realizado a la mitad del crecimiento de la planta presentaba mayor capacidad antioxidante, y mayor concentración de polifenoles. Adicionalmente, las plantas con un 20% de riego (con estrés hídrico) mostraron un comportamiento

general entre los fenotipos con un máximo de capacidad antioxidante en el muestreo de la mitad del desarrollo de la planta, mientras que para el nivel superior de riego (70% de riego) no se observó un patrón común de comportamiento. (Maturana, 2019) Finalmente, se estudió la capacidad antioxidante y contenido fenólico total de dos extractos de hojas provenientes de fenotipos de semilla de chía (blanca y negra), en extractos secuenciales realizados con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol), encontrando que los extractos etanólicos obtuvieron la mayor capacidad antioxidante (química y celular) y contenido total de polifenoles (Zuñiga-Lopez, 2021).

## **1.2 Capacidad antioxidante y estrés oxidativo.**

### **1.2.1 Radicales libres y estrés oxidativo.**

Los radicales libres (RL) son compuestos que poseen una estructura que contiene uno o más electrones desapareados, característica que les brinda una gran reactividad. Estos se generan en nuestro organismo como subproducto de la respiración celular, dentro de las que se encuentran el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Boveris & Repetto, 2016), Estas especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden presentar actividad biológica, como es el caso del radical superóxido que es generado en células fagocíticas para ejercer acción antibacteriana (Mora, 2002). Otro radical de importancia biológica que se produce en condiciones normales dentro del organismo humano es el óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) que es un importante neurotransmisor (Mora, 2002). Este último RL se incluye dentro de las especies reactivas de nitrógeno (ERN), junto con  $NO_2$  y otros radicales orgánicos centrados en nitrógeno.

De manera natural, existe un balance entre los RL y los mecanismos antioxidantes que la célula posee (antioxidantes endógenos) entre los que se encuentran enzimas como la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GP), y la superóxido dismutasa (SOD), además de moléculas pequeñas como compuestos fenólicos, vitaminas y algunas hormonas (Boveris, 2016). Al romperse este equilibrio por factores externos como alimentación, radiación solar o alguna enfermedad, es que la célula entra en

un estado llamado estrés oxidativo. El estrés oxidativo, es originado por un aumento en la producción de RL o por una disminución en los antioxidantes endógenos, se caracteriza por la incapacidad de los antioxidantes endógenos para contrarrestar el daño oxidativo en nuestras células (López, 2007). Este estado de estrés puede desencadenar enfermedades crónicas como el cáncer, parkinson, enfermedades cardiovasculares, incluso Alzheimer. (Halliwell, 1998).

### **1.2.2 Capacidad antioxidante.**

Una manera de combatir el estrés celular es consumiendo compuestos que tengan capacidad antioxidante, la que se define como la capacidad de apagar o neutralizar un RL, o como la de inhibir la oxidación de otros sustratos (Prior, 2005). Esto puede ocurrir mediante dos mecanismos principales: el primero de transferencia de electrones (ET por sus siglas en inglés) y el segundo, la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT por sus siglas en inglés). En el mecanismo ET, el antioxidante puede donar un electrón al radical, y en el mecanismo HAT, el antioxidante apaga un radical por donación de átomos de hidrógeno, generando un radical libre más estable químicamente en ambos casos. (Huang, Ou, & Prior, 2005).

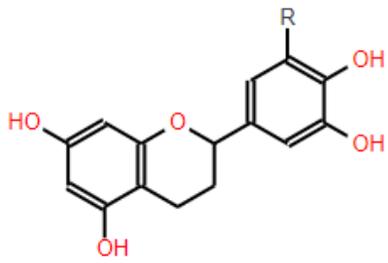
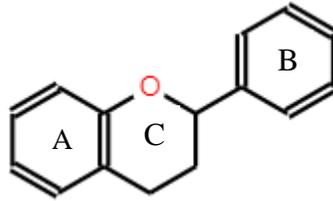
Estas moléculas clasificadas como antioxidantes deben cumplir tres criterios fundamentales; el primero es que sea capaz de prevenir o retardar la oxidación de otros sustratos a concentraciones bajas en relación a la concentración del sustrato, el segundo, que el radical formado luego de la reacción, debe ser más estable y menos reactivo que el RL inicial (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996; Antolovich, y otros, 2002), y tercero, ser persistente en el medio.

### **1.3 Compuestos fenólicos.**

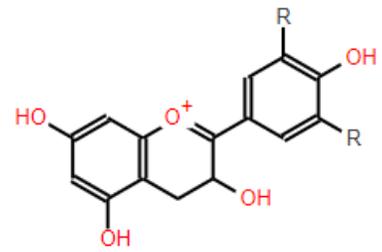
La capacidad antioxidante se le atribuye principalmente a los compuestos fenólicos, estos compuestos contienen al menos un grupo fenol en su estructura, y son sintetizados por las plantas, como producto de su metabolismo secundario. Son indispensables en funciones fisiológicas vegetales como en la defensa ante situaciones de estrés y diversos estímulos (hídricos, luminosos, etc) (Quiñones, 2012). La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario

de las plantas involucra dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Bravo, 1998). Las propiedades benéficas de los polifenoles están asociadas a su estructura química, que es capaz de interactuar con las ERO y ERN, que son los RL más dañinos en sistemas biológicos.

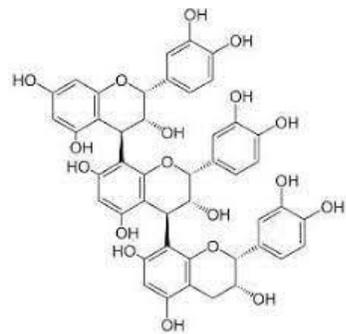
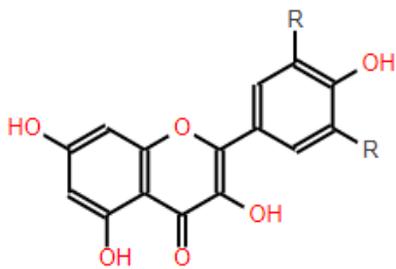
Los polifenoles se clasifican en dos grandes grupos, el primero son los flavonoides, donde se encuentran todos los compuestos que tienen como estructura base dos anillos bencénicos unidos por un puente de tres carbonos (C6-C3-C6) como por ejemplo los flavanos, antocianinas, flavonas y taninos condensables, entre otros, tal como se muestra en la figura 2. Muchos estudios han llegado a establecer algunas relaciones estructura-actividad antioxidante para este grupo de polifenoles en medio acuoso (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996; Procházková, Boušová, & Wilhelmová, 2011; Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002), siendo de mayor influencia la presencia de un grupo catecol (orto dihidroxi) en el anillo B, la insaturación 2,3 del anillo C, conjugado con la función 4-oxo y la sustitución de las posiciones 3 y 5 con grupos hidroxilo (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996; Procházková, Boušová, & Wilhelmová, 2011). Estas características permiten la deslocalización del electrón desapareado del radical fenoxilo tanto en el anillo B como hacia el resto de la estructura y la posibilidad de coordinar metales de transición como hierro y cobre (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002; Procházková, Boušová, & Wilhelmová, 2011; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). Por otro lado, está el segundo grupo de polifenoles, denominados no flavonoides, donde se encuentran los compuestos que no poseen esta estructura básica, como los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, taninos hidrolizables, entre otros, tal y como se muestra en la figura 3. Los estudios de estructura-actividad antioxidante informan que para los compuestos no flavonoides, dependerá del número y posición de los grupos OH, además de la densidad electrónica del anillo bencénico que determina la disponibilidad de los átomos de hidrógeno para ser donados (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996).



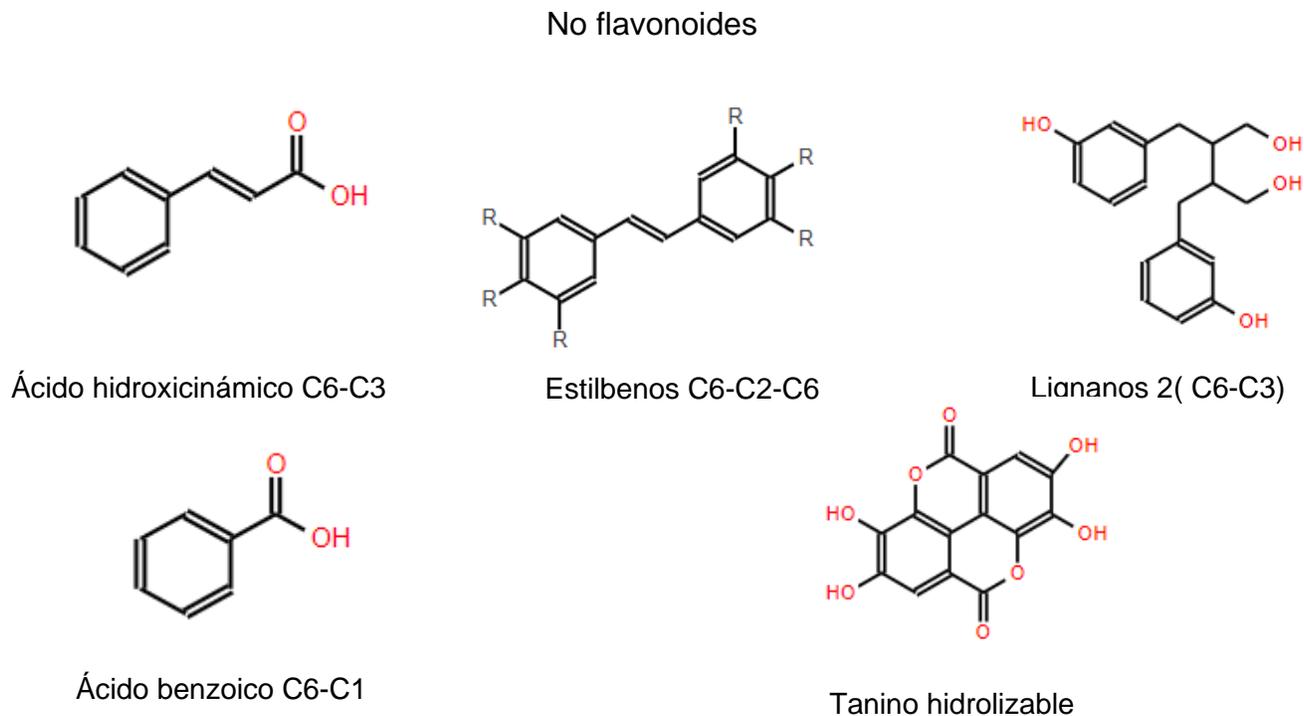
Flavon



Taninos condensables



**Fig 2.** *Subclasificación de los flavonoides.*



**Fig 3.** Subclasificación de los no flavonoides.

#### 1.4 Extracción de polifenoles desde plantas.

El paso más importante para la obtención de polifenoles desde una matriz vegetal, es la extracción. En este sentido, la técnica y el disolvente son factores clave para maximizar la extracción de forma selectiva, evitando sustancias no deseadas (Cvjetko Bubalo, 2018). Los procesos de extracción convencionales son bastante laboriosos, requieren mucho tiempo e involucran grandes cantidades de solventes a menudo tóxicos. Es por esta razón que en la última década se han considerado técnicas de extracción más eficientes, basadas en un compromiso razonable entre los requisitos económicos, sociales y ambientales (Cvjetko Bubalo, 2018). Por esa razón, se han introducido y aplicado tecnologías de extracción modernas que utilizan disolventes seguros y no tóxicos para la extracción de diversos compuestos. Algunas de estas tecnologías son: extracción asistida por microondas (MAE, por su sigla en inglés), extracción asistida por ultrasonido (UAE, por su sigla en inglés), extracción por Fluidos supercríticos (SFE, por su sigla en inglés), y extracción acelerada por solventes (ASE, por su sigla en inglés) (Panja, 2017).

La extracción asistida por microondas se basa en la irradiación de ondas microondas causando el movimiento de las moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a un incremento de la temperatura, lo que facilita la difusión de compuestos desde la matriz al disolvente, disminuyendo los tiempos de extracción (Izquierdo, 2013). Por otro lado, la extracción asistida por ultrasonido se basa en la capacidad del ultrasonido (20kHz a 1MHz) de entregar una cantidad alta de energía al medio, produciendo un efecto llamado "cavitación", donde se generan burbujas que crecen y colapsan. Este colapso causa un aumento de temperatura y presión dañando la pared celular de la matriz vegetal, facilitando la transferencia de masa hacia el solvente (Corona-Jiménez, 2016). Por su parte, en la extracción por fluido supercrítico se trabaja con el solvente en condiciones supercríticas, aumentando la temperatura y la presión del sistema. El solvente más utilizado es el CO<sub>2</sub> por sus condiciones de punto crítico accesibles, y la facilidad de recuperación y eliminación del solvente una vez terminada la extracción (Doane-Weideman, 2004). Por último, en la extracción ASE se trabaja con una alta presión constante, aumentando la temperatura, de forma que el solvente eleve su punto de ebullición y se mantenga en estado líquido, aumentando su fluidez y mejorando la penetración en la matriz vegetal (Luthria, 2004) sin alcanzar su punto crítico.

La extracción con solvente acelerado se ha desarrollado rápido desde su primera aparición en 1995, tomando un rol protagónico dentro de los métodos tradicionales, debido a que posee variadas ventajas comparada con los métodos de extracción clásicos, entre las que se encuentran la disminución de la viscosidad del solvente, la mayor facilidad con la que el solvente penetra la matriz vegetal, y la mayor velocidad de transferencia de masa, involucrando tiempos menores de extracción, además de presentar menos pasos de preparación de muestra que los métodos tradicionales, como por ejemplo; el filtrado de la muestra después de la extracción. Adicionalmente en esta técnica se puede trabajar con múltiples ciclos estáticos de extracción para introducir volúmenes de solvente limpios a medida que avanza el proceso de extracción. Debido a su alta eficacia de extracción y el ahorro considerable de tiempo, la extracción con solvente acelerado promete ser una técnica eficaz de

extracción (Soto, 2015). También cabe destacar que presenta buenos rendimientos para la extracción de polifenoles. (Wu, 2004) (Wu X. G., 2004).

### **1.5 Metodologías para evaluar la capacidad antioxidante in vitro.**

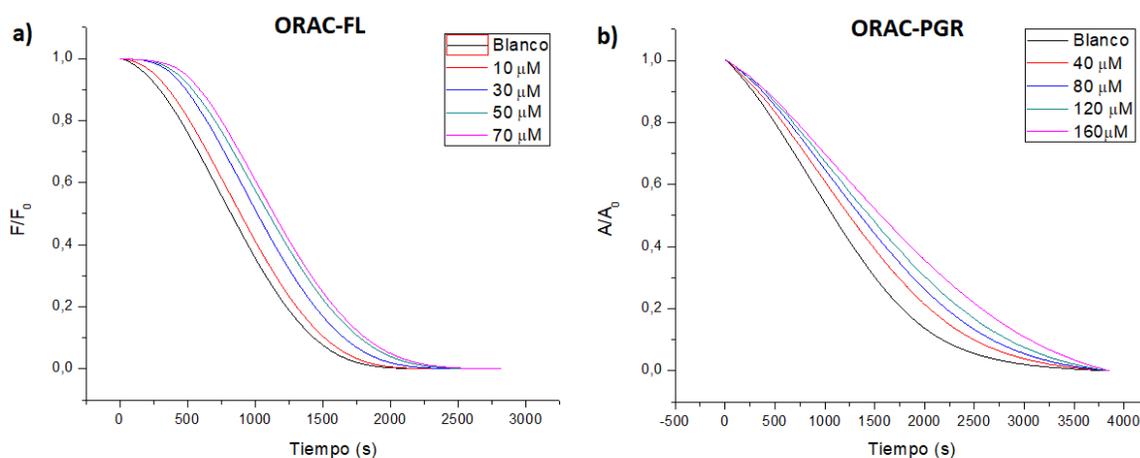
Cabe destacar que hasta ahora no existe un solo método para determinar la capacidad antioxidante (CA) completa de una muestra o alimento, ya que esta se puede determinar ya sea por mecanismo HAT o ET, de forma que los resultados obtenidos por los diferentes ensayos de CA se pueden complementar, para entregar información sobre la CA de una muestra, en cuanto a la cantidad y reactividad de los antioxidantes presentes.

#### **1.5.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).**

El método ORAC-FL es un ensayo que mide la capacidad de una muestra para apagar radicales centrados en oxígeno, formados por la descomposición térmica en condiciones aeróbicas del AAPH (2,2'-azobis (2-amidipropano) diclorhidrato). En este ensayo, los radicales generados reaccionan con una molécula sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente; es decir, a medida que avanza la reacción, la sonda se consume y disminuye la fluorescencia. El antioxidante adicionado al medio, compite con la molécula sonda para estabilizar el radical, resultado que se ve en la permanencia de la fluorescencia de la molécula sonda hasta que el antioxidante se consume. En este ensayo, la capacidad antioxidante, como se muestra en la figura 4.a, se evalúa a partir del área bajo la curva de los perfiles cinéticos de decaimiento de la fluorescencia y los valores obtenidos para la muestra se comparan comúnmente con el compuesto Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), análogo hidrosoluble de la vitamina E, lo que permite determinar un índice ORAC en términos de este compuesto de referencia. Por otra parte, ORAC-PGR es una técnica que mide el grado de protección que ofrece la muestra frente a los radicales generados a partir de la descomposición térmica del AAPH, salvo que, en este caso, la molécula sonda es pirogalol rojo. Esta molécula, reacciona más rápido que la fluoresceína con los RL, por lo que se utiliza

para evaluar la reactividad de los antioxidantes presentes. Al utilizar esta molécula sonda, se registra el decaimiento de la absorbancia en función del tiempo causado por la descomposición oxidativa provocada por los radicales libres formados, como se muestra en la figura 4.b. (López-Alarcón & Lissi, 2006)

En las metodologías ORAC-FL y ORAC-PGR predomina mayoritariamente el mismo mecanismo (HAT), pero el resultado depende de la sonda molecular. Esto permite complementar ambas respuestas considerando no solo la estequiometría (ORAC-FL) sino la reactividad (ORAC-PGR) de antioxidantes presentes en los diferentes extractos (López-Alarcón & Lissi, 2006; López-Alarcón, 2011).



**Fig 4.** Curvas de decaimiento de los análisis ORAC-FL (a) y ORAC-PGR (b)

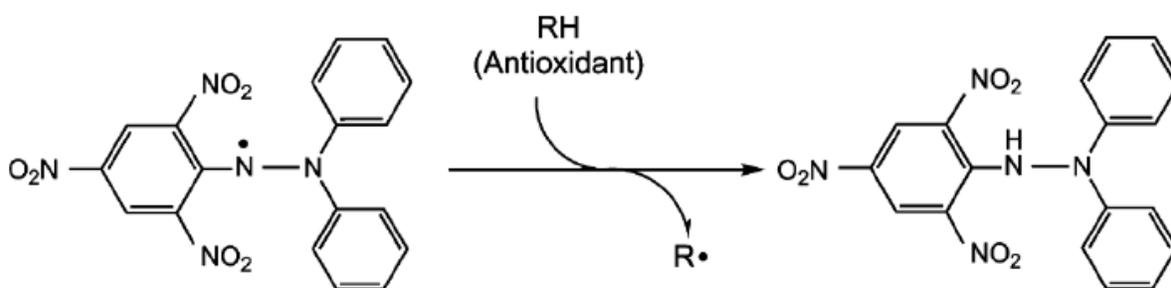
### 1.5.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH

El radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), disponible comercialmente, es semiestable, de color púrpura y, cuando se reduce, cambia de color a amarillo, es soluble en solventes orgánicos y presenta una banda de absorción típica en aproximadamente 517 nm.

El método de eliminación de radicales de DPPH es uno de los métodos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante. Según se muestra en la figura

5, el mecanismo predominante en este método es la transferencia de electrones (ET), y se basa en la medición del consumo del radical DPPH por la muestra. Para evaluar la capacidad de consumo del radical, se realizan mediciones espectrofotométricas de la disminución de la absorbancia a 517 nm del radical DPPH después de un tiempo de incubación con la muestra. (Prior, 2005). Habitualmente los datos se expresan como IC<sub>50</sub>, que corresponde a la concentración de antioxidante necesaria para apagar el 50% del radical (Antolovich, 2002; Molyneux, 2004), o como porcentaje de apagamiento del radical, relacionado a un patrón, utilizando la ecuación 1.

$$\%Apagamiento = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control}}\right) \times 100 \quad (1)$$



**Fig 5.** Mecanismo de reacción del antioxidante con el DPPH.

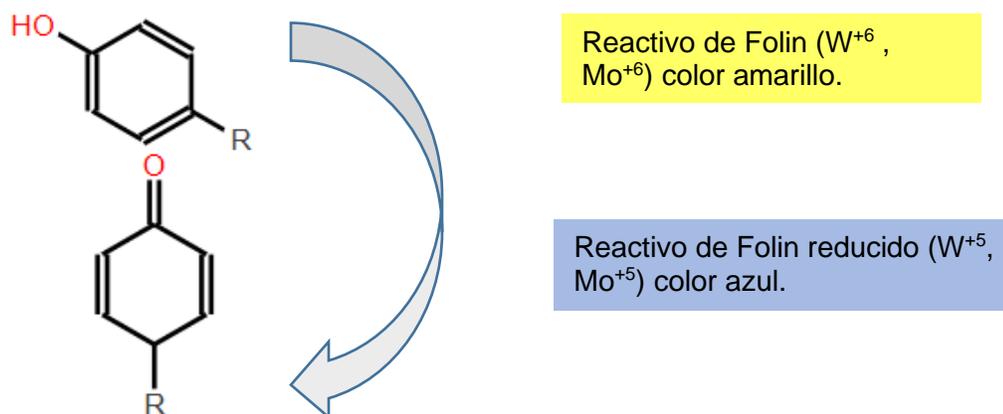
## 1.6 Cuantificación e identificación de polifenoles.

### 1.6.1 Contenido fenólico total.

Es posible determinar el contenido total de polifenoles (CTP) mediante el ensayo Folin-Ciocalteu, el cual se basa en que la reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo Folin-Ciocalteu a pH básico (>10) provoca un cambio de coloración del reactivo de Folin de amarillo a azul. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico (Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O) y molibdato sódico (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O) en ácido fosfórico. Como se muestra en la figura 6, el ácido formado es de color amarillo, que al ser

reducido por los grupos fenólicos da como resultado un color azul intenso, de forma que la intensidad de la absorbancia a 765 nm se utiliza para evaluar la CTP de la muestra (Sánchez, 2013), considerando que, a mayor cantidad de fenoles presentes, mayor será la absorbancia registrada a esta longitud de onda.

Una de las desventajas de esta técnica es que se pueden encontrar interferentes que sobreestimen el resultado, estos pueden ser compuestos reductores, como azúcares reductores (glucosa y fructosa) (Sánchez, 2013), pero de igual manera aún se utiliza como valor de comparación con resultados publicados de otros extractos vegetales.



**Fig 6.** Reducción del compuesto Folin.

### 1.6.2 Métodos cromatográficos.

Dentro de la caracterización de los extractos vegetales, uno de los métodos utilizados para la determinación de compuestos polifenólicos son los métodos cromatográficos, ya que permiten la separación de los componentes de una mezcla compleja para su determinación. En la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés), los componentes de una mezcla, en este caso los polifenoles, se separan al pasar a una alta presión a través de una fase estacionaria (columna) transportados por una fase móvil o eluyente. Los analitos transportados por la fase móvil van a interactuar de forma distinta con la fase estacionaria de acuerdo con su polaridad,

adquiriendo diferentes velocidades de migración. Las separaciones van a depender del grado en el que los analitos se distribuyen entre las dos fases. (Lluva, 2019)

Generalmente, esta técnica se utiliza en fase reversa para el análisis de este tipo de analitos, comúnmente acoplada a un detector espectrofotométrico con arreglo de diodos (DAD) utilizando como fase móvil una mezcla de agua acidificada con un ácido orgánico de cadena corta como ácido fórmico o acético en bajas concentraciones (2-5%) y un solvente de características más apolares como acetonitrilo o metanol (Martínez Cruz & Paredes López, 2014; Amato, 2015; Petridis, 2012; Rizzi, 2011; Scordino & Sabatino, 2014). Cuando se utiliza el mismo eluyente a lo largo de la cromatografía se dice que la elución es isocrática. En cambio, si se modifica su composición a lo largo de la separación se denomina elución por gradiente de fase móvil.

El DAD permite registrar los espectros de absorción a lo largo de toda la corrida cromatográfica, y de esta forma, se puede conocer tanto el espectro de absorbancia como la longitud de onda máxima de absorción ( $\lambda_m$ ) para cada compuesto y se puede comprobar la pureza cromatográfica para cada pico. Al registrar los cromatogramas a la  $\lambda$  máxima de cada compuesto, se puede aumentar la sensibilidad del método. Se han documentado límites de detección del orden de los ng mL<sup>-1</sup> para polifenoles utilizando este detector (Martínez Cruz & Paredes López, 2014). Por otra parte, una identificación más certera de los analitos se logra al utilizar un espectrómetro de masas como detector.

Es por esto que en este proyecto de tesis se optimizó la extracción con solvente acelerado, y se determinó la capacidad antioxidante (ORAC-FL, ORAC-PGR y el ensayo DPPH), el contenido total de polifenoles (Folin-Ciocalteu) y la caracterización del perfil fenólico (HPLC-DAD) de dos fenotipos de chía (negro y blanco) en diferentes etapas del desarrollo de la planta.

## **2. Planteamiento del problema.**

Actualmente el cultivo de *Salvia hispanica* L. se enfoca en la producción de semilla, (la que posee un alto contenido nutricional, desechándose la masa foliar en el proceso de cosecha).

Teniendo como antecedentes las últimas investigaciones de la masa foliar de la planta, donde se logró la identificación tentativa de algunos polifenoles en diferentes extractos de chía, existe la posibilidad de revalorizar la hoja de esta planta, por lo cual la extracción será un punto clave en la determinación de compuestos bioactivos de la hoja de *Salvia hispánica* L.

## **3. Hipótesis**

Entre las técnicas de extracción más utilizadas en la actualidad, la extracción asistida por ultrasonido ha ganado popularidad. Durante este proceso, se produce el efecto de cavitación, en el cual se forman burbujas de vapor que se expanden rápidamente y luego colapsan violentamente, generando una gran cantidad de energía. Sin embargo, este fenómeno puede causar la degradación de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra. Por el contrario, la técnica de extracción con solvente acelerado ofrece variadas ventajas, como una menor viscosidad del solvente, una mayor penetración en la matriz vegetal y una velocidad de transferencia de masa más rápida. Además de poder trabajar con múltiples ciclos estáticos de extracción, introduciendo volúmenes de solvente limpios a medida que avanza el proceso de extracción. Por lo tanto, se propone que la extracción con solvente acelerado con los parámetros de temperatura, tiempo estático de extracción y composición del solvente optimizados, será más eficiente que los métodos convencionales, incluida la extracción asistida por ultrasonido, para extraer compuestos antioxidantes de la hoja de *Salvia hispanica* L.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Optimizar la extracción de compuestos antioxidantes desde hojas de *Salvia hispanica* L. de dos fenotipos distintos utilizando extracción por solvente acelerado y aplicar estas condiciones de extracción a muestras foliares en distintas etapas del desarrollo de la planta.

### 4.2 Objetivos específicos

- I. Optimizar la extracción de compuestos antioxidantes con el modelo multivariable  $3^3 + 3$  centros, midiendo la capacidad antioxidante por medio del ensayo ORAC-FL.
- II. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos optimizados mediante ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH de dos fenotipos de *Salvia hispanica* L, en tres etapas de crecimiento de la planta.
- III. Determinar el contenido fenólico total de los extractos optimizados mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu de dos fenotipos de *Salvia hispanica* L. en tres etapas de crecimiento de la planta.
- IV. Caracterizar perfil fenólico por HPLC-DAD de de los extractos optimizados. de dos fenotipos de *Salvia hispanica* L, en tres etapas de crecimiento de la planta.
- V. Comparar la extracción asistida con ultrasonido previamente optimizada, con la extracción con solvente acelerado optimizada.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Reactivos.

**Reactivos sólidos:** TROLOX (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; Sigma Aldrich), Pirogalol rojo (Merck S.A.), Fluoresceina (Sigma Aldrich), AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida); Sigma Aldrich), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma Aldrich), Carbonato de sodio (Riedel de Haenag Seelze-

Hannover), Fosfato monoácido de sodio (Sigma Aldrich), Fosfato diácido de sodio (Sigma Aldrich), hidróxido de sodio (Merck S.A.).

**Polifenoles:** Ácido gálico (AK Scientific), Ácido protocatecuico (Sigma Aldrich), Catequina (Sigma Aldrich), Ácido Cafeico (Sigma Aldrich), Ácido Ferúlico (Sigma Aldrich), Polidatina (Sigma Aldrich), Resveratrol (Sigma Aldrich), Hesperedina (Sigma Aldrich), Mirecitina (Sigma Aldrich), Quercetin (Sigma Aldrich), Hesperetina (Sigma Aldrich) y Camferol (AK Scientific).

**Reactivos líquidos:** Acetona grado HPLC (Merck S.A.), Agua nanopura, Agua grado HPLC (Merck S.A.), Metanol grado HPLC (Merck S.A.), Acetonitrilo grado HPLC (Merck S.A.), Ácido acético glaciado (Merck S.A.), Reactivo de Folin (Merck S.A.).

## 5.2 Tratamiento de las muestras.

El cultivo se llevó a cabo en la estación experimental Pan de Azúcar de INIA Intihuasi, La Serena, Chile, donde se consideraron 2 variedades de semilla de chía, negra y blanca. Como se muestra en la figura 7, el diseño fue completamente aleatorio, con 4 repeticiones por nivel, y cada unidad experimental fue delimitada por una parcela (8 en total) de 5 m de largo y 6 hileras distanciadas por 0.7 m

5.Blanca	6.Blanca	7.Blanca	8.Negra
4.Negra	3.Negra	2.Blanca	1.Negra



**Fig 7.** *Diseño experimental del cultivo de chía realizado para el desarrollo de este trabajo.*

La siembra se efectuó el 10 de enero de 2020. Las plantas se regaron en función de la demanda atmosférica con una frecuencia de 3 a 5 días y tiempo de riego de 40 a 80 minutos. Los fertilizantes utilizados fueron urea, fosfato monoamónico y nitrato de potasio. Las fechas de muestreo fueron el 03 de marzo, 23 de abril, 23 de mayo y 03 de junio del año 2020, para cada muestreo se recolectaron 3-4 plantas. Las muestras

fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser trasladadas desde la estación experimental hasta la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, Santiago, donde fueron separadas en tallos, raíces, hojas e inflorescencias para posteriormente secarlas en estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante. Las muestras de hoja se trituraron en un mortero de porcelana y tamizaron con tamices de N° de maya 20 y 40.

Para los análisis previos a la optimización y el proceso de optimización por extracción con solvente acelerado, se consideraron las muestras recolectadas en el muestreo preliminar realizado el 03 de marzo de 2020, correspondientes al fenotipo de la semilla blanca de chíá, donde se formó una gran masa de hojas, independiente la parcela, la cual fue triturada, homogenizada y tamizada. Las muestras del 23 de abril, 23 de mayo y 03 de junio del año 2020 fueron utilizadas para la evaluación de la CA, el contenido fenólico total y el perfil fenólico en diferentes etapas morfológicas de la planta.

### **5.3 Extracción.**

#### **5.3.1 Análisis previos a la optimización.**

Para determinar la cantidad de ciclos de extracción con la que se trabajó, se utilizó el equipo Dionex ASE 100 (Accelerated solvent extractor). Se masó aproximadamente 1 g de muestra de hoja de chíá preliminar (3 de Marzo) y se mezcló con 5 g de cuarzo. Esta muestra fue transferida a una celda de extracción de 33 mL. Se realizó una extracción de 10 ciclos (para evaluar cuantos ciclos se utilizarían para la optimización), recolectando cada uno por separado y utilizando como solvente una mezcla 1:1 (v/v)  $\text{H}_2\text{O}:\text{ETOH}$ , en condiciones de  $80^{\circ}\text{C}$ , 1500 psi, y duración de 5 minutos por ciclo, según lo reportado por X. G. Wu, & col, (2004), y se determinó la CA mediante el método ORAC-FL para cada uno.

De acuerdo a los resultados obtenidos para determinar el número de ciclos para la mezcla de solvente 1:1 (v/v)  $\text{H}_2\text{O}:\text{ETOH}$ , mencionado anteriormente; se procedió a realizar la determinación de ciclos para las otras mezclas de extractante utilizadas

en la optimización; (H<sub>2</sub>O, ETOH y 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O:ETOH), a 80°C, 1500 psi, con 5 minutos de tiempo estático (X. G. Wu 2004)

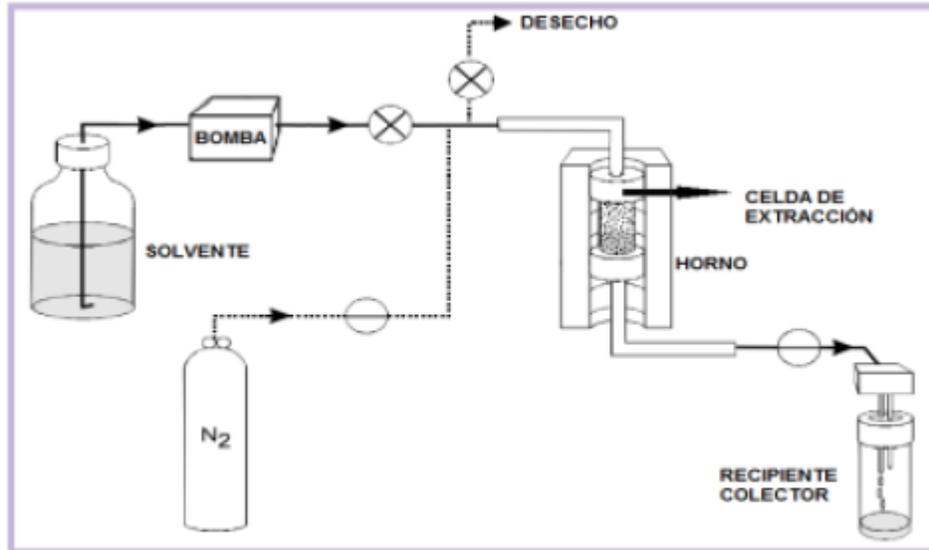
### **5.3.2 Optimización de la extracción con solvente acelerado**

Para la optimización de la extracción se utilizó el equipo Dionex ASE 100, (Accelerated solvent extractor) representado en la figura 8. Se masó aproximadamente 1 g de muestra de hoja de chía (muestra preliminar) y se mezcló con 5 g de arena de cuarzo. La muestra y la arena fueron transferidas a una celda de extracción de 33 mL. Cada extracción se realizó en 3 ciclos (previo análisis con diferentes números de ciclos), a presión constante de 1500 psi (X. G. Wu 2004). Se utilizó el modelo  $3^3 + 3$  centros para obtener una superficie de respuesta que maximice la capacidad antioxidante determinada mediante ORAC-FL. Las variables a optimizar fueron la temperatura (45, 80 y 115°C), el tiempo de extracción estática por ciclo (3, 10 y 17 min) y la composición de solvente (H<sub>2</sub>O, ETOH, 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O:ETOH), resultando un total de 30 experimentos como se muestra en la tabla 1. Una vez finalizada la extracción cada extracto se llevó a 100 mL con el solvente adecuado para posterior análisis.

**Tabla 1.** Total de experimentos a realizar, con los valores codificados y decodificados.

N° experimento	Tiempo real [min]	Tiempo codificado	Temperatura real [C°]	Temperatura codificada	Composición del solvente	Solvente codificado
1	10	0	45	-1	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
2	10	0	80	0	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
3	10	0	115	1	H <sub>2</sub> O	1
4	3	-1	115	1	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
5	3	-1	115	1	H <sub>2</sub> O	1
6	3	-1	45	-1	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
7	3	-1	80	0	H <sub>2</sub> O	1
8	10	0	80	0	H <sub>2</sub> O	1
9	17	1	45	-1	H <sub>2</sub> O	1
10	3	-1	80	0	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
11	10	0	45	-1	ETOH	-1
12	17	1	80	0	H <sub>2</sub> O	1
13	17	1	115	1	H <sub>2</sub> O	1
14	17	1	45	-1	ETOH	-1
15	17	1	115	1	ETOH	-1
16	10	0	80	0	ETOH	-1
17	3	-1	80	0	ETOH	-1
18	3	-1	115	1	ETOH	-1
19	10	0	115	1	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
20	17	1	45	-1	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
21	17	1	80	0	ETOH	-1
22	10	0	115	1	ETOH	-1
23	3	-1	45	-1	H <sub>2</sub> O	1
24	17	1	80	0	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
25	3	-1	45	-1	ETOH	-1
26	17	1	115	1	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
27	10	0	45	-1	H <sub>2</sub> O	1
28	10	0	80	0	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
29	10	0	80	0	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0
30	10	0	80	0	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	0

Una vez optimizada la extracción, se analizaron las muestras de hojas chía provenientes de semillas blanca y negra, en sus diferentes etapas de desarrollo (23 de abril, 23 de mayo y 03 de junio), utilizando las condiciones optimizadas.



**Fig 8.** Esquema del equipo ASE.

### 5.3.3 Extracción por ultrasonido.

Se realizó una comparación de diversos análisis (ORAC-FL, ORAC-PGR, DPPH, ensayo Folin-Ciocalteu, y perfil fenólico HPLC-DAD ), entre las muestras de las tres fechas (23 de abril, 23 de mayo y 03 de junio), sometidas a la extracción ASE optimizada, y la extracción por ultrasonido optimizada previamente por el grupo de laboratorio.

Para la extracción asistida por ultrasonido se masaron entre 14 y 23 mg de hoja en un microtubo de centrifuga y se agregó solución extractante Acetona / Agua / Ácido acético (AWA; 70.0/29.5/0.5 % v/v) en proporción a 500  $\mu$ L de AWA por cada 20 mg de hoja descrito por Maturana & col (2019). Cada microtubo se sometió a un baño de ultrasonido a 44 KHz de frecuencia, durante 74 min y posterior maceración por 20 h y 5 min. Luego de esto, los extractos fueron centrifugados durante 5 min a 7000 rpm y la fase líquida fue removida para los diferentes análisis.

### **5.3.4 Extracción con cruce de solventes.**

Para tener un real comparación, se realizaron comparaciones entre las muestras de la primera y segunda fecha de muestreo (23 Abril y 23 Mayo) sometidas a la extracción con solvente acelerado utilizando como solvente Acetona / Agua / Ácido acético (AWA; 70.0/29.5/0.5 % v/v), y a las muestras sometidas a la extracción asistida por ultrasonido utilizando 55:45 (v/v) H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente.

Para la extracción con solvente acelerado se masó aproximadamente 1 g de muestra de hoja de chía de la primera y segunda fecha de muestreo (23 Abril y 23 Mayo) y se mezcló con 5 g de arena de cuarzo. La muestra y la arena fueron transferidas a una celda de extracción de 33 mL. Cada extracción se realizó en 3 ciclos, cada uno de 17 min, a presión constante de 1500 psi, una temperatura de 115°C, y como solución extractante; acetona / Agua / Ácido acético (AWA; 70.0/29.5/0.5 % v/v). Posteriormente el extracto se llevó a un matraz de 100 ml, para los posteriores análisis.

Por otro lado, para la extracción asistida por ultrasonido se masaron entre 14 y 23 mg de hoja de chía de la primera y segunda fecha de muestreo (23 Abril y 23 Mayo) en un microtubo de centrifuga, y se agregó solución extractante 55:45 (v/v) H<sub>2</sub>O:ETOH en proporción a 500 µL por cada 20 mg de hoja. Cada microtubo se sometió a un baño de ultrasonido a 44 KHz de frecuencia, durante 74 min y posterior maceración por 20 h y 5 min. Luego de esto, los extractos fueron centrifugados durante 5 min a 7000 rpm y la fase líquida fue removida para los diferentes análisis.

## **5.4 Determinación de la capacidad antioxidante.**

### **5.4.1 ORAC-FL**

Para la medición de la fluorescencia, en el método ORAC-FL se utilizó un multilector de microplacas Perkin Elmer Instruments, midiendo a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión 528 nm, a intervalos de 60 segundos. La microplaca utilizada fue de 96 pocillos, blanca (material poliestireno).

La muestra se preparó tomando 25  $\mu\text{L}$  de extracto, diluyéndolo a 250  $\mu\text{L}$  con buffer fosfato ajustado a pH 7.4, y se realizó la misma dilución por segunda vez, luego de esta solución se tomaron 25  $\mu\text{L}$  para agregarlos a la placa, donde a cada pocillo se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de una solución de Fluoresceína (6,3 mM en celda), para ser incubada por 7 minutos a 40 °C en el multilector. Transcurrido este tiempo se le adicionó a cada pocillo 25  $\mu\text{L}$  de una solución de AAPH, resultando un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  en placa, todas las soluciones fueron preparadas en buffer fosfato de pH 7.4. Como blanco se utilizó buffer fosfato a pH 7.4 en lugar del extracto.

Luego de obtener las curvas de decaimiento de la fluorescencia, éstas fueron normalizadas ( $F/F_0$ ) y se calculó el área bajo la curva tanto para las muestras como para TROLOX, que se utilizó como estándar. Luego de obtenida la curva de calibración de TROLOX (1; 3,5; 6; 13,5; 16 y 18,5  $\mu\text{M}$  en celda, anexo 1), las áreas bajo la curva neta de las muestras se interpolaron en ella para finalmente expresar los resultados en  $\mu\text{mol ET}/1$  g de hoja. La medición de las muestras se realizó en triplicado para cada extracto.

En este ensayo, las curvas de decaimiento de la fluoresceína presentan un tiempo de latencia que corresponde al tiempo en que la sonda está siendo protegida por los antioxidantes presentes en los extractos.

#### **5.4.2 ORAC-PGR**

Para este método se utilizó un multilector de microplacas Perkin Elmer Instruments, midiendo el decaimiento de la absorbancia a 540 nm, con intervalos de 35 s. La microplaca utilizada será de 96 pocillos, transparente (material poliestireno).

A cada pocillo de la microplaca se le agregarán 150  $\mu\text{L}$  de una solución de pirogalol rojo (419,2 mM), y 25  $\mu\text{L}$  del extracto directo en la celda, para ser incubada por 7 minutos a 40°C en el multilector. Luego se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de una solución de AAPH (18,21 mM en placa), resultando así en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  en placa. El blanco se realizó utilizando solución buffer fosfato pH 7,4 en lugar del extracto.

Los resultados de este análisis son curvas de decaimiento, las cuales se tratan en el programa OriginPro 8.5 de la misma manera que para ORAC-FL, utilizando una curva de calibración de TROLOX (85; 150; 280; 400; 520 mg/ml en celda, anexo 2). Así los resultados finales se expresan como  $\mu\text{mol ET}/1\text{g h.s.}$  Para cada extracto se realiza la medición por triplicado.

#### **5.4.3 Ensayo DPPH**

Para este ensayo se utilizó un multilector de microplacas Perkin Elmer Instruments, midiendo la absorbancia a 517 nm. La microplaca utilizada fue de 96 pocillos, transparente, y de material poliestireno. La muestra se preparó agregando 10  $\mu\text{L}$  de extracto y 990  $\mu\text{L}$  de la solución DPPH de concentración cercana a 0.09mM (aproximadamente una unidad de absorbancia) a un eppendorf, el cual se incubó por 15 minutos en la oscuridad, y transcurrido el tiempo, se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de la solución resultante a la celda de la placa, para registrar la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de apagamiento se calculó con la ecuación 1 del punto 1.5.2. Cada extracto se analizó en triplicado.

### **5.5 Cuantificación e identificación de polifenoles.**

#### **5.5.1 Determinación del contenido fenólico total**

La muestra se preparó tomando 40  $\mu\text{L}$  de extracto y diluyéndolos a 1 mL con agua nanopura. A cada pocillo se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin Ciocalteu, 40  $\mu\text{L}$  de una solución al 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 45  $\mu\text{L}$  de agua nanopura y 15  $\mu\text{L}$  de muestra, dando un volumen final de reacción de 300  $\mu\text{L}$  en cada pocillo. La medición fotométrica de la absorbancia a 765 nm se realizó luego de un tiempo de reacción de 30 minutos a 37°C. El blanco se realizó utilizando agua nanopura en lugar de la muestra. Los resultados finales se expresaron en mg EAG/1 g ps, y se obtuvieron interpolando la absorbancia neta en una curva de calibración previamente realizada con ácido gálico (0,98; 3,99; 6,02; 10,01; 12,04; 14 mg  $\text{L}^{-1}$  en celda, anexo 3). Este ensayo se realizó por triplicado para cada extracto.

### 5.5.2 Determinación del perfil fenólico mediante HPLC-FLD-DAD

Para la determinación del perfil fenólico de las hojas de chía, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa acoplado a un detector espectrofotométrico con arreglo de diodos (DAD) y un detector de fluorescencia (FLD), en serie marca Agilent Technologies 1200 system. La columna que se utilizó fue una C18e Chromolith® HighResolution encapada de 4,6 mm de diámetro y 10 cm de largo marca Merck. La fase móvil estuvo compuesta de una mezcla binaria donde la fase móvil A correspondió a acetonitrilo y la fase móvil B a ácido acético al 2%, con un gradiente de fase móvil (anexo 4). Los cromatogramas se registraron a 260, 272, 278, 284, 318, 322, 366 y 370 nm utilizando el detector de arreglo de diodos. En cuanto al detector de fluorescencia, la longitud de onda de excitación fue 280 nm, registrándose cuatro cromatogramas de emisión a 318, 351, 445 y 346 nm. La identificación de los polifenoles se realizó por medio de la comparación de los tiempos de retención y espectros de absorbancia de 12 estándares registrados en la biblioteca del laboratorio, descritos en la tabla 2 (ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, polidatina, mirecitina, hesperetina, ácido rosmarínico, resveratrol, quercetina, camferol, y hesperedina). De los 12 polifenoles testeados en este trabajo, solo se logró la identificación y cuantificación de ácido cafeico y ácido rosmarinico en todas las muestras. Los picos obtenidos se integraron e interpolaron en las curvas de calibración previamente realizadas entre 0,1-2 mg/L para el ácido cafeico y entre 0,5- 50 mg/L para el ácido rosmarinico (anexo 5 y 6). Adicionalmente se determinó el límite de detección y de cuantificación a través de la ecuación 2 y 3, respectivamente.

$$LD = \frac{3 * DST}{P} \quad (\text{Ecuación 2})$$

LD: Límite de detección.

DST: Desviación estándar.

P: Pendiente.

$$LC = \frac{10 * DST}{P} \quad (\text{Ecuación 3})$$

LC: Límite de cuantificación.

DST: Desviación estándar.

P: Pendiente.

**Tabla 2.** Detalle de los doce estándares de polifenoles utilizados para la identificación y cuantificación del perfil fenólico de los extractos de hoja de chía. Se incluyen los tiempos de retención, las longitudes de onda de máxima absorbancia ( $\lambda_m$ ) de cada compuesto además de las longitudes de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) en los casos correspondientes.

Polifenol	Tiempo de retención	Detección por DAD	Detección por FLD	
	tr (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
Ácido Gálico	1,9	272	-	-
Ácido Protocatecuico	2,6	260, 290	-	-
Catequina	4,8	278	280	318
Ácido Cafeico	5,2	322	-	-
Ácido Ferúlico	10,2	322	332	445
Polidatina	11,2	306, 318	320	395
Mirecitina	18,2	254, 370	-	-
Hesperetina	18,6	284	-	-
Resveratrol	19,4	306, 320	323	390
Ácido rosmarinico	19,7	325	-	-
Quercetina	24,6	254, 370	-	-
Camferol	27,6	266, 366	-	-
Hesperedina	27,6	288	-	-

## **5.6 Análisis estadístico**

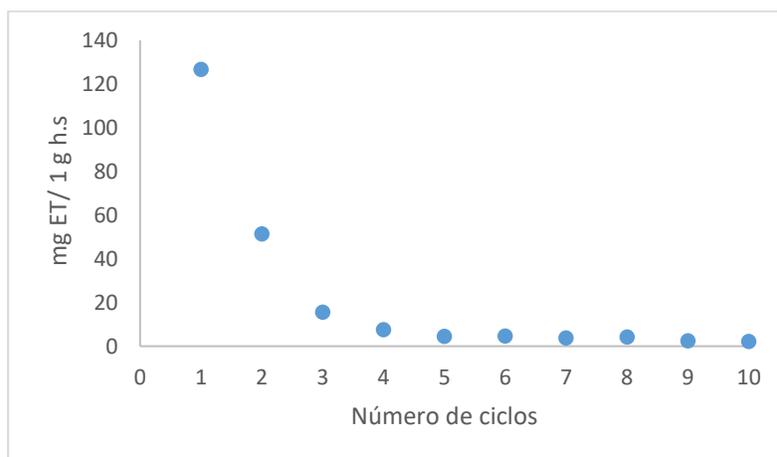
Para determinar la existencia de diferencias significativas en los resultados obtenidos entre fechas de muestreo, fenotipos, y tipo de extracción, se realizó un test ANOVA univariable, confirmando una distribución variable de los datos, un test de múltiples rangos (HSD Tukey, con 95% de confianza), y la confirmación de igualdad de varianza (Test Cochran's, con 95% de confianza), utilizando el programa STATGRAPHICS centurion XVI. El mismo programa se utilizó para realizar la optimización de la extracción descrita en el punto 5.3.2.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Optimización de la extracción de compuestos antioxidantes con el modelo multivariable $3^3 + 3$ centros, por medio de ORAC-FL.

#### 6.1.1 Determinación de la cantidad de ciclos previo a la optimización.

En una primera instancia se evaluó la mezcla de solvente 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O: ETOH. Como se puede observar en la Figura 9, en los tres primeros ciclos se extrae la mayor cantidad de antioxidantes desde la matriz, encontrándose que desde el cuarto ciclo el aumento de la CA no representa un aumento significativo en la extracción de antioxidantes. Debido a que los datos no presentan una distribución normal, no es posible realizar un ANOVA, sin embargo, el test Tukey HSD, con un 95% de confianza, mostrado en la tabla 3, indica que existen 5 grupos homogéneos, con una diferencia significativa solo entre los primeros tres ciclos.



**Fig 9.** Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL en función del número de ciclos de la extracción con solvente acelerado utilizando como solvente 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O: ETOH.

**Tabla 3.** Test HSD Tukey, 95% confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Número de ciclos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
10	3	2,275	X
9	3	2,571	X
7	3	3,862	X
8	3	4,246	X
5	3	4,504	X X
6	3	4,683	X X
4	3	7,665	X
3	3	15,618	X
2	3	51,432	X
1	3	126,695	X

Como la optimización de la extracción se realizó con tres tipos de solvente, se determinó que tres ciclos, fueran representativos para cada tipo de solvente; como se puede observar en la tabla 4, que independiente del solvente utilizado, los tres primeros ciclos son los que extraen la mayor cantidad de compuestos que aportan con la CA, siendo aproximadamente un 90% del total de la CA al sumar la contribución de cada ciclo.

**Tabla 4.** Resultados de ORAC-FL de los 5 primeros ciclos de cada extracción, utilizando como solvente H<sub>2</sub>O, ETOH, 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O:ETOH.

	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O:ETOH 1:1 (v/v)	ETOH
Ciclo 1	65,629	110,461	25,367
Ciclo 2	21,795	29,334	9,165
Ciclo 3	13,616	11,46	6,73
Ciclo 4	7,061	5,738	4,781
Ciclo 5	4,664	3,795	3,207

En el análisis estadístico univariable se encontró una distribución normal de los datos y una igualdad de varianzas, corroborando que existe una diferencia estadísticamente

significativa hasta el tercer ciclo ( $p$ -value<0,05). De acuerdo con los resultados obtenidos en este punto, la optimización se realizó con tres ciclos sucesivos.

### **6.1.2 Optimización de la extracción con solvente acelerado (ASE).**

Una vez definido el número de ciclos que se utilizarán, se realizó la optimización de la extracción con solvente acelerado. Para llevar a cabo la optimización, se utilizó el modelo  $3^3 + 3$  centros para obtener una superficie de respuesta que maximice la CA determinada por el ensayo ORAC-FL. Las variables a optimizar fueron la temperatura (45, 80 y 115°C), el tiempo de extracción estática por ciclo (3, 10 y 17 min) y la composición de solvente (H<sub>2</sub>O, ETOH, 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O:ETOH).

De acuerdo con el modelo multifactorial  $3^3 + 3$  centros, se obtuvieron un total de 30 experimentos como se muestra en la tabla 5, donde los factores fueron 3: tiempo de extracción estática por ciclo (A), temperatura (B) y la composición del solvente (C), con 6 posibles combinaciones AA, BB, CC, AC, AB, BC. Los factores se codificaron entre tres valores (-1, 0 y 1) para darles el mismo peso estadístico.

**Tabla 5.** Resultados de los 30 experimentos del modelo multifactorial con los factores decodificados, expresados por ORAC-FL [mg ET/ 1g h.s].

N° experimento	Tiempo [min]	Temperatura [C°]	Solvente	ORAC-FL [mg Eq TROLOX/gh.s]
1	10	45	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	512648±15177
2	10	80	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	506159±37230
3	10	115	H <sub>2</sub> O	437162±46667
*4	3	115	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	535889±84709
5	3	115	H <sub>2</sub> O	281842± 34882
6	3	45	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	295963± 34926
7	3	80	H <sub>2</sub> O	258402±27297
8	10	80	H <sub>2</sub> O	135159± 3373
9	17	45	H <sub>2</sub> O	193004± 25548
10	3	80	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	459815± 42676
11	10	45	ETOH	45078± 4522
12	17	80	H <sub>2</sub> O	300308± 17238
*13	17	115	H <sub>2</sub> O	372283± 34159
14	17	45	ETOH	196081± 17871
*15	17	115	ETOH	439926± 32329
16	10	80	ETOH	86023±4197
17	3	80	ETOH	36019±4310
18	3	115	ETOH	110177± 22101
19	10	115	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	533700±30791
*20	17	45	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	358316± 17958
21	17	80	ETOH	193890± 21138
22	10	115	ETOH	218053± 25358
23	3	45	H <sub>2</sub> O	82549±35665
24	17	80	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	474900± 33767
25	3	45	ETOH	277354± 47539
*26	17	115	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	600777± 25962
27	10	45	H <sub>2</sub> O	152802±26624
28	10	80	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	397291±29203
29	10	80	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	443376±14042
30	10	80	1:1 H <sub>2</sub> O:ETOH	525415±25201

\*: Experimentos que se compararon en la discusión.

Los resultados informados en la tabla 4 son el promedio de 3 extracciones en las mismas condiciones con un triplicado en la medición instrumental por cada una. Luego de realizar todos los experimentos de la optimización por ASE, se realizó un análisis univariable, en donde se puede observar que la mejor respuesta se encontró

en el experimento N° 26, el cual fue realizado con un tiempo de extracción estática máximo (17 min), la temperatura máxima (115°C) y una composición de solvente 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O:ETOH, obteniendo un valor de 600.777mg ET/g h.s. Contrariamente en el experimento N°20, se puede observar que al bajar la temperatura a 45°C, se obtiene aproximadamente la mitad de la capacidad antioxidante, donde los parámetros solvente y tiempo son igual que el experimento 26. Por otro lado, en el experimento N°4, se disminuyó el tiempo de extracción estática con respecto al experimento N°26, y la capacidad antioxidante solo disminuyó un 10%, por lo tanto, se puede inferir que la temperatura es un factor más significativo que el tiempo de extracción en la capacidad antioxidante de la hoja de la chía. En cuanto a la composición del solvente, se observa que al comparar el experimento 26, con el 13 y 15, la mayor CA se obtiene en la combinación de los solventes, por lo tanto, se puede inferir que los compuestos con capacidad antioxidante se extraen mejor en un solvente con polaridad intermedia, considerando las polaridades de los solventes etanol y agua por si solos.

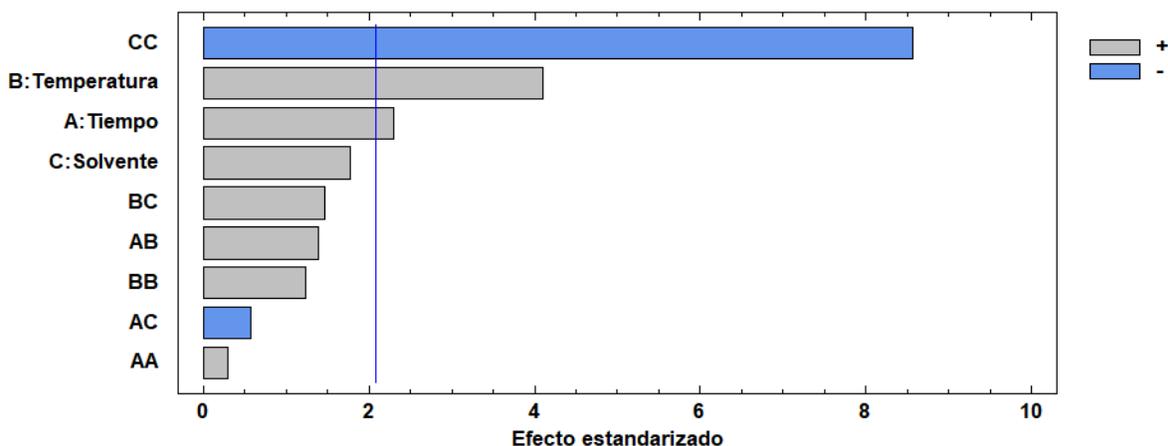
Por otro lado, en la tabla 6 se muestran los resultados multivariados obtenidos para evaluar la calidad del modelo, donde se observaron los siguientes parámetros:

**Tabla 6.** Resultados multivariados para evaluar la calidad del modelo.

R-cuadrada	R-cuadrada ajustada	Error estándar
83,8704	76,6121	81360,5

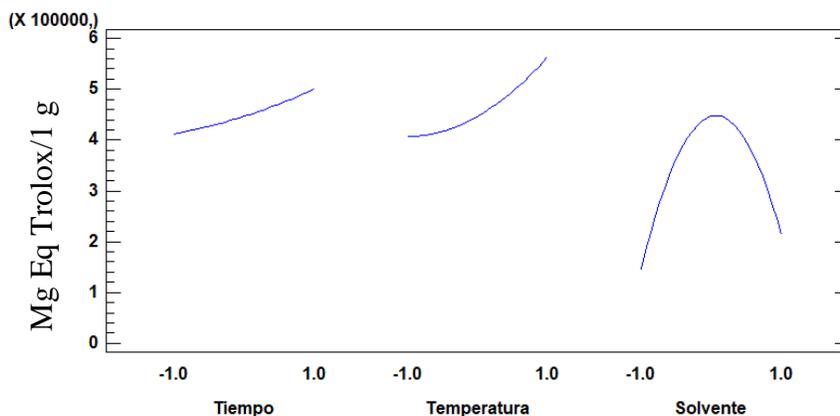
El modelo muestra que los coeficientes de determinación ajustados entregan un valor que se aproxima a un 80%, este se considera significativo, pero no se puede confirmar si es adecuado o no el modelo, por lo tanto, se realizaron dos test para confirmar la calidad de este, primero se realizó el test F, comparando la suma de cuadrado medio del modelo versus la suma de cuadrados medios del residuo, obteniendo un F de 11,5550 con un p-value de 0.0004, es decir que la regresión es significativa. Por otro lado, se realizó un segundo test, evaluando la carencia de ajuste versus el error puro, el cual se observa en el ANOVA realizado, teniendo un

p-value de 0,3002, es decir que la carencia de ajuste es despreciable, porque no hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al error puro, por lo que, con estos dos test se puede concluir que el modelo es adecuado para la optimización.



**Fig 10.** Diagrama de Pareto estandarizado para ORAC-FL.

El diagrama de Pareto presentado en la figura 10, muestra que las variables CC (cuadrado del solvente), B (temperatura) y A (tiempo), son factores estadísticamente significativos, teniendo un efecto negativo para el cuadrado del solvente y positivo para la temperatura y el tiempo. Los factores como la composición del solvente y las interacciones entre factores, no alcanzan a tener un valor estadísticamente significativo para la respuesta del ensayo ORAC-FL.



**Fig 11.** Gráfico de efectos principales para la optimización de la extracción.

En la figura 11 se presenta el gráfico de los efectos principales obtenidos en la optimización realizada, y en él se observa que a medida que aumenta la temperatura, la respuesta del ensayo ORAC-FL es mayor, este hecho está principalmente asociado a que al aumentar la temperatura, aumenta la velocidad de difusión de los analitos desde la matriz hacia el solvente, mientras que la energía térmica generada puede romper las interacciones de cohesión (soluto-soluto) y adhesión (soluto-matriz), facilitando la difusión de los compuestos con capacidad antioxidante desde la matriz vegetal hacia el solvente. También disminuye la viscosidad del solvente, por lo que la penetración del solvente en la matriz vegetal es mayor, produciendo una mejor extracción de los compuestos.

Por otro lado, se observa que al aumentar el tiempo, la respuesta ORAC-FL aumenta, aunque esta tendencia no es tan significativa como la temperatura. A pesar de esto, el tiempo es un factor considerable a la hora de elegir esta técnica de extracción, ya que comparada a las técnicas convencionales, la extracción ASE presenta tiempos considerablemente menores.

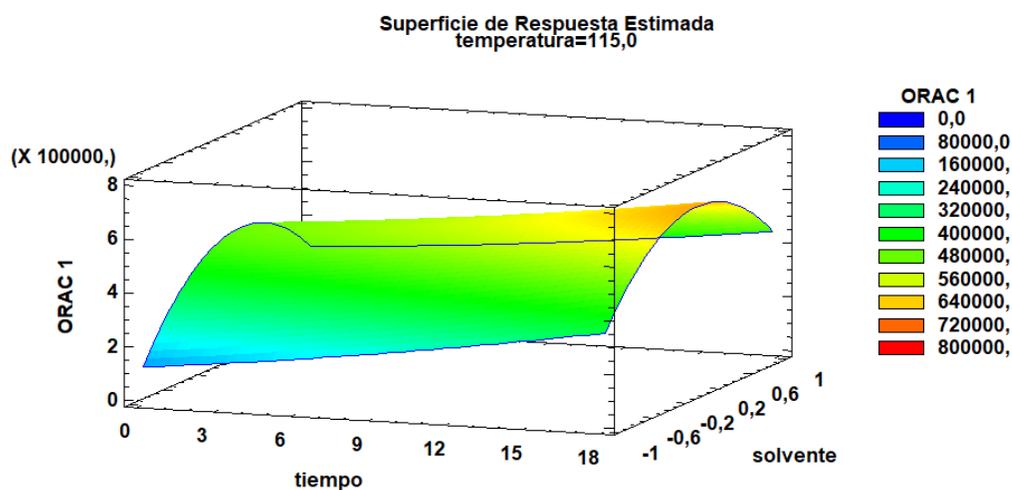
Finalmente, para el factor del solvente se observa un comportamiento parabólico, obteniendo un máximo en la respuesta del ensayo ORAC-FL. Dentro del proceso de extracción, la polaridad del solvente o mezcla está fuertemente relacionada con la de los compuestos de interés y la naturaleza de la matriz. En este caso, el valor máximo se observa a una composición de solvente con polaridad intermedia, concluyendo que la extracción tiene un mejor rendimiento cuando hay un porcentaje un poco mayor de H<sub>2</sub>O en relación al etanol.

Los valores óptimos para los factores estudiados se presentan en la tabla 7 indicando un tiempo de extracción estático de 17 min, una temperatura de 115°C y una composición de solvente de 55%H<sub>2</sub>O y 45%ETOH.

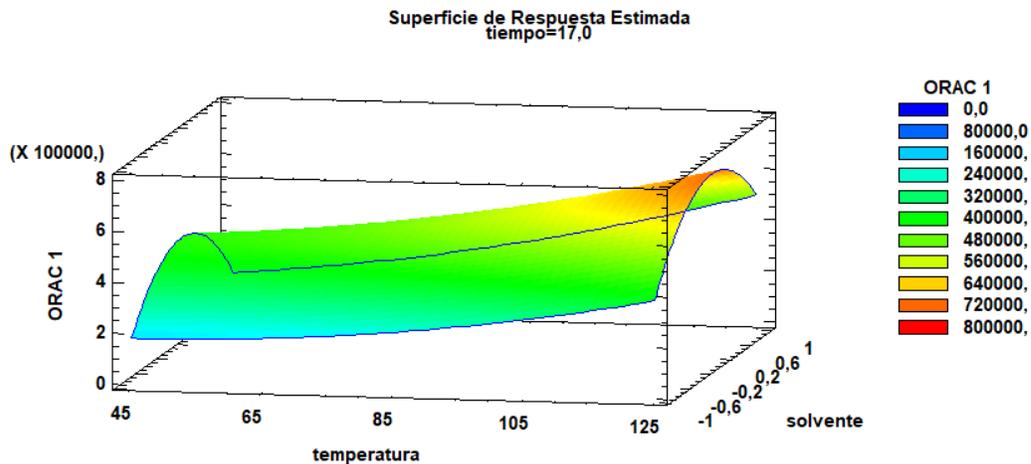
**Tabla 7.** Valores óptimos de los factores codificados.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Tiempo	-1,0	1,0	1,0
Temperatura	-1,0	1,0	1,0
Solvente	-1,0	1,0	0,102979

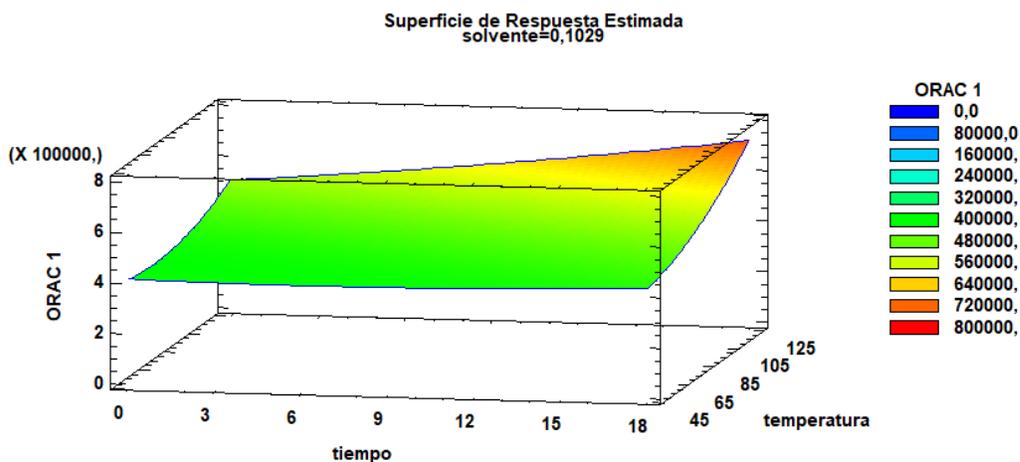
En los gráficos de superficie de respuesta de las figuras 12, 13 y 14, se puede observar que los sectores más anaranjados representan los valores más altos de la respuesta optimizada (CA), sabiendo que el valor óptimo fue 652272  $\mu\text{mol ET/g p.s.}$ , obtenido a una temperatura de 115°C, 17 min de tiempo estático de extracción y una composición de solvente de 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH.



**Fig 12.** Superficie de respuesta estimada, con el factor temperatura constante.



**Fig 13.** Superficie de respuesta estimada, con el factor tiempo constante.



**Fig 14.** Superficie de respuesta estimada, con el factor composición de solvente constante.

La figura 12, muestra la superficie de respuesta obtenida al graficar el tiempo de extracción y la composición del solvente, manteniendo constante el valor de la temperatura (valor óptimo), en ella se observa que el lugar más anaranjado corresponde a un tiempo de 17 min y una composición de solvente de 0.1029, el que corresponde a 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH. Por otro lado, en la figura 13, se observa el gráfico de superficie de respuesta obtenida al graficar la temperatura y composición de solvente, manteniendo constante el valor del tiempo de extracción (valor óptimo), encontrando que la zona más anaranjada es para una temperatura de 115 °C y un valor de composición de solvente de 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH. Y finalmente la figura 14 muestra el gráfico de superficie de respuesta entre el tiempo de extracción y la

temperatura, con un valor de composición de solvente constante (valor óptimo), observando que la zona más anaranjada corresponde a los 17 min y los 115°C.

A pesar que en la respuesta obtenida cuando se aumenta el factor temperatura se evidencia una clara pendiente de aumento, se trabajó con un máximo de 115°C para la optimización debido a que en estudios anteriores realizados por X. G. Wu, et al, (2004), los autores reportan que la temperatura óptima para evaluar la CA de extractos vegetales y alimenticios fue de 80°C al trabajar en una extracción ASE con solventes hidrofílicos, obteniendo buenos rendimientos y sin degradar los compuestos con CA. De esta forma, en este trabajo se buscó comprobar este análisis, obteniendo que aún con 115°C se obtiene un buen rendimiento de extracción y la degradación por temperatura no presenta un efecto desfavorable en la CA de los extractos.

Por otro lado, el intervalo de tiempo de extracción con el que se trabajó es razonable para considerar una extracción rápida, comparada con extracciones convencionales. Como se puede observar en la figura 11, la pendiente es menor que aquella obtenida para la variable temperatura, por lo que se puede inferir que tiempos mayores de extracción no aumentarán significativamente el rendimiento de la extracción de los antioxidantes.

Con el fin de aminorar la producción de sustancias que sean perjudiciales para el medioambiente y la salud de las personas, y mantener un procedimiento de extracción seguro y eficiente, es que se trabajó con los solventes H<sub>2</sub>O y ETOH, ya que son solventes considerados verdes y con grado alimenticio. Además, su consumo y uso en alimentos están regulados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

De acuerdo a los resultados obtenidos para la optimización, se puede mencionar que el modelo utilizado cumplió con la calidad que se esperaba, siendo los factores cuadrado del solvente, temperatura y tiempo estadísticamente significativos para la

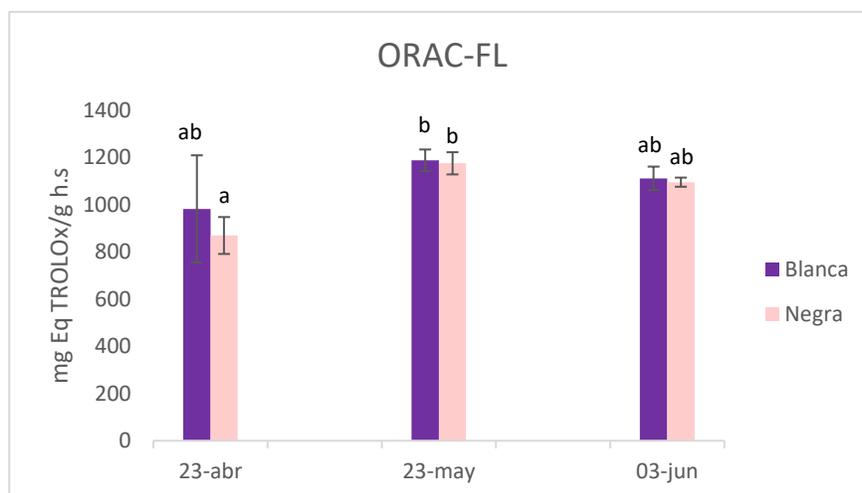
optimización, como se mostró en la figura 10, encontrando los siguiente valores óptimo: temperatura 115°C, un tiempo estático de extracción de 17 min y una composición del solvente de 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH.

Con los resultados obtenidos de la optimización por ASE, se procedió al análisis de hojas de chía, de dos fenotipos de semillas (blanca y negra) cosechadas el año 2020, en diferentes etapas del desarrollo de la planta teniendo como fecha 23-Abril, 23-Mayo y 03-Junio. Los ensayos realizados fueron de CA (ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH), CTP (ensayo Folin.Ciocalteu) y una caracterización del perfil fenólico por HPLC-DAD. Además, se realizó una comparación de los valores obtenidos para las diferentes muestras, para la extracción ASE optimizada en este trabajo de tesis, y la extracción asistida con ultrasonido optimizada por el grupo de laboratorio en una investigación anterior.

## **6.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH de dos fenotipos de *Salvia hispánica* L, en tres etapas de crecimiento de la planta.**

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

En la figura 15 y tabla 8 se observan los resultados obtenidos para el ensayo ORAC-FL para tres muestreos y dos tipos de hojas de fenotipos de semilla blanca y negra.



**Fig 15.** CA determinada por ORAC-FL para las 6 muestras analizadas.

*a;b;ab:* Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ORAC-FL de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 8.** Valores del ensayo ORAC-FL de las 6 muestras analizadas.

ORAC-FL [mg Eq TROLOX / g h.s]		
Fecha	Blanca	Negra
23-abr	982±226	869±78
23-may	1187±46	1175±47
03-jun	1111±49	1095±19

Los resultados del ensayo ORAC-FL presentados en la tabla 7 muestran valores que fluctuaron entre 869 y 1187 mg ET/g hoja seca. Para el fenotipo de chíá negro y blanco su mayor valor de CA fue en la segunda fecha de muestreo.

En el análisis estadístico se observaron datos con distribución normal, existiendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -value<0,05) solo entre el fenotipo negro del primer muestreo con los dos fenotipos del segundo muestreo.

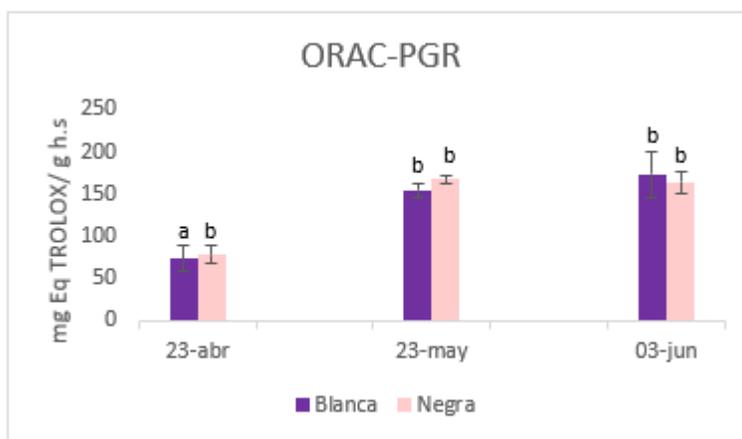
Por otro lado, se realizó una comparación con valores ORAC referenciales para frutos y hortalizas publicados en la base de datos del Instituto de nutrición y tecnología de los alimentos (INTA), obteniendo valores mayores para la hoja de chíá en comparación a alimentos reconocidos por su capacidad antioxidante como la hoja

de albahaca fresca (483,3875 mg ET/g hoja seca), hojas de cilantro fresco (157,4675 mg ET/g hoja seca), de frutas como el maqui (92,935 mg ET/g hoja seca) y la frambuesa (37,31 mg ET/g hoja seca).

El ensayo ORAC-FL entrega una medida estequiométrica de los compuestos con capacidad antioxidantes presente en la muestra, por lo que, si se quisiera producir hojas de chíá para la revalorización de este desecho industrial, se debería pensar en realizar la cosecha de éstas desde la mitad del desarrollo de la planta hasta el final, ya que en estas fechas no existe una diferencia estadísticamente significativa. Adicionalmente, es necesario mencionar que no existe una metodología que entregue información sobre la CA absoluta de un compuesto o extracto vegetal, siendo necesario complementar la información estequiométrica que entrega ORAC-FL utilizando otras técnicas que brinden otro tipo de información. Es por ello, que se realizó el análisis del ensayo ORAC-PGR para determinar la reactividad de los antioxidantes presentes en los extractos (López-Alarcón, 2006; Lopez-Alarcón, 2011).

## 6.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC-PGR

En la figura 16 se observan los resultados de CA obtenidos mediante el ensayo ORAC-PGR para tres muestreos y los dos fenotipos de hoja de chía, blanca y negra.



**Fig 16.** Gráfico de resultados ORAC-PGR de las 6 muestras analizadas.

*a;b: Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ORAC-PGR de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.*

**Tabla 9.** Valores del ensayo ORAC-PGR de las 6 muestras analizadas.

Fecha	ORAC-PGR [mg Eq TROLOX / g h.s]	
	Blanca	Negra
23-abr	73±15	78±10
23-may	154±9	167±5
03-jun	174±27	164±13

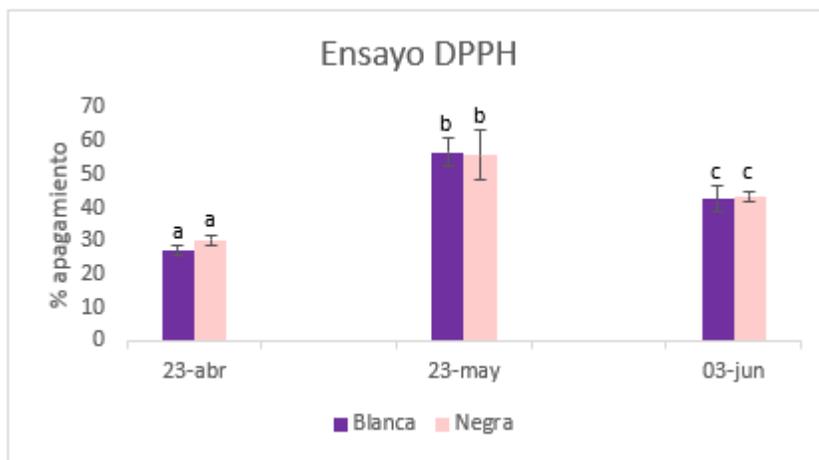
A diferencia del ORAC-FL, el ORAC-PGR entrega información sobre la reactividad de los compuestos antioxidantes (López-Alarcón & Lissi, A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pirogallol Red with peroxy radicals, 2006). Los valores del ensayo fluctuaron entre 73±15 y 174±27 mg ET/g h.s. El fenotipo negro obtuvo su mayor respuesta en la segunda fecha de muestreo, y por otro lado el fenotipo blanco la obtuvo en el tercer muestreo.

En el análisis estadístico se observa una distribución normal de los datos, formando dos grupos homogéneos según el test de múltiples rangos, es decir que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p\text{-value}<0,05$ ) entre el primer muestreo y los dos siguientes.

Entre los fenotipos no hubo diferencia estadísticamente significadtiva ( $p\text{-value}>0,05$ ) en ninguna fecha, por lo tanto, se puede decir que desde la segunda fecha de muestreo para ambos fenotipos existe una mayor CA, considerando que la variacion de la CA entre la segunda y tercera fecha de muestreo no son significativas.

### 6.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH

Los resultados obtenidos en el ensayo DPPH para todos los extractos de de hojas de chía se observan en la figura 17.



**Fig 17.** Gráfico de resultados del ensayo DPPH de las 6 muestras analizadas.

*a;b;c: Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de DPPH de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.*

**Tabla 10.** Valores del ensayo DPPH de las 6 muestras analizadas.

Fecha	DPPH [% apagamiento]	
	Blanca	Negra
23-abr	27±2	30±1
23-may	56±4	55±8
03-jun	42±4	43±2

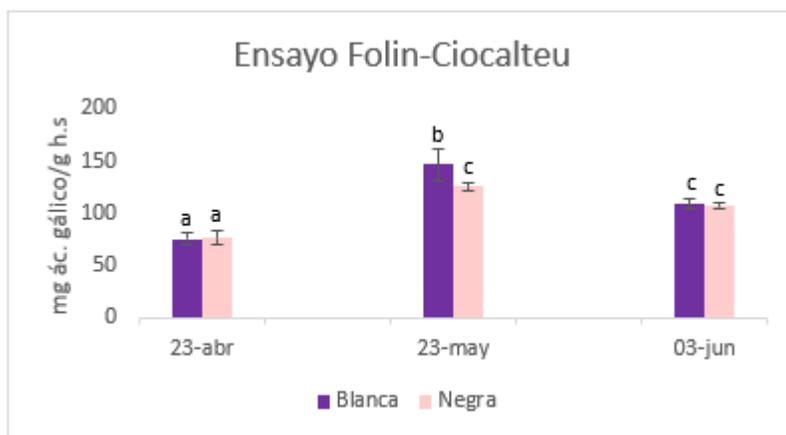
A partir de los resultados del ensayo informados en la tabla 10, se puede decir que el muestreo realizado en la segunda fecha presenta una mayor CA para ambos fenotipos. Los valores del ensayo se encuentran entre un 27% y 56% de apagamiento del radical DPPH. En el análisis estadístico univariado se observa una igualdad de varianza y una distribución normal de los datos, existiendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -value<0,05) entre los tres muestreos, confirmado por el test de múltiples rangos, donde se observan 3 grupos homogéneos. No se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los dos fenotipos ( $p$ -value>0,05) en ninguna de las fechas. Por lo tanto, se puede decir que el muestreo del 23 de mayo muestra la mayor CA, siendo este momento el mejor para realizar la cosecha de las hojas.

En este ensayo se podría mencionar que se obtiene más información de los compuestos menos polares reaccionando con el DPPH, debido a que en esta metodología se utiliza metanol como solvente, por lo tanto estos compuestos tendrían mayor solubilidad en este medio, en comparación con el ensayo ORAC, donde la reacción ocurre en medio acuoso. Por lo tanto son técnicas complementarias y no comparativas.

Considerando que las técnicas utilizadas para los tres ensayos de capacidad antioxidante son complementarias, se puede concluir que desde la segunda fecha en adelante se podrían cosechar las hojas si se busca obtener extractos con mayor CA. Ahora bien, si se deseara cultivar *Salvia hispanica* L. con un doble propósito de obtención de semilla y hojas con alta CA, es recomendable realizar la cosecha cuando la semilla ya se encuentre formada, lo cual ocurre después de la mitad de su desarrollo.

### 6.3 Determinación del contenido fenólico total mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu de dos fenotipos de *Salvia hispanica* L. en tres etapas de crecimiento de la planta.

Complementando los resultados de CA, en la figura 18 se observan los resultados obtenidos para el ensayo Folin C. para tres muestreos y dos fenotipos en estudio.



**Fig 18.** Gráfico de resultados del ensayo Folin.Ciocalteu de las 6 muestras analizadas.

a;b;c: Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de Folin-Ciocalteu de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 11.** Valores del ensayo Folin-Ciocalteu de las 6 muestras analizadas.

Folin-Ciocalteu [mg Eq ác. Gálico / g h.s]		
Fecha	Blanca	Negra
23-abr	75±6	76±7
23-may	146±15	125±4
03-jun	108±4	106±3

Los resultados del ensayo Folin-Ciocalteu presentados en la tabla 11, arrojan que en el segundo muestreo se encuentra la mayor cantidad de compuestos fenólicos para ambos fenotipos de chía. Los valores de los resultados obtenidos se encuentran entre 75-146 mg Eq ác. Gálico/ g hoja seca. En el análisis estadístico se ve una distribución normal de los datos, y una igualdad de varianza. El test de múltiples

rangos muestra 3 grupos homogéneos, existiendo diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -value<0,05) entre el primer muestreo y las dos fechas siguientes, al igual que entre los fenotipos del segundo muestreo, siendo el fenotipo blanco el que presenta mayor cantidad de polifenoles totales.

Basados en todo lo anterior, se puede decir que desde la segunda fecha hay una mayor cantidad de compuestos fenólicos en las hojas de la planta, manteniéndose así hasta el final del desarrollo de la planta para el fenotipo negro y existiendo una leve disminución para el fenotipo blanco.

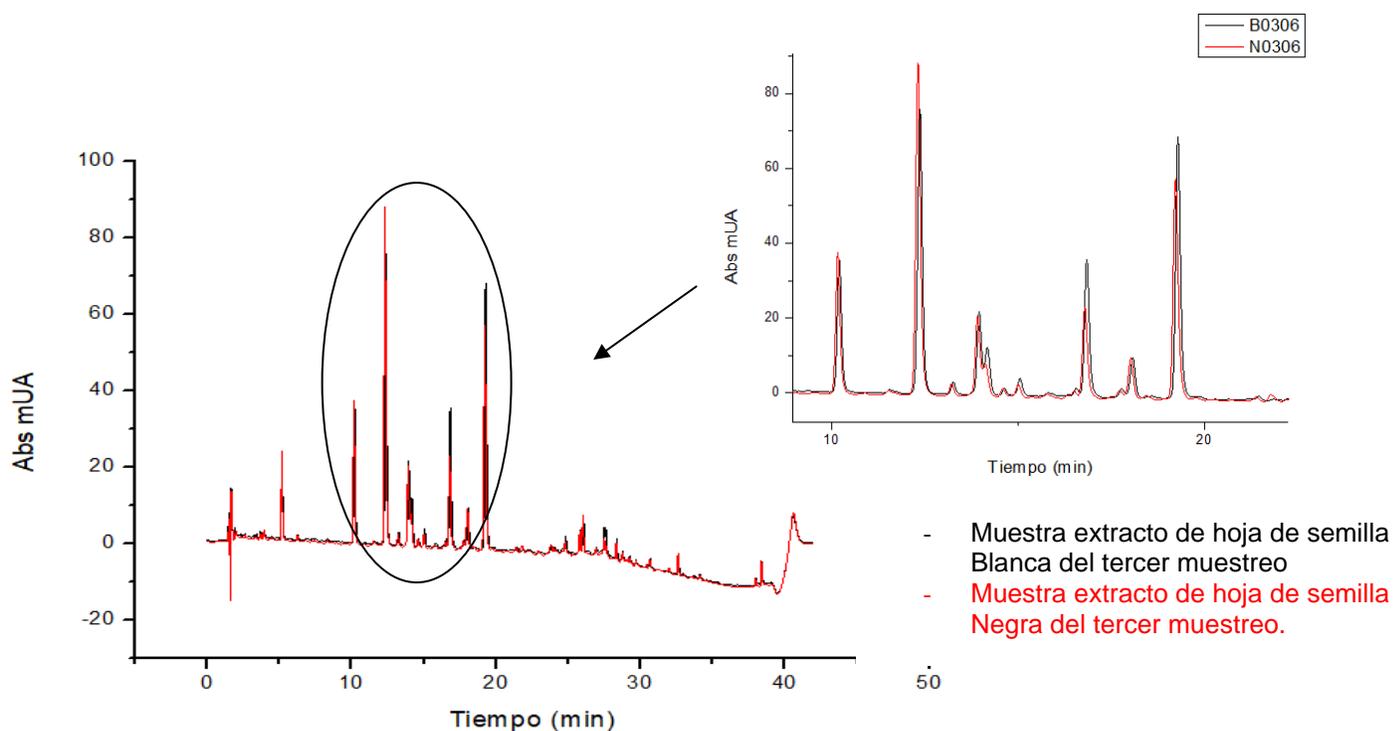
En la tabla 12 se observa las correlaciones de los ensayos de CA y Folin-Ciocalteu. La correlación más fuerte se encontró entre los ensayos Folin-Ciocalteu y DPPH ( $r^2$  de 0.947), esto puede deberse a que ambas técnicas comparten el mecanismo que predomina en su reacción con los RL. Las correlaciones de ORAC-FL con los ensayos ORAC-PGR, DPPH y Folin Ciocalteu, fueron menores a las de Folin/DPPH, pero aun así se consideran medianamente fuertes encontrándose en un rango de 0,756 y 0,837. Las correlaciones de ORAC-PGR con el ensayo DPPH y Folin-Ciocalteu, fueron las correlaciones más débiles, esto puede deberse a que estos ensayos miden parámetros diferentes, por un lado el ORAC-PGR mide la reactividad de los polifenoles del extracto, y por otro lado el ensayo DPPH mide el consumo del radical. Además, el ensayo Folin-Ciocalteu tiene variados compuestos reductores que podrían sobrestimar la medición de la respuesta de este ensayo, como por ejemplo, azucares.

**Tabla 12.** Correlación entre los ensayos ORAC-FL, ORAC-PGR, DPPH y Folin-Ciocalteu.

Correlación	$r^2$
ORAC-PGR/Folin	0,622
ORAC-PGR/DPPH	0,679
ORAC-FL/ORAC-PGR	0,756
ORAC-FL/DPPH	0,827
ORAC-FL/Folin	0,837
Folin/DPPH	0,947

#### 6.4 Caracterización del perfil fenólico por HPLC-DAD de extractos de *Salvia hispanica* L. de dos fenotipos de semillas, en tres etapas de crecimiento de la planta.

En el cromatograma de la figura 19 se puede observar la superposición de los cromatogramas registrados a 278 de los extractos de hoja de chíá, de ambos fenotipos de semilla, obtenidas en el tercer muestreo. Se puede concluir que presentan un perfil muy similar, encontrando diferencias solo en las alturas de los picos.



**Fig 19.** Cromatograma del tercer muestreo de ambos fenotipos registrados a 278 nm.

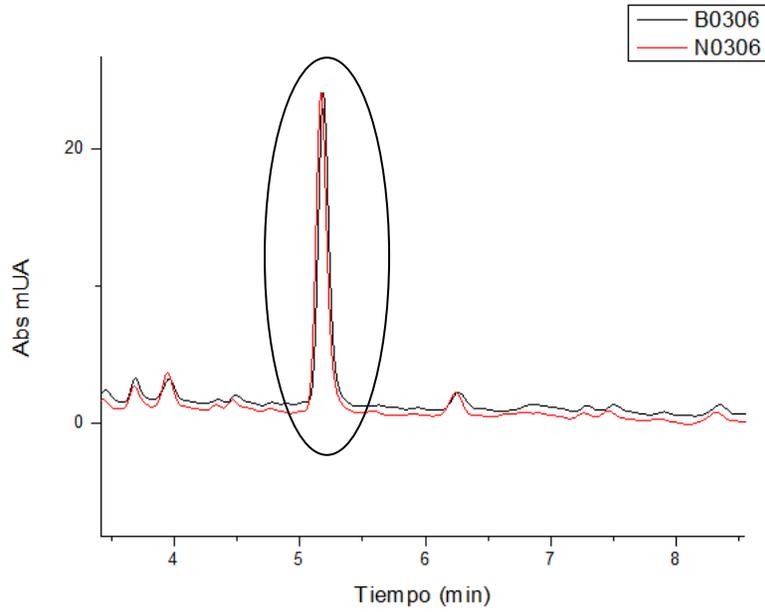
La identificación de los polifenoles se realizó por medio de la comparación de los tiempos de retención y espectros de absorbancia de 12 estándares registrados en la biblioteca del laboratorio, descritos en la tabla 2. De los 12 polifenoles testeados en este trabajo, solo se logró la identificación y cuantificación de ácido cafeico y ácido

rosmarínico. Se determinaron los límites de detección y cuantificación para ambos compuestos. El ácido cafeico presentó un límite de detección de 0,098 mg/L y un límite de cuantificación de 0,326 mg/L. Por otro lado, el ácido rosmarínico mostró un límite de detección de 0,050 mg/L y un límite de cuantificación de 0,166 mg/L.

#### **6.4.1 Cuantificación de ácido cafeico**

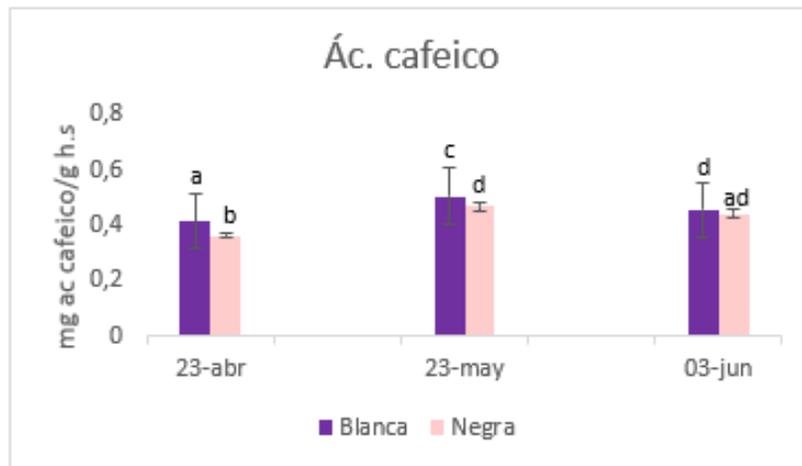
En la figura 20 se muestra el pico cromatográfico de ácido cafeico, identificado en las muestras del tercer muestreo de ambos fenotipos. Este ácido se logró identificar en los 6 extractos analizados con un tiempo de retención de 5,2 min y un  $\lambda$  máx de 322 nm. Una vez identificado, el pico correspondiente se integró y se interpoló en una curva de calibración previamente realizada con un patrón de ácido cafeico (anexo 5).

Se realizó un análisis estadístico de los resultados expuestos en la figura 21 y tabla 13, donde se observa una distribución normal de los datos, y la existencia de una diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -value<0,05) entre el fenotipo blanco del segundo muestreo y todas las demás muestras, siendo este el mayor valor encontrado para el ácido cafeico. Por lo tanto, se puede decir que en el segundo muestreo se encuentra una mayor concentración de ácido cafeico, aportando con la CA.



**Fig 20.** Pico cromatográfico de ácido cafeico registrado a 322 nm.

- Muestra de extracto de hoja de semilla Blanca del tercer muestreo
- Muestra de extracto de hoja de semilla Negra del tercer muestreo.



**Fig 21.** Gráfico de resultados de la cuantificación de ác. Cafeico por HPLC-DAD.

a;b;c;d;ad: Las letras sobre las barras representan la existencia o no de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ácido cafeico de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

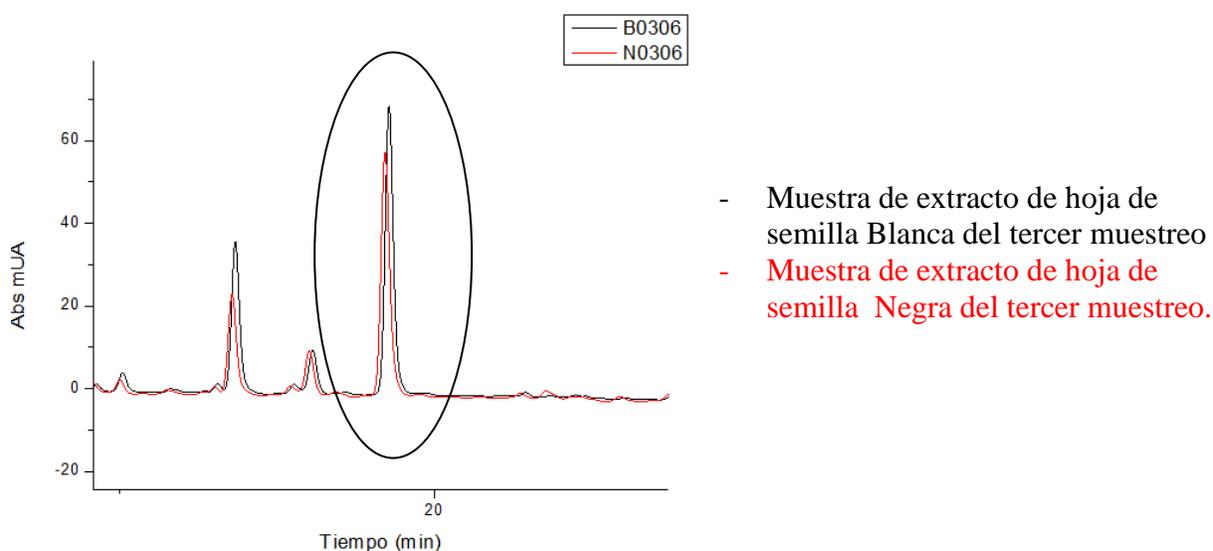
**Tabla 13.** Valores de la cuantificación de ác. Cafeico por HPLC-DAD.

Fecha	Ác. Cafeico [mg ác. Cafeico / g h.s]	
	Blanca	Negra
23-abr	0,41±0,02	0,361±0,007
23-may	0,50±0,01	0,46±0,02
03-jun	0,46±0,02	0,44±0,01

Un trabajo publicado por el grupo de laboratorio (Zuñiga, 2021) indica que en muestras de hoja de chía maceradas con 4 solventes diferentes (hexano, acetato de etilo, acetona y etanol) hasta agotar la matriz, alcanzaron una concentración máxima de 0.004 mg ac. cafeico/g h.s, siendo una mejor extracción la optimizada en este trabajo, ya que se encontraron concentraciones de hasta 0,5 mg ác. cafeico/ g h.s.

#### 6.4.2 Cuantificación de ácido rosmarínico

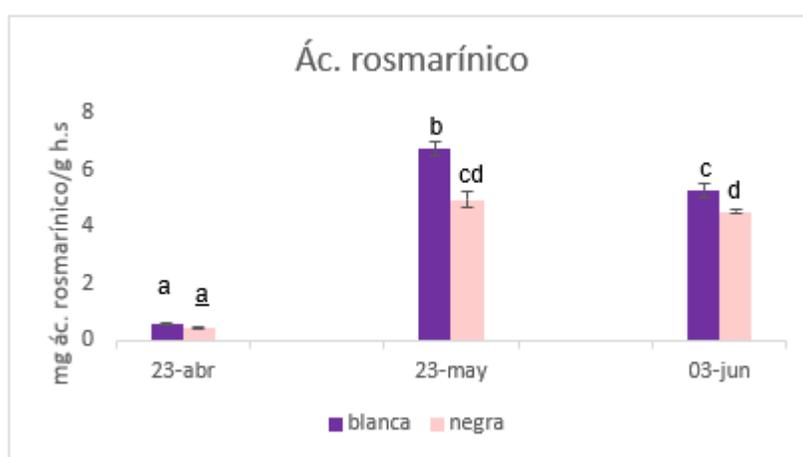
Se logró identificar ácido rosmarínico en las 6 muestras analizadas. En la figura 22 se muestra el pico cromatográfico del ácido rosmarínico con un tiempo de retención de 19,7 min y un  $\lambda_{\text{máx}}$  322 nm. Una vez identificado, el pico correspondiente se integró y se interpoló en una curva de calibración previamente realizada con un patrón de ácido rosmarínico (anexo 6).



**Fig 22.** Pico cromatográfico de ácido rosmarínico registrado a 322 nm.

Los resultados informados en la figura 23 y tabla 14 muestran una mayor concentración de ácido rosmarínico en la segunda fecha de muestreo, con una gran diferencia entre la primera fecha con las dos fechas de muestreo siguientes, existiendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -value<0,05).

Por lo tanto se puede decir que el ácido rosmarínico tiene una mayor concentración desde la mitad del desarrollo de la planta, siendo en parte, responsable de la CA de cada muestra.



**Fig 23.** Gráfico de resultados de la cuantificación de ácido rosmarínico por HPLC-DAD.

a;b;c;d;cd: Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ácido rosmarínico de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 14.** Valores de la cuantificación de ácido Rosmarínico por HPLC-DAD.

Fecha	Ác. Rosmarínico [mg Eq ácido Rosmarínico / g h.s]	
	Blanca	Negra
23-abr	0,60±0,02	0,433±0,006
23-may	6,7±0,2	4,9±0,3
03-jun	5,2±0,3	4,52±0,07

Esta identificación se puede comparar con la realizada por el grupo de laboratorio (Zuñiga, 2021), donde se obtuvo una concentración máxima de 3,7 mg ácido rosmarínico/g h.s, mediante una extracción por maceración, donde se utilizaron solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etilo, acetona y etanol),

siendo el más eficiente el etanol. Por lo tanto, se puede decir que la extracción de ácido rosmarínico en condiciones optimizadas por ASE, es más eficiente, logrando cuantificar hasta 6,7 mg ác rosmarínico/g h.s.

Una vez analizados los ensayos ORAC-FL, ORAC-PGR, DPPH, ensayo Folin-Ciocalteu y la caracterización del perfil fenólico, se puede concluir que en la mayoría de los ensayos la segunda fecha de muestreo fue la que presentó una mayor CA, una mayor cantidad de polifenoles totales, y una mejor extracción de compuestos como el ácido cafeico y el ácido rosmarínico, existiendo pequeñas variaciones con la última fecha, sin ser estadísticamente significativas ( $p\text{-value}>0,05$ ). Por lo tanto, el mejor momento del desarrollo de la planta para cosechar las hojas, es entre el segundo y tercer muestreo, esperando que la semilla se forme, y el deshoje de la planta se realice de manera natural, terminando con su función en la planta, y convirtiéndose en un desecho, para así lograr revalorizar esta matriz vegetal.

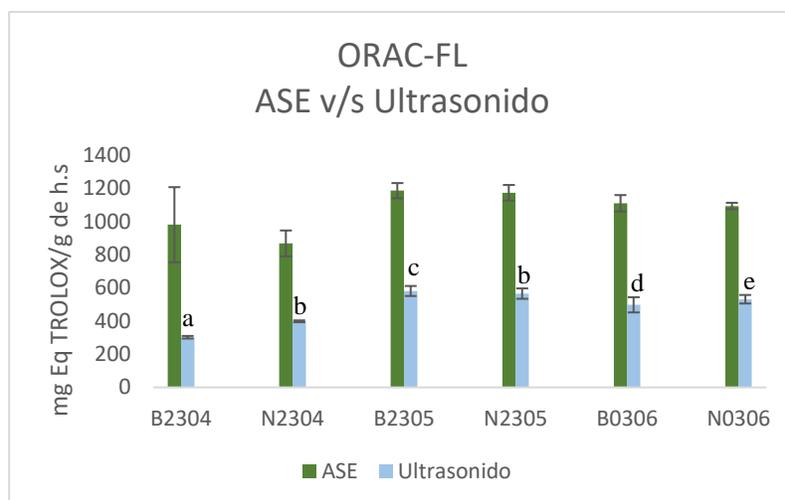
### **6.5 Comparación de la extracción asistida con ultrasonido previamente optimizada, con la extracción con solvente acelerado optimizada.**

Todos los resultados obtenidos con la extracción ASE optimizada en este proyecto de tesis y la extracción asistida por ultrasonido optimizada previamente por el grupo de laboratorio en una investigación anterior se compararon. Para la extracción por ultrasonido se utilizó el mismo muestreo del 2020, en las fechas 23/abril, 23/mayo y 03/junio, las cuales se secaron y trituraron para los posteriores análisis.

Los análisis que se realizaron para la comparación de ambas técnicas de extracción fueron: ORAC-FL, ORAC-PGR, DPPH, ensayo Folin-Ciocalteu, y la caracterización del perfil fenólico por HPLC-DAD.

#### **6.5.1 Ensayo ORAC- FL**

En la figura 24 se presenta la comparación de los resultados obtenidos para la extracción ASE y para la extracción por ultrasonido.



**Fig 24.** Gráfico de resultados ORAC-FL de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

a;b;c;d:e: Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ORAC-FL de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 15.** Valores del ensayo ORAC-FL de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

Muestra	ORAC-FL [mg Eq TROLOX / g h.s]	
	ASE	Ultrasonido
B2304	982±227	302±8
N2304	869±78	399±5
B2305	1187±46	582±30
N2305	1175±47	566±31
B0306	1111±50	498±46
N0306	1095±19	532±26

Los resultados obtenidos de la comparación de las técnicas de extracción se muestran en la tabla 15. Se realizó un análisis estadístico, donde se observa que los valores obtenidos por la técnica ASE fueron mayores en las 6 muestras analizadas, existiendo una diferencia estadísticamente significativa en todas las muestras ( $p$ -value<0,05).

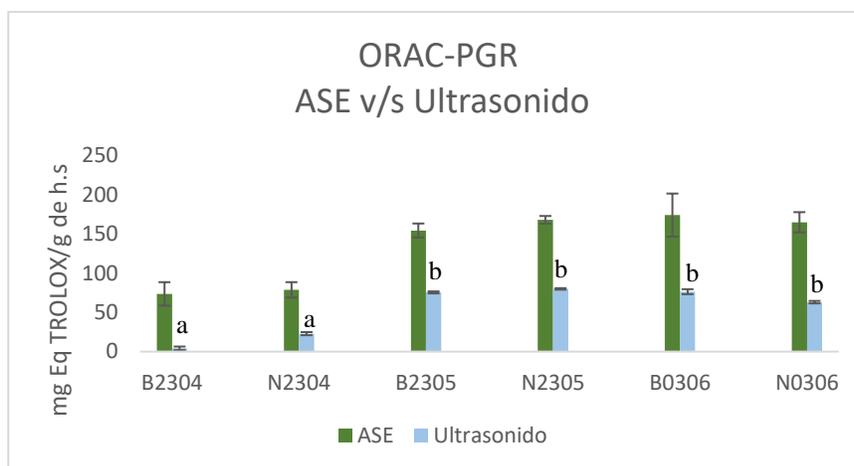
De igual manera se realizó un análisis estadístico entre la respuesta ORAC-FL obtenidas por el método de extracción por ultrasonido, donde los datos cumplen con la distribución normal, y la igualdad de varianzas, por lo tanto se puede decir que existe diferencia estadísticamente significativa entre las fechas de muestreo ( $p$ -value $<0,05$ ), confirmado por el test Tukey, informando 5 grupos homogéneos, existiendo dicha diferencia entre todas las muestras, exceptuando el fenotipo negro entre el primer y el segundo muestreo.

Por lo tanto, se puede confirmar que la extracción ASE propuesta logró extraer el doble de compuestos con CA en todas las muestras en comparación con la extracción asistida por ultrasonido, exceptuando la muestra del fenotipo blanco del primer muestreo, donde la extracción ASE logró extraer tres veces más que el ultrasonido. Por otro lado, se observa que independiente de la técnica de extracción, la segunda fecha de muestreo es donde se encuentra la mayor cantidad de compuestos con capacidad antioxidante en la hoja de chía y que la diferencia entre las técnicas puede estar asociada a las condiciones de temperatura y presión que está expuesta la muestra en la extracción ASE, aumentando así la eficiencia de extracción.

Por otro lado, se puede mencionar que los compuestos con CA presentan una mayor afinidad con solventes más polares, como lo son el H<sub>2</sub>O y ETOH en comparación al solvente acetona / Agua / Ácido acético (AWA; 70.0/29.5/0.5 % v/v).

### **6.5.2 Ensayo ORAC-PGR.**

En la figura 25 se puede observar la comparación de las respuestas del ensayo ORAC-PGR, obtenidas para la extracción ASE y para la extracción por ultrasonido.



**Fig 25.** Gráfico de resultados ORAC-PGR de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

a;b: Las letras sobre las barras representan la existencia o no de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ORAC-PGR de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 16.** Valores del ensayo ORAC-PGR de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

Muestra	ORAC-PGR [mg Eq TROLOX / g h.s]	
	ASE	Ultrasonido
B2304	73±15	4±2
N2304	78±10	22±2
B2305	154±9	75±1
N2305	167±5	79,9±0,9
B0306	174±27	76±3
N0306	164±13	63±2

Los datos obtenidos en el ensayo ORAC-PGR se presentan en la tabla 16. Se realizó un análisis estadístico de los resultados de CA, donde la mayor eficiencia de extracción fue para la técnica ASE, obteniendo una mayor respuesta en las 6 muestras analizadas, siendo estadísticamente significativas las diferencias entre ellas ( $p$ -value<0,05). La muestra del fenotipo blanco del primer muestreo, fue la que obtuvo la mayor diferencia, siendo 18 veces más alta la respuesta por la extracción ASE.

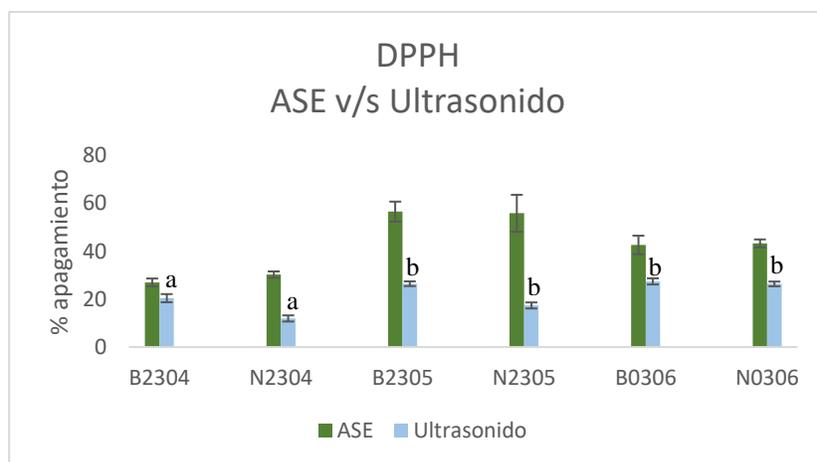
Por otro lado, se realizó un análisis estadístico entre la respuesta ORAC-PGR y el método de extracción con ultrasonido, donde se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa entre las fechas de muestreo ( $p$ -value<0,05), corroborándose por el test Tukey que muestra dos grupos homogéneos, indicando una diferencia estadísticamente significativa entre la primera fecha y las dos posteriores.

En resumen, al comparar la extracción asistida por ultrasonido y la extracción con solvente acelerado optimizada, se observa que ambas técnicas muestran que la segunda fecha de muestreo es donde se obtiene la mayor capacidad antioxidante (CA). Sin embargo, se destaca que la técnica de extracción con solvente acelerado (ASE) es más eficiente que la extracción por ultrasonido, ya que logra obtener valores aproximadamente del doble.

Además, es importante considerar que en la extracción asistida por ultrasonido se puede presentar la degradación de los compuestos con capacidad antioxidante debido al efecto de cavitación. La formación y colapso de burbujas de vapor durante esta técnica pueden generar altas temperaturas y presiones locales que podrían afectar la estabilidad de los compuestos antioxidantes. En contraste, la extracción con solvente acelerado optimizada proporciona un método más controlado, minimizando los riesgos asociados con la degradación de los compuestos.

### **6.5.3 Ensayo DPPH.**

En la figura 26 se observa la comparación de las técnicas de extracción ASE y extracción por ultrasonido, de las 6 muestras de ambos fenotipos.



**Fig 26.** Gráfico de resultados del ensayo DPPH de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

a;b: Las letras sobre las barras representan la existencia o no de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de DPPH de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 17.** Valores del ensayo DPPH de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

Muestra	DPPH [% apagamiento]	
	ASE	Ultrasonido
B2304	27±1	20±2
N2304	30±1	11±1
B2305	56±4	26±1
N2305	55±8	17±1
B0306	42±4	27±1
N0306	43±2	26±1

Los valores informados en la tabla 17 corresponden al ensayo DPPH, a los cuales se les realizó un análisis estadístico, obteniendo que la extracción de compuestos antioxidantes fue más eficiente para las 6 muestras sometidas a la extracción ASE, existiendo una diferencia estadísticamente significativa en comparación a la extracción asistida por ultrasonido ( $p$ -value<0,05).

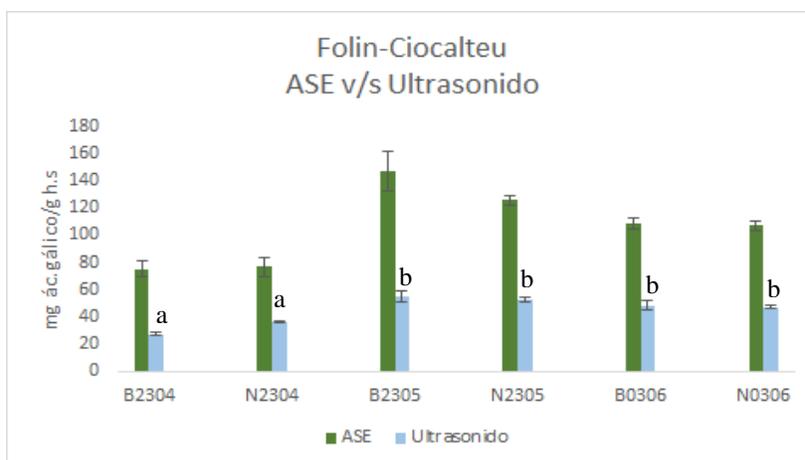
Por otro lado, a los resultados de CA obtenidos para la extracción asistida con ultrasonido, se les realizó un análisis estadístico, observando un comportamiento normal de los datos, obteniendo que el mayor % de apagamiento se obtuvo en el tercer muestreo, pero sin existir una diferencia estadísticamente significativa con la segunda fecha de muestreo ( $p$ -value>0,05).

La diferencia de eficiencia entre los tipos de extracción se debe a condiciones específicas de trabajo, como la temperatura y la presión en la extracción ASE. Una de las ventajas de la extracción ASE es que el solvente se mantiene en estado líquido sobre temperatura ambiente durante el proceso, lo que mejora su fluidez y capacidad de penetración en la matriz vegetal (Luthria, 2004). Esto permite una extracción más efectiva de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra de hoja. Además, la elección de un solvente más polar, como la mezcla H<sub>2</sub>O:ETOH, en comparación con el solvente acetona/agua/ácido acético (AWA), también influye en la eficiencia de extracción, evidenciando en los resultados que con un solvente más polar la extracción fue más eficiente.

Por todo lo anterior, se puede afirmar que la técnica de extracción ASE desarrollada en este trabajo es más eficiente que la extracción asistida por ultrasonido desarrollada en trabajos anteriores del grupo de investigación, obteniendo una mayor respuesta en todas las técnicas de CA presentadas en esta tesis para todas las muestras analizadas. Además, se observa que la mayor cantidad de compuestos antioxidantes presentes en la hoja de la chía se obtuvieron en la segunda fecha de muestreo para ambas extracciones, corroborando que esta fecha es el momento donde las hojas contienen una mayor CA.

#### **6.5.4 Ensayo Folin-Ciocalteu.**

En la figura 27 se observa la comparación de los valores obtenidos por el ensayo Folin-Ciocalteu para las 6 muestras analizadas, sometidas a la extracción ASE y a la extracción por ultrasonido.



**Fig 27.** Gráfico de resultados del ensayo Folin-Ciocalteu de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

a;b: Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de Folin-Ciocalteu de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 18.** Valores del ensayo Folin-Ciocalteu de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

Folin-Ciocalteu [mg Eq ác. Gálico / g h.s]		
Muestra	ASE	Ultrasonido
B2304	75±6	27±1
N2304	76±7	35,7±0,5
B2305	146±15	54±4
N2305	125±3	52±1
B0306	108±4	48±4
N0306	106±3	47±1

Los datos presentados en la tabla 18 corresponden a los valores obtenidos en el ensayo Folin-Ciocalteu, a los cuales se les realizó un análisis estadístico, informando que la extracción ASE obtuvo una mejor eficiencia en todas las muestras en comparación a la extracción por ultrasonido, siendo estadísticamente significativa esta diferencia ( $p$ -value<0,05).

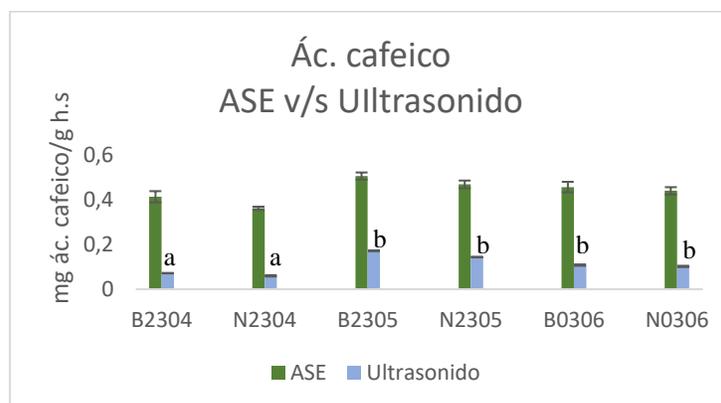
Se realizó un análisis estadístico a los valores obtenidos del ensayo Folin-Ciocalteu para las muestras sometidas a la extracción por ultrasonido, existiendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -value<0,05) entre la primera fecha de muestreo y las dos fechas siguientes.

En ambas extracciones se observa que el segundo muestreo es el que presenta la mejor respuesta para compuestos polifenólicos totales. Por lo tanto, se puede afirmar que la técnica ASE es más eficiente que la extracción por ultrasonido, existiendo diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -value<0,05) en todas las muestras comparadas, mostrando el mismo comportamiento ambas técnicas, encontrando un valor mayor en la segunda fecha de muestreo, manteniéndose así hasta el final del desarrollo de la planta.

Esta diferencia entre las técnicas, al igual que los ensayos ya analizados, indican que las condiciones de altas temperatura y presión son factores de alto impacto en la eficiencia de la extracción, así como los solventes utilizados, teniendo una mayor extracción de los compuestos polifenólicos totales.

### 6.5.5 Caracterización del perfil fenólico por HPLC-DAD.

La comparación de la obtención de ácido cafeico en las 6 muestras analizadas por las diferentes técnicas de extracción ASE y extracción por ultrasonido se muestran en la figura 28.



**Fig 28.** Gráfico de resultados de la concentración de ácido cafeico de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

a;b: Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ácido cafeico de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

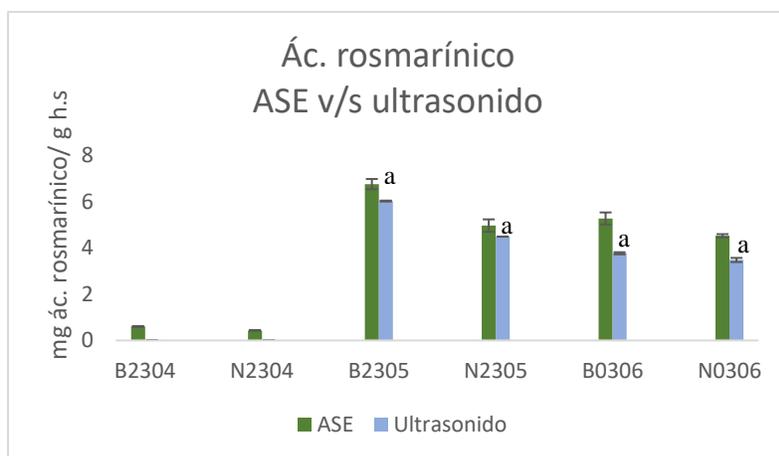
**Tabla 19.** Valores de la concentración de ácido cafeico de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

Ác. Cafeico [mg Eq ácido Cafeico / g h.s]		
Muestra	ASE	Ultrasonido
B2304	0,41±0,02	0,072±0,01
N2304	0,362±0,007	0,060±0,03
B2305	0,51±0,01	0,172±0,02
N2305	0,46±0,01	0,1439±0,004
B0306	0,45±0,02	0,108±0,003
N0306	0,44±0,02	0,102±0,003

Los datos informados en la tabla 19, muestran que la extracción ASE es más eficiente que la extracción con ultrasonido en la extracción de ácido cafeico, obteniendo mayores valores en todas las muestras analizadas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -value<0,05). Este resultado puede ocurrir debido a que el ácido cafeico se extrae mejor en las condiciones que se ve expuesto en la extracción ASE, y por otro lado tiene una afinidad mayor por solventes más polares.

El análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos de las muestras sometidas a la extracción por ultrasonido, nos confirman que la segunda fecha es donde existe una mayor concentración de ácido cafeico en las hojas de chía, logrando tener la misma tendencia que los resultados por ASE. Existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre el primer muestreo y los dos siguientes ( $p$ -value<0,05), pudiendo decir que desde la mitad hasta el final del desarrollo de la planta el contenido de ácido cafeico se mantiene constante.

En la figura 29 se observa la comparación de las respuestas obtenidas de la cuantificación de ácido rosmarínico para las 6 muestras sometidas a extracción ASE y a la extracción por ultrasonido.



**Fig 29.** Gráfico de resultados de la concentración de ác. rosmarínico de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

A: Las letras sobre las barras representan la existencia o no, de diferencia estadísticamente significativa entre los valores de ácido rosmarínico de cada muestra. Si las letras son iguales no existe diferencia estadísticamente significativa, en caso contrario, existe diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 20.** Valores de la concentración de ác. rosmarínico de las 6 muestras analizadas, comparando la extracción ASE v/s ultrasonido.

Muestra	Ác. Rosmarínico [mg Eq ác. Rosmarínico / g h.s.]	
	ASE	Ultrasonido
B2304	0,60±0,01	0
N2304	0,434±0,005	0
B2305	6,7±0,2	60,3±0,02
N2305	4,9±0,3	4,4923±0,004
B0306	5,2±0,3	3,77±0,05
N0306	4,52±0,07	3,48±0,09

Los resultados informados en la tabla 20 muestran que se encontró una mayor concentración de ácido rosmarínico en las muestras sometidas a la extracción ASE, comparadas a las muestras sometidas a la extracción asistida por ultrasonido, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p\text{-value} > 0,05$ ), por lo que ambas técnicas tendrían la misma eficiencia para extraer este compuesto. La diferencia que se encontró, fue que la extracción ASE logró cuantificar en el primer muestreo ácido rosmarínico, por el contrario de la extracción por ultrasonido, donde la señal cromatográfica quedó bajo el límite de detección. Por otro lado, ambas técnicas tienen la misma tendencia, extrayendo una mayor concentración de ácido

rosmarínico desde la segunda fecha de muestreo, no existiendo diferencia con la tercera  $p$ -value  $>0,05$ , pudiendo mencionar que desde la mitad del desarrollo de la planta se encuentra una concentración de ácido rosmarínico similar.

La temperatura ( $115^{\circ}\text{C}$ ) y presión (1500 psi) de trabajo son factores fundamentales en el proceso de extracción, ya que pueden tener un impacto significativo en los resultados obtenidos. Se ha observado que existen diferencias sustanciales, llegando a ser el doble o incluso el triple, entre las técnicas de extracción utilizadas. Este hallazgo sugiere que la técnica de extracción por solvente acelerado (ASE), bajo las condiciones de temperatura y presión controladas, presenta una menor viscosidad del solvente, lo que facilita la difusión de los compuestos polifenólicos desde la matriz celular hacia el solvente. Esta menor viscosidad del solvente en ASE permite una mayor eficiencia en la extracción de los compuestos antioxidantes.

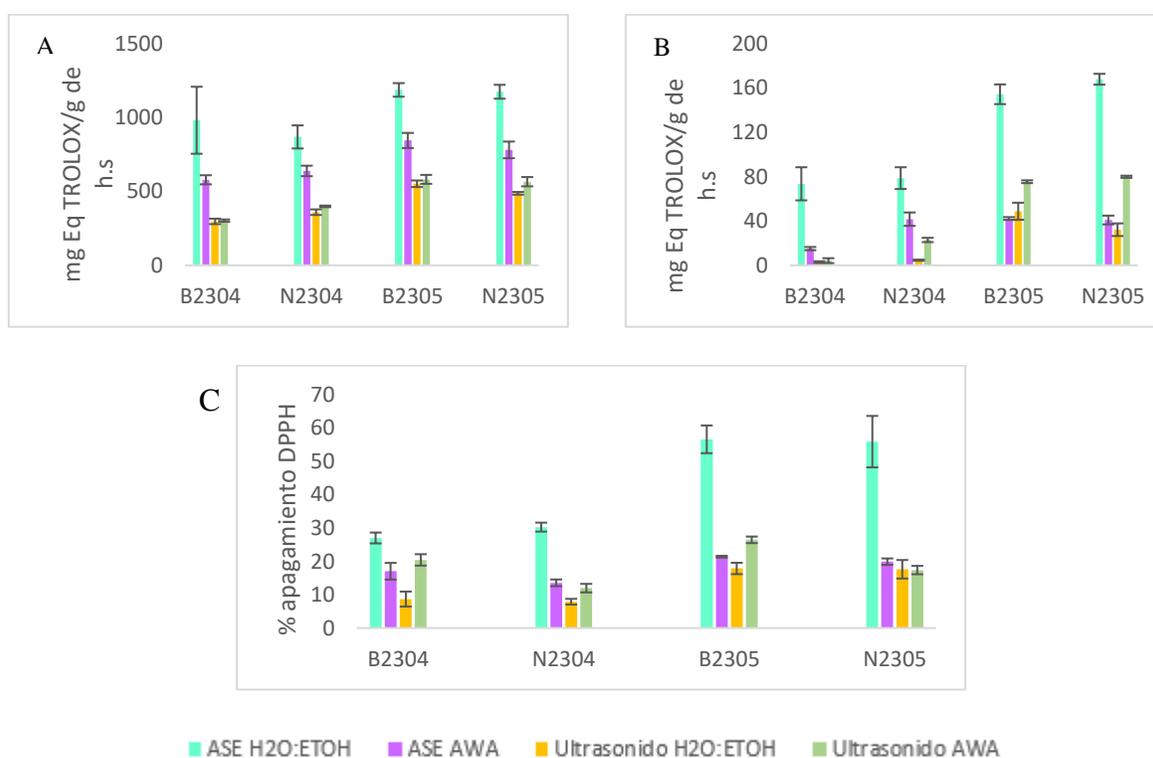
Además, la elección del solvente adecuado también desempeña un papel crucial en la eficacia de la extracción. En este sentido, la mezcla  $\text{H}_2\text{O}:\text{ETOH}$  en una proporción de 55%:45% se ha demostrado ser más efectiva en comparación con el solvente acetona/agua/ácido acético (AWA) en una proporción de 70.0/29.5/0.5 % v/v. La polaridad del solvente utilizado en la técnica ASE permite una mejor interacción con los compuestos polifenólicos, lo que facilita su extracción y contribuye a la obtención de mejores rendimientos. Además, el efecto de cavitación en la extracción asistida con ultrasonido puede generar altas temperaturas, lo que puede resultar en la degradación de los compuestos deseados.

Se puede decir que la extracción ASE es más eficiente que la extracción por ultrasonido, demostrándose en los ensayos de CA (ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH), en el contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu), y en la caracterización del perfil fenólico para ácido cafeico, no así para el ácido rosmarínico, siendo este último el único ensayo que a pesar de mostrar mayores valores para la extracción ASE, no existen diferencias significativas entre las técnicas.

## 6.6 Comparación entre la extracción ASE con solvente AWA y la extracción asistida por ultrasonido con solvente 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH.

### 6.6.1 Determinación de la capacidad antioxidante por los ensayos ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH.

Finalmente para concluir la efectividad de la técnica de extracción, se realizó la comparación de la extracción asistida con ultrasonido con solvente 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH y la ASE con la mezcla de AWA ; los resultados obtenidos en los ensayos ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH se muestran en la figura 30.



**Fig 30.** Gráfico de resultados de los ensayos ORAC-FL (A), ORAC-PGR (B), y % apagamiento DPPH (C), para la Comparación entre la extracción ASE con solvente AWA y la extracción asistida por ultrasonido con solvente 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH.

Se puede observar que la extracción ASE con 55:45 H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente fue la que obtuvo la mayor capacidad antioxidante en comparación a las otras tres extracciones, siendo estadísticamente significativa esta diferencia ( $p$  value < 0,05).

En la figura 30 se puede ver que los resultados obtenidos mediante la extracción ASE duplican los obtenidos por la extracción asistida por ultrasonido independiente del solvente utilizado.

Por otro lado, en el ensayo ORAC-FL representado en la figura 30.A existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p$  value < 0,05) entre la extracción ASE con 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH y con AWA como solvente, pudiendo decir que la CA aumenta con un solvente más polar, no así entre las extracciones que se realizaron por ultrasonido, ya que no existe una diferencia estadísticamente significativa al utilizar solventes de diferente polaridad ( $p$  value > 0,05).

En el ensayo ORAC-PGR, mostrado en la figura 30.B, se observa que los valores fueron hasta tres veces más en la extracción ASE con 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente en comparación a las otras tres extracciones, esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p$  value < 0,05). En el análisis estadístico, el test de Tukey arrojó dos grupos homogéneos, informando que entre la extracción ASE con AWA, y ambas extracciones por ultrasonido no existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p$  value > 0,05).

Por lo tanto se puede decir que al igual que los resultados obtenidos por ORAC-FL, la temperatura y la polaridad son los factores que influye significativamente en la cantidad de antioxidantes extraídos desde la hoja (ORAC-FL), así como los antioxidantes con mayor reactividad (ORAC-PGR) por medio de la extracción ASE con 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente.

En la figura 30.C se muestra el porcentaje de apagamiento del radical DPPH para la extracción ASE con 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente, donde los valores se duplican en comparación a las otras tres extracciones, existiendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p$  value < 0,05).

En el análisis de múltiples rangos se observan dos grupos homogéneos, informando que entre la extracción ASE con AWA como solvente y las extracciones por ultrasonido no existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p$  value > 0,05).

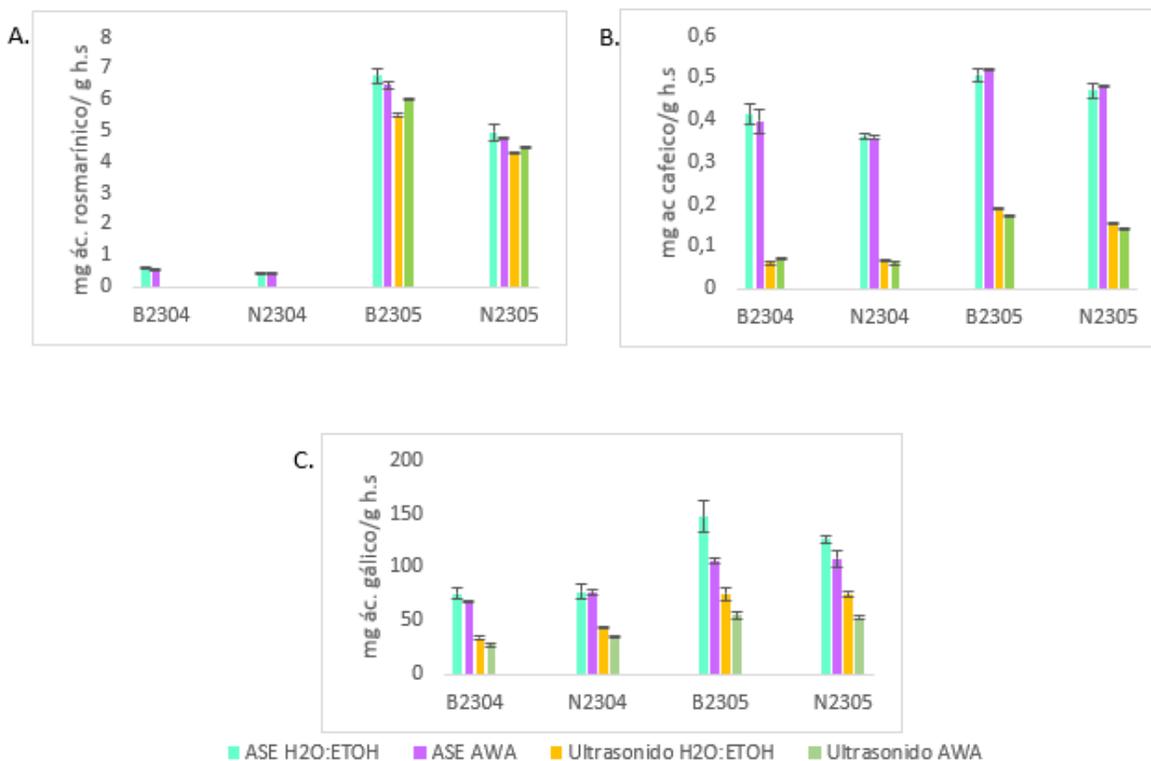
Por otro lado, vemos que se repite la tendencia a obtener mayores resultados en el ensayo ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH en la segunda fecha de muestreo, independiente del tipo de extracción y el solvente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p$  value $<0,05$ ) en la mayoría de los análisis que se realizaron a los cuatro extractos.

El solvente utilizado en la extracción ASE, sometido a las condiciones de temperatura de trabajo, demuestra ser más eficiente en comparación con la extracción asistida por ultrasonido. Esto se debe a que el solvente en la extracción ASE logra una mejor penetración en la matriz vegetal, gracias a la disminución de su viscosidad al aplicar presión y temperatura. La reducción en la viscosidad del solvente facilita la transferencia de masa, lo que resulta en una extracción más rápida y efectiva de los compuestos antioxidantes.

Por otro lado, la extracción asistida por ultrasonido se ve en desventaja debido al efecto de cavitación mencionado anteriormente. La formación de burbujas de vapor y su colapso violento durante la extracción por ultrasonido puede conducir a la degradación de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra. Esta degradación puede ser atribuida al impacto y las condiciones extremas generadas por la cavitación, lo cual afecta negativamente la integridad de los compuestos antioxidantes.

### **6.6.2 Cuantificación e identificación de polifenoles.**

Los datos obtenidos en el ensayo de cuantificación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu se informan en la figura 30.C.



**Fig 31.** Resultados de la cuantificación por HPLC-DAD de ácido rosmarínico (a), ácido cafeico (B), y determinación de polifenoles totales por el ensayo Folin-Ciocalteu (C), para la comparación entre la extracción ASE con solvente AWA y la extracción asistida por ultrasonido con solvente 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH.

Los valores obtenidos de polifenoles totales se encuentran entre 26.57 y 162.82 mg ácido gálico/ g hoja seca, encontrando los más altos valores en las muestras extraídas por el método ASE con 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente previamente optimizada, donde el análisis estadístico realizado indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre técnicas de extracción ( $p$  value < 0,05), no así entre los solventes utilizados. Por lo tanto, nuevamente la temperatura y presión que se logran en la extracción ASE, demuestran ser mucho más eficiente a la hora de cuantificar polifenoles totales mediante este ensayo.

Por otro lado se cuantificaron dos polifenoles característicos en las muestras de hoja de chía, el ácido cafeico y el ácido rosmarínico. En la figura 31.B se observa que la mayor concentración de ácido cafeico se obtuvo en la extracción ASE con 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente, llegando a sextuplicar los resultados que se obtuvieron

en las extracciones por ultrasonido, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de extracción ( $p$  value < 0,05).

Por el contrario, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los solventes 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH y AWA para la extracción ASE, informando que el solvente no es un factor fundamental en los resultados obtenidos para la cuantificación del ácido cafeico, aun así el solvente 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH tiene la ventaja de ser considerado un solvente verde, por lo tanto sería esta la elección más amigable con el medio ambiente posible.

El hecho de que se haya obtenido una mayor cantidad de ácido cafeico en los extractos optimizados mediante extracción con solvente acelerado, se puede deber a que en esta técnica de extracción permite trabajar con temperaturas (115°C optimizada) y tiempos más cortos por ciclo estático (17 min), y una presión constante de 1500 psi, lo que puede favorecer la extracción de compuestos termolábiles como el ácido cafeico, ya que el aumento de la temperatura permite que el solvente mejore su fluidez y la capacidad de penetración en la matriz vegetal, aumentando la velocidad de transferencia de masa. Además, se evidencia que la extracción de la molécula de ácido cafeico se ve favorecida por solventes más polares, lo que explica por qué se extrajo en mayor cantidad en los extractos optimizados con una composición mayor de H<sub>2</sub>O en el solvente.

En paralelo se cuantificó el ácido rosmarínico, representado en la figura 31.A, donde los valores obtenidos indican que la extracción ASE con 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente, fue la que obtuvo una mayor concentración de este polifenol, encontrando valores entre 0,38 y 6,89 mg de ácido rosmarínico/ g hoja seca. Sin embargo esta diferencia con respecto a las otras tres extracciones no es estadísticamente significativa ( $p$  value > 0,05). Por lo tanto, las cuatro extracciones tendrían la misma eficiencia a la hora de extraer ácido rosmarínico desde hojas de chia, no obstante, cabe destacar que se logró cuantificar este polifenol por medio de la extracción ASE en el primer muestreo a diferencia de las otras extracciones, donde la concentración

quedó por debajo del límite de detección, independiente al solvente que se utilizara para la extracción por ultrasonido.

Por otro lado, el ácido rosmarínico, aunque también es un compuesto fenólico, no se vio afectado significativamente por la técnica de extracción utilizada. En este caso, ambos métodos de extracción (ASE y ultrasonido) extrajeron cantidades similares de ácido rosmarínico, lo que sugiere que esta molécula puede ser más estable a altas temperaturas para el caso del ultrasonido y menos sensible a la polaridad del solvente utilizado en la extracción.

En conclusión, la diferencia en la cantidad de ácido cafeico extraído con las dos técnicas de extracción (ASE y ultrasonido) puede explicarse por la combinación de varios factores, como la temperatura, el tiempo y la polaridad del solvente. Por otro lado, el ácido rosmarínico no parece ser tan sensible a estos factores y su extracción no se ve afectada significativamente por la técnica de extracción utilizada.

Por lo tanto, los resultados obtenidos por el ensayo Folin-Ciocalteu, la cuantificación de ácido cafeico y la de ácido rosmarínico, presentan la misma tendencia en las cuatro extracciones, siendo la segunda fecha de muestreo donde se logra extraer la mayor cantidad de polifenoles, como lo son el ácido cafeico y el ácido rosmarínico.

Finalmente se puede mencionar que la extracción ASE utilizando 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH como solvente fue la más eficiente, demostrando que existen diferencias estadísticamente significativas al evaluar por los ensayos ORAC-FL, ORAC-PGR, DPPH, Folin-Ciocalteu, y la cuantificación de ácido cafeico, evidenciando que la temperatura y presión a la que es sometida la muestra en la extracción ASE aumenta considerablemente la eficiencia de extracción, logrando aumentar la velocidad de difusión de los antioxidantes de la matriz vegetal al solvente, disminuyendo la viscosidad de este, para así lograr una mejor extracción. Por otro lado, la baja CA que arrojan las muestras sometidas a la extracción asistida por ultrasonido en comparación a la extracción ASE se puede atribuir al fenómeno de cavitación que

ocurre en el proceso de ultrasonido, el cual podría llegar a degradar cierto porcentaje de los antioxidantes.

A pesar de que los ensayos ORAC-PGR, Folin-Ciocalteu y en la cuantificación de cafeico no existe diferencia estadísticamente significativa entre los solventes utilizados en la extracción ASE (55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH y AWA), se puede decir que la opción más amigable con el medio ambiente es la mezcla 55%:45% H<sub>2</sub>O:ETOH, ya que estos solventes son considerados verdes.

## **7. Conclusiones**

En conclusión, de acuerdo a la extracción fue posible la optimización por medio de un método multivariable, donde la temperatura fue un factor estadísticamente significativo en la respuesta, confirmando que a la temperatura más alta evaluada (115°C) existe una mejor eficiencia de extracción de los antioxidantes, sin evidenciar descomposición térmica aparente de los compuestos polifenólicos.

Por otro lado, la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos optimizados de dos fenotipos de *Salvia hispánica* L. en diferentes etapas de crecimiento mediante ORAC-FL, ORAC-PGR y DPPH y la determinación de polifenoles totales mediante el ensayo Folin-Ciocalteu es una estrategia valiosa para determinar las variaciones en la actividad antioxidante de la planta y obtener extractos con propiedades antioxidantes específicas.

La caracterización del perfil fenólico de los extractos optimizados de dos fenotipos de *Salvia hispánica* L. en diferentes etapas de crecimiento mediante HPLC-DAD es una herramienta importante para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos y su posible relación con la actividad antioxidante, como lo fue el ácido cafeico y el ácido rosmarínico en esta investigación.

Y finalmente la comparación entre la extracción asistida con ultrasonido previamente optimizada y la extracción con solvente acelerado optimizada, indica que la segunda

es una estrategia más efectiva para obtener extractos ricos en compuestos antioxidantes, lo que puede tener importantes implicaciones en la industria, en términos de eficiencia y calidad de los productos obtenidos. Aun así, cabe destacar que ambas técnicas presentan la misma tendencia en todos los análisis, concluyendo que la segunda fecha de demostración es donde se obtuvieron mayores cantidades de compuestos con capacidad antioxidante, polifenoles totales, y concentración de ácido cafeico y ácido rosmarínico, información relevante para tener presente al momento de la plantación de la Salvia Hispánica L con un doble propósito, cosecha de semillas y área foliar.

## 8. Bibliografía

- Ahmed, M., Ting, I. P., & Scora, R. W. (1994). Leaf oil composition of *Salvia hispanica* L. from three geographical areas. *Journal of Essential Oil Research*, 6, 223-228.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Amato, M., Caruso, M. C., Guzzo, F., Galgano, F., Commisso, M., Bochicchio, R., . . . Favati, F. (2015). Nutritional quality of seeds and leaf metabolites of Chia. *European Food Research and Technology*, 241, 615–625.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127(2), 183-198.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34, 1366–1371.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2006). La importancia de los ácidos grasos omega 3. En R. Ayerza, & W. Coates, *Chía: Redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas* (pág. 205). Buenos Aires: Editorial del nuevo extremo.

- Baginsky, C., Arenas, J., Escobar, H., Garrido, M., Valero, N., Tello, D., . . . Silva, H. (2016). Growth and yield of chia (*Salvia hispanica* L.) in the mediterranean and desert climates of Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(3), 255-264.
- Benexia. (2018). *Benexia Advanced seed cultivation*. Recuperado el 18 de Abril de 2018, de <http://www.benexia.com/ingredients-applications/food-applications/xia-oil/>
- Blasco, C. (2011). Capítulo 7: Fibra. En J. M. Soriano del Castillo, *Nutrición básica humana* (págs. 139-150). Valencia: Universitat de València.
- Boveris, A., & Repetto, M. G. (2016). Mitochondria are the main cellular source of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and oxidative stress. En R. J. Gelpi, A. Boveris, & J. J. Poderoso, *Biochemistry of oxidative stress* (pág. 454). Switzerland: Springer.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., . . . Muday, G. K. (2001). Flavonoids Act as Negative Regulators of Auxin Transport in Vivo in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126(2), 524-535.
- Cahill, J. P. (2003). Ethnobotany of Chia, *Salvia hispanica* L (Lamiaceae). *Economic Botany*, 57(4), 604 - 618.
- Cahill, J. P. (2004). Genetic diversity among varieties of Chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 773–781.
- Calvo B, S., Gómez C, C., Royo B, M., López N, C., , , & . (2012). *Nutrición, salud y alimentos funcionales*. Madrid: UNED.
- Campo, C., dos Santos, P., Haas, T., Paese, K., Stanisçuaski, S., de Oliveira, A., & Hickmann, S. (2017). Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 234, 1-9.

- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 749–760.
- Coronado Herrera, M., Vega, S., Gutiérrez Tolentino, R., García Fernández, B., Díaz González, G., & . (2006). Los Ácidos grasos Omega-3 y Omega-6: Nutrición, Bioquímica y Salud. *Revista de Educación Bioquímica*, 25(3), 72-79.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of mass Spectrometry*, 39, 1-15.
- da Silva Marineli, R., Aguiar Moraes, E., Alves Lenquiste, S., Teixeira Godoy, A., Nogueira Eberlin, M., & Maróstica, M. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia. *LWT - Food Science and Technology*, 59(Issue 2 Part 2), 1304-1310.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Di Sapio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., & Severin, C. (2012). Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, Fruto y Semilla. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 11(3), 249-268.
- Doane-Weideman, T., & Liescheskii, P. B. (2004). Analytical Supercritical Fluid Extraction for Food Applications. En D. L. Luthria, *Oil extraction and analysis: Critical Issues and Comparative Studies* (págs. 69-99). Illinois: The American Oil Chemists Society.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 23–30.

- Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., & Nindo, C. (2013). Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1316-1323.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1998). *Free Radicals in Biology and Medicine* (3 ed.). Oxford: Oxford Science Publications.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. R. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- INTA. (25 de Febrero de 2018). *portalantioxidantes*. Obtenido de portalantioxidantes: <http://www.portalantioxidantes.com/base-de-datos-de-antioxidantes/>
- INTA. (25 de Septiembre de 2018). *portalantioxidantes*. Obtenido de portalantioxidantes: <http://www.portalantioxidantes.com/base-de-datos-de-antioxidantes/>
- Jamboonsri, W., Phillips, T. D., Geneve, R. L., Cahill, J. P., Hildebrand, D. F., , & . (2012). Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L- a new omega-3 source. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 171–178.
- Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R., Mutikainen, P., Walls, M., Ovaska, J., & Vapaavuori, E. (1999). Trade-offs in phenolic metabolism of Silver Birch: Effects of fertilization, defoliation and genotype. *Ecological Society of America*, 80(6), 1970–1986.
- Kleinwächter, M., & Selmar, D. (2013). Influencing the Product Quality by Applying Drought Stress During the Cultivation of Medicinal Plants. En P. Ahmad, & M. R. Wani, *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment* (Vol. 1, págs. 57-74). Londres: Springer.
- Lluva, M. (2019). MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN VINO. *Facultad de farmacia, Universidad Complutense*.

- López-Alarcón, C., & Lissi, E. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pirogallol Red with peroxy radicals. *Free Radical Research*, 40(9), 979-985.
- López-Alarcón, C., Ortiz, R., Benavides, J., Mura, E., & Lissi, E. (2011). Use of the ORAC-Pyrogallol red/ORAC-Fluorescein ratio to assess the quality of antioxidants in Chilean wines. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53(3), 764-767.
- Luthria, D., Vinjamoori, D., Noel, K., & Ezzell, J. (2004). Accelerated Solvent Extraction. En D. L. Luthria, *Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Competitive Studies* (págs. 25-38). Illinois: The American Oil Chemists Society.
- Mahsa Kiani, N. R. (2020). High-gravity-assisted green synthesis of palladium nanoparticles: the flowering of nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*.
- Maliqueo, C. (2018). *Determinación de la Capacidad Antioxidante de dos genotipos de Salvia hispanica L. sometidos a distintos niveles de estrés hídrico*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago: Memoria para optar al grado de Magíster.
- Marín Gómez, M. C., & Ballesteros, M. (2010). Espectrometría de masas y análisis. En F. Ortega Ortiz de Apódoca, *Biomarcadores: analítica, diagnóstico y terapéutica* (págs. 113-168). España: Real Academia Nacional de Farmacia.
- Martínez Cruz, O., & Paredes López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica L.*) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1346, 43-48.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.

- Mora, R. (2002). Radicales Libres y Antioxidantes. En R. Mora, *Soporte nutricional especial* (págs. 122-127). Bogotá: Editorial Médica Panamericana.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Peiretti, P. G., & Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology*(148), 267-275.
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., & Koundouras, S. (2012). Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea euroaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 1-11.
- Poblete, A., López-Alarcón, C., Lissi, E., & Campos, A. M. (2009). Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) values of herbal teas obtained with different methodologies can provide complementary data. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(2), 154-157.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513-523.
- Reyes Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, 656–663.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933-956.

- Rizzi, A. (2011). Retention and Selectivity. En E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmaker, & N. Miller, *Handbook of HPLC* (págs. 1-54). New York: CRC.
- Sánchez, J. C., Benavides, J., Basilio, J., Cisneros, L., & Jacobo, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revised: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.
- Scordino, M., & Sabatino, L. (2014). Characterization of polyphenolic profile of citrus fruit by HPLC/PDA/ESI/MS-MS. En R. Watson, *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation* (págs. 187-199). Londres: Elsevier.
- Selmar, D., & Kleinwächter, M. (2013). Stress enhances the synthesis of secondary plant products: The impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant and Cell physiology*, 54(6), 817–82.
- Silva, H., Arriagada, C., Campos, S., Baginsky, C., Castellaro, G., & Morales, L. (2018). Effect of sowing date and water availability on growth of plants of chia (*Salvia hispanica* L) established in Chile. *PLoS ONE*, 13(9), 1-20.
- Soto, C. (2015). *Determinación de la capacidad antioxidante de las espigas de la planta de chíá*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago: Memoria para optar al título de Químico.
- Vijay, R., Sharmila, K. P., Suchetha Kumari, N., Pushpalatha, K. C., , & . (2014). In vitro evaluation of phytochemical and antioxidant of aqueous seed extract of *Salvia hispanica* L. (Chia). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 776-789.
- Villaño, D., Fernández, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic. *Talanta*, 71(1), 230-235.
- Wang, S. Y., & Lin, H. (2000). Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry and Strawberry Varies with Cultivar and Development Stage. *Journal of Agricultural Chemistry*, 48(2), 140-146.

Williams, R. J., Spencer, J. P., & Rice-Evans, C. (2004). FLAVONOIDS: ANTIOXIDANTS OR SIGNALLING MOLECULES? *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7), 838 – 849.

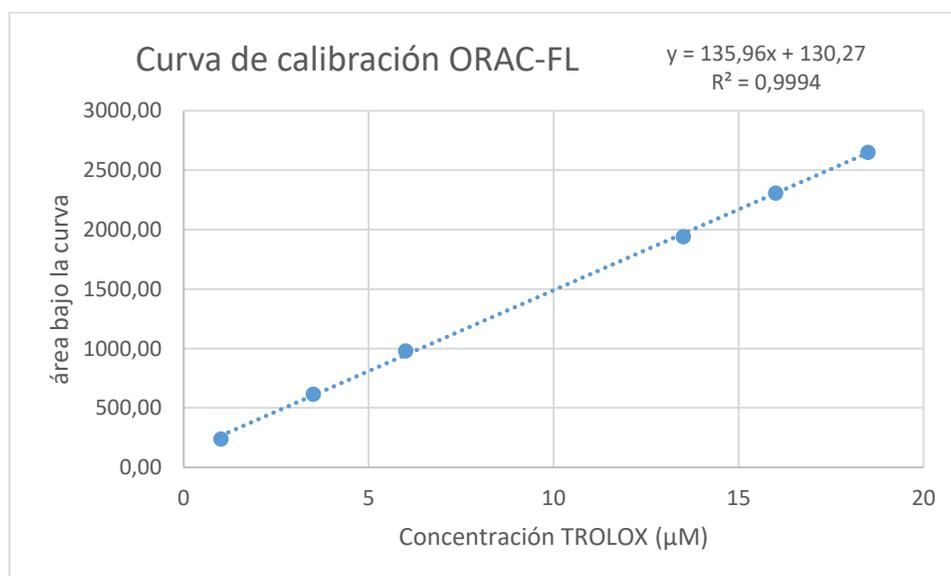
Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485-493.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026-4037.

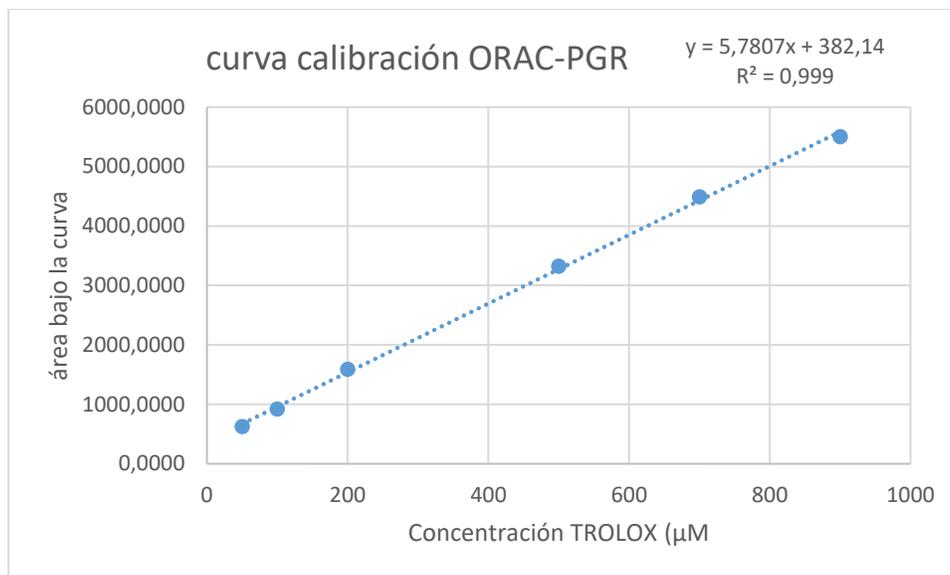
Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Beecher, G., & Prior, R. L. (2004). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 407-422.

## 9. Anexos

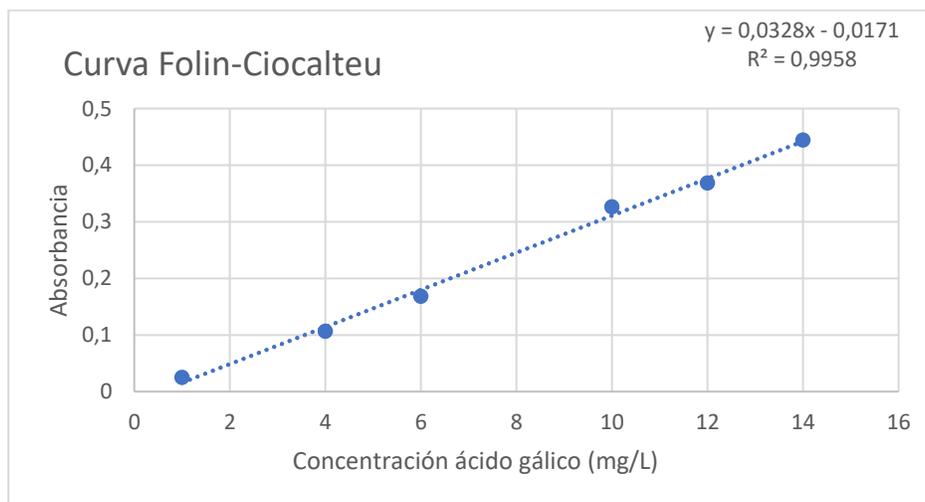
### Anexo 1: Curva de calibración ORAC-FL



**Anexo 2: Curva de calibración ORAC-PGR**



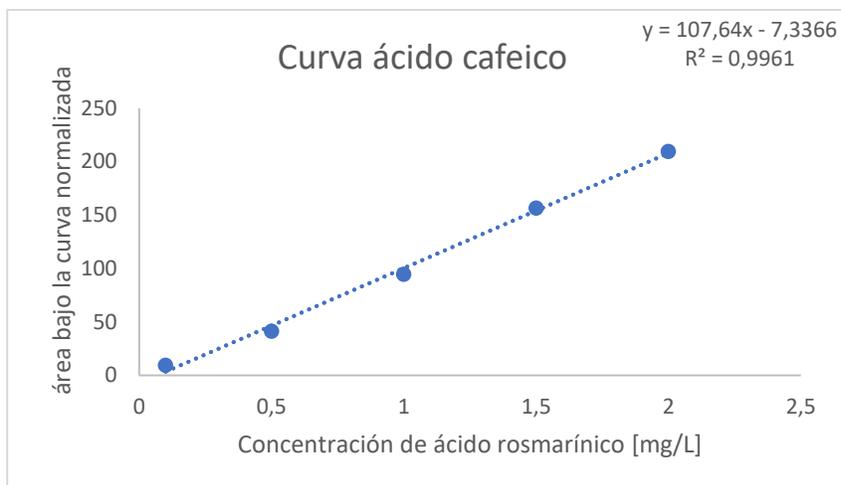
**Anexo 3: Curva de calibración Folin-Ciocalteu**



**Anexo 4:** *Tabla gradiente de fase móvil utilizado para la determinación del perfil fenólico de los extractos de hoja de chía.*

Tiempo [min]	%A	%B	%C	%D	Flujo [mL/min]	Presión [bar]
0	8	92	0	0	1	50
2	9	91	0	0	1	50
4	10,2	89,8	0	0	1	50
6	11,2	88,8	0	0	1	50
8	12,5	87,5	0	0	1	50
10	13,5	86,5	0	0	1	50
12	14,8	85,2	0	0	1	50
14	15,9	84,1	0	0	1	50
16	17	83	0	0	1	50
18	18,2	81,8	0	0	1	50
20	19,1	80,9	0	0	1	50
23	25	75	0	0	1	50
25	30	70	0	0	1	50
28	35	65	0	0	1	50
30	38	62	0	0	1	50
37	70	30	0	0	1	50
38	8	92	0	0	1	50

**Anexo 5:** *Curva de calibración de ácido cafeico para la caracterización del perfil fenólico por HPLC-DAD*



**Anexo 6:** Curva de calibración de ácido rosmarínico para la caracterización del perfil fenólico por HPLC-DAD

