

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Evaluación de la capacidad antioxidante global in vitro y determinación de compuestos bioactivos de hojas de *Salvia hispanica* L y su efecto sobre modelo de ratón obeso”

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Química área de Especialización en Productos Naturales por:

GABRIELA PAULINA MATURANA ÁLVAREZ

Directores de Tesis: Dr. Claudio Alberto Olea Azar.

Dra. María Carolina Zúñiga López.

Santiago, Chile

Diciembre 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

GABRIELA PAULINA MATURANA ÁLVAREZ

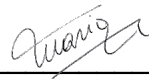
Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, Área de Especialización: Productos Naturales, en el examen público rendido el día:

Directores de Tesis:

Dr. Claudio Alberto Olea Azar



Dra. María Carolina Zúñiga López



Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Carlos Areche (Presidente)



Dra. Tatiana Garrido



Dra. Brenda Modak



Dra. Paz Roberts



“La carrera científica lleva muchísimo tiempo (...). El tránsito entre ambas etapas, entre hacer lo que nos dicen y decir nosotros qué debe hacerse, sucede, por lo general, cuando se está a mitad de camino de la realización de la tesis. Esta se convierte, en varios sentidos, en lo más difícil y aterrador que un estudiante puede hacer”

La memoria secreta de las hojas. Una historia de árboles, ciencia y amor.

Hope Jahren

Agradecimientos

Es curioso cómo cambia la forma de entender la vida con los años. Comencé este proceso el año 2019, año que conocí mi límite personal de la única forma en la que se puede conocer: al cayo y sin tapujos. Para bien o para mal, a finales de ese año se produjo la pandemia de COVID-19, periodo en el que entendí muchas cosas sobre mí y mi interacción con el mundo que me rodea.

Con estas palabras quisiera agradecer a las personas que han estado en mi vida y que me han apoyado tanto en lo personal como en lo profesional. Agradezco a mis padres, sobre todo por las conversaciones maduras que hemos logrado entablar este último año, por su paciencia y cariño incondicional. A mis hermanos, por su presencia en mi vida, que me hace divagar las preguntas importantes y apreciar de manera distinta los mismos hechos. Los amo mucho.

A mis directores de tesis Dr. Claudio Olea y Dra. María Carolina Zúñiga por sus palabras de aliento, comentarios constructivos y sabiduría. Por su ayuda cuando tuve un problema, por sus consejos y su cariño, son personas a las que quiero y admiro mucho. A mis compañeros de laboratorio, en especial a la Sandy y al Gabo que llenaron mis días de risas y buena compañía, conocerlos fue una sorpresa muy agradable. A Josué por su apoyo y compañía, aunque a veces me sacas de quicio. A la Ale por convertirse en el apoyo que necesitaba en muchos momentos de estrés y caos personal, por su comprensión, sus palabras y la torta candidato a doctor xD.

A mis amigas del alma Sasa, Naty y Maca por mantenerse ahí a pesar de todos los berrinches, locuras y desquicios. Por conocerme más que nadie, quererme de todas formas y tener las ganas de seguir ahí.

Abreviaturas

%APA: Porcentaje de apagamiento	DC: Dieta control
%CAA: Porcentaje de capacidad antioxidante celular	DDA: Adquisición dependiente de los datos
ΔF : Diferencia en la fluorescencia	DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ΔFAH : Diferencia en la fluorescencia en presencia de un antioxidante	EAG: Equivalente de ácido gálico
AAPH: 2,2'-Azobis-(2-aminodinopropano)	EAU: Extracción asistida con ultrasonido
ABC: Área bajo la curva	EAE: Extracto realizado con acetato de etilo
ACCDIS: Centro avanzado de enfermedades crónicas	EDCM: Extracto realizado con dicloro metano
ADN: Ácido desoxiribonucleico	EHEX: Extracto realizado con hexano
AC: Ácido cafeico	EET: Extracto realizado con etanol
ACLO: Ácido clorogénico	EAE-B: Extracto realizado con acetato de etilo del fenotipo blanca
APCUM: Ácido p-cumarico	EDCM-B: Extracto realizado con dicloro metano del fenotipo blanca
API: Apigenina	EHEX-B: Extracto realizado con hexano del fenotipo blanca
AR: Ácido rosmarinico	EET-B: Extracto realizado con etanol del fenotipo blanca
ANOVA: Test estadístico de análisis de varianza	EAE-N: Extracto realizado con acetato de etilo del fenotipo negra
ATP: Adenosín tri fosfato	EDCM-N: Extracto realizado con dicloro metano del fenotipo negra
AWA: Extractante Acetona/Agua/Ácido acético	EHEX-N: Extracto realizado con hexano del fenotipo negra
BC: Balonamiento celular	EET-N: Extracto realizado con etanol del fenotipo negra
CA: Capacidad antioxidante	ERO: Especies reactivas de oxígeno
CAA: Capacidad antioxidante celular	ESA: Extracción con solvente acelerado
CAC: Contenido de ácido cafeico	ESP: Extracción con solvente presurizado
CAPI: Contenido de apigenina	e.s.: Extracto seco
CAR: Contenido de ácido rosmarinico	ET: Mecanismo antioxidante por transferencia de electrones
CFT: Contenido fenólico total	eq. Trolox: Equivalentes de trolox
CICUA: Centro Institucional de Cuidado y Uso Animal	DCFH ₂ : Di hidro dicloro fluoresceína
DAD: Detector de arreglo de diodos	DCF: Dicloro fluoresceína
DAG: Dieta alta en grasas	FA: Fosfatasa alcalina
DAG-EB: Dieta alta en grasa, suplementado con extracto del fenotipo blanca	
DAG-EN: Dieta alta en grasa, suplementado con extracto del fenotipo negra	

FC: Ensayo de Folin-Ciocalteu

FL: Fluoresceína

FLD: Detector de fluorescencia

FRAP: Potencial antioxidante de reducción de hierro

GL: Gotas lipídicas

GLUT-4: Transportador de glucosa tipo 4

GOT: Transaminasa glutámico-oxalacético

GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación

HAT: Mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno

HESI: Ionización por electroespray en caliente

HN: Hepatocito normal

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución

h.s.: Hoja seca

HOMA-IR: Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina

IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir el 50% del efecto

INTA: Instituto Nacional de Tecnología de los Alimentos

IT: Tiempo de inyección

MCPIO: atrapador de espín 2-(2-Carboxietil)-2-metil-4-fenil-2H-imidazol-1-óxido

MS: Espectrometría de masas

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NCE: energía de colisión normalizada

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORAC: Capacidad de absorción de radicales oxígeno

ORAC-EPR: Capacidad de absorción de radicales oxígeno, utilizando espectrometría de resonancia de espín como técnica de detección

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

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

PBS: Buffer fosfato salino

PGR: Pirogalol rojo

PL: Peroxidación lipídica

ps: Peso seco

PTGIp: Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SOD: Superóxido dismutasa

TEAC: capacidad antioxidante equivalente a trolox

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

tr: Tiempo de retención

t-BHP: Hidroperóxido de t-butilo

UMA: Unidad de manejo animal

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

UPLC o UHPLC: Cromatografía de ultra alta resolución

UV: Ultravioleta

UV-vis: Espectroscopia UV-visible

REE o EPR: Espectroscopía de resonancia de espín electrónico

RI: Resistencia a la insulina

RL: Radical libre

VC: Vena central

Tabla de contenido

1.	Introducción	1
1.1.	Salvia hispanica L.	1
1.2.	Compuestos fenólicos.....	4
1.2.1.	Capacidad antioxidante (CA) y estrés oxidativo.....	6
1.2.2.	Metodologías para evaluar la CA.....	7
1.3.	Técnicas de extracción	8
1.4.	Identificación y cuantificación de polifenoles.....	10
1.4.1.	Contenido fenólico total.....	10
1.4.2.	Métodos cromatográficos.....	10
1.5.	Obesidad, resistencia a la insulina y daño hepático	12
2.	Hipótesis.....	15
3.	Objetivos.....	15
3.1.	Objetivo general.....	15
3.2.	Objetivos específicos	15
4.	Materiales y métodos.....	16
4.1.	Materiales	16
4.1.1.	Cultivo experimental.....	16
4.1.2.	Reactivos	17
4.2.	Métodos	17
4.2.1.	Preparación de extractos AWA ¡Error! Marcador no definido.	
4.2.2.	Preparación de extractos secuenciales.....	19
4.2.3.	Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayos ORAC	20
4.2.3.1.	ORAC-FL	20
4.2.3.2.	ORAC-PGR	21
4.2.3.3.	ORAC-EPR.....	22
4.2.4.	Determinación de la capacidad antioxidante mediante DPPH	23
4.2.5.	Determinación del contenido fenólico total.....	23
4.2.6.	Determinación del perfil fenólico mediante HPLC-DAD-FLD	24
4.2.7.	Determinación del perfil fenólico mediante espectrometría de masas	26
4.3.	Evaluación biológica <i>in vitro</i>	27

4.3.1.	Capacidad antioxidante celular	27
4.3.2.	Citotoxicidad.....	28
4.4.	Evaluación del efecto en modelo de ratón obeso	29
4.4.1.	Protocolo de mantención y suplementación.....	29
4.4.2.	Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTGIp).....	31
4.4.3.	Determinación de la insulinemia	31
4.4.4.	Determinación del índice HOMA-IR	32
4.4.5.	Efecto de los extractos sobre la reversión del daño hepático y la acumulación de gotas lipídicas en ratones alimentados con DAG.	32
4.4.5.1.	Estudio macroscópico y determinación de parámetros bioquímicos séricos.....	32
4.4.5.2.	Microscopía de gotas lipídicas en tejido hepático.....	32
4.4.5.3.	Análisis del estado de peroxidación lipídica en hepatocitos aislados y cuantificación de gotas lipídicas.....	33
4.5.	Análisis estadístico	33
5.	Resultados y discusión	34
5.1.	Extractos AWA.....	34
5.1.1.	Optimización de la extracción asistida por ultrasonido.....	34
5.1.2.	Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayos ORAC	36
5.1.3.	Determinación de la capacidad antioxidante mediante DPPH	43
5.1.4.	Contenido fenólico total.....	44
5.1.5.	Determinación del perfil fenólico	46
5.1.5.1.	Zona (i): Contenido de ácidos clorogénico, cafeico y p-cumarico	48
5.1.5.2.	Zona (ii): Contenido de ácido rosmarínico	53
5.1.5.3.	Zona (iii): Contenido de apigenina	56
5.2.	Extractos secuenciales	58
5.2.1.	Rendimiento de extracción.....	58
5.2.2.	Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayos ORAC	58
5.2.3.	Determinación de la capacidad antioxidante mediante DPPH	65
5.2.4.	Capacidad antioxidante celular	67
5.2.5.	Determinación del contenido fenólico total.....	69
5.2.6.	Determinación del perfil fenólico	71

5.2.6.1.	Zona (i); contenido de ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido p-cumarico	73
5.2.6.2.	Zona (ii): contenido de ácido rosmarinico	77
5.2.6.3.	Zona (iii): contenido de apigenina	78
5.2.6.4.	Perfil fenólico determinado por espectrometría de masas	79
5.2.7.	Evaluación de la citotoxicidad en célula de mamífero.....	82
5.3.	Efecto sobre modelo de ratón obeso	84
5.3.1.	Efecto sobre la masa corporal, hepática y grasa epididimal	84
5.3.2.	Efecto sobre indicadores de la homeostasis de la glucosa	85
5.3.3.	Reversión del daño hepático.....	89
5.3.3.1.	Análisis macroscópico y parámetros séricos	89
5.3.3.2.	Histología de hepatocitos aislados.....	92
5.3.3.3.	Análisis del estado de peroxidación lipídica.....	95
6.	Conclusiones	102
7.	Referencias	103
8.	Anexos.....	116

Índice de tablas

Tabla 1. Modelo Doehlert utilizado para la optimización de la extracción de compuestos con capacidad antioxidante a partir de hojas de chía.	18
Tabla 2. 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 (λ_m) de cada compuesto además de las longitudes de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) en los casos correspondientes.	25
Tabla 3. Modelo Doehlert utilizado para la optimización de compuestos con capacidad antioxidante desde hojas de chía y respuesta asociada a cada experimento.	35
Tabla 4. Contenido de ácido clorogénico (ACLO) y ácido p-cumárico (APCUM) de los extractos AWA bajo estudio.	51
Tabla 5. Contenido de apigenina (API) de los extractos AWA bajo estudio.	56
Tabla 6. Rendimiento de extracción y masa obtenida para los 8 extractos secuenciales.	58
Tabla 7. Contenido de ACLO en los extractos secuenciales del fenotipo Negra.	75
Tabla 8. Contenido de APCUM en los extractos secuenciales de los fenotipos Negra y Blanca.	76
Tabla 9. Contenido de API en los extractos secuenciales de los fenotipos Negra y Blanca.	79
Tabla 10. Identificación tentativa de compuestos bioactivos en los extractos secuenciales de hojas de chía de los fenotipos de semilla Negra y Blanca.	80
Tabla 11. Masa corporal, del hígado y de la grasa epididimal de todos los grupos de estudio luego del periodo de suplementación.	85
Tabla 12. Consumo diario de polifenoles de los grupos DAG-EB y DAG-EN en función a la masa corporal promedio del grupo experimental.	88
Tabla I. Gradiente de fase móvil utilizado para la determinación del perfil fenólico mediante HPLC-DAD-FLD.	118
Tabla II. Gradiente de fase móvil utilizado para la determinación del perfil fenólico mediante UHPLC-MS.	118

Índice de figuras

Figura 1. Fotografía cultivo experimental de chía.....	1
Figura 2. Estructuras químicas de a) esqueleto básico de los flavonoides C ₆ C ₃ C ₆ ; b) esqueleto básico de algunas subclasificaciones de flavonoides; c) Ácidos fenólicos y d) Ácidos hidroxicinámicos.....	5
Figura 3. Diseño experimental del cultivo de chía realizado y fechas de muestreo.	16
Figura 4. Esquema del proceso de extracción realizado para la extracción secuencial. Este procedimiento se repitió secuencialmente con hexano, dicloro metano, acetato de etilo y etanol para los dos fenotipos comerciales (negra y blanca).....	19
Figura 5. Protocolo de alimentación y suplementación. DN: dieta normal; DAG: dieta alta en grasa; EET-B: Extracto etanólico de hojas de chía blanca; EE-N: Extracto Etanólico de hojas de chía negra; DAG-EN: grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B (n=6 para cada grupo).....	30
Figura 6. Superficie de respuesta obtenida al realizar los experimentos según el modelo Doehlert estipulado en la Tabla 3.....	36
Figura 7. Diagrama de Pareto obtenido para el modelo Doehlert estipulado en la Tabla 3.	36
Figura 8. Capacidad antioxidante de los extractos AWA determinada por ORAC-FL en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre los datos.....	37
Figura 9. Comparación entre la CA determinada por ORAC-FL en el segundo muestreo para los seis fenotipos en estudio y datos disponibles en la base de datos del INTA para algunas frutas y hortalizas.....	40
Figura 10. Capacidad antioxidante de los extractos globales determinada por ORAC-PGR en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre los datos.....	41
Figura 11. Capacidad antioxidante de los extractos globales determinada por DPPH en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).....	43
Figura 12. Contenido polifenólico total los extractos AWA determinado mediante Folin-C en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).....	45
Figura 13. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo Negro a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).	47
Figura 14. Contenido de ácido cafeico de los extractos AWA determinada por HPLC-DAD en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).....	48

Figura 15. Contenido de ácido rosmarinico de los extractos AWA determinada por HPLC-DAD en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....	54
Figura 16. CA determinada por ORAC-FL para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CA en función a la masa de extracto seco; b) CA en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....	60
Figura 17. CA determinada por ORAC-PGR para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CA en función a la masa de extracto seco; b) CA en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....	61
Figura 18. Espectros de EPR registrados utilizando MCPIO como atrapador para un blanco experimental (negro) y el EET-N (rojo).....	64
Figura 19. % de apagamiento del radical alcoxilo calculado utilizando la ecuación 1. a) CA en función de la masa de extracto; b) CA en función de la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0,05$).	65
Figura 20. % de apagamiento del radical DPPH calculado utilizando la ecuación 1. a) CA en función de la masa de extracto; b) CA en función de la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0,05$).	66
Figura 21. Capacidad antioxidante celular (%CAA) evaluada en células VERO de a) EET; b) EAE; c) EDCM y d) EHEX.	68
Figura 22. CFT determinado por Folin-C para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CFT en función a la masa de extracto seco; b) CFT en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	70
Figura 23. Cromatogramas registrados a 278 nm para los 4 extractos secuenciales (EET, EAE, EDCM y EHEX) para el fenotipo blanca donde a) cromatograma completo y b) ampliación de la zona (iii) (22 a 36 min).....	71
Figura 24. Comparación de los cromatogramas registrados a 278 nm para los EET de ambos fenotipos comerciales en estudio, donde a) zona (i); b) zona (ii) y c) zona (iii). EET-N: extracto etanólico del fenotipo negra; EET-B: extracto etanólico del fenotipo blanca. .	72
Figura 25. Contenido de ácido cafeico (CAC) para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CAC en función a la masa de extracto seco; b) CAC en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	74
Figura 26. Contenido de ácido rosmarinico (CAR) para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a)	

CAR en función a la masa de extracto seco; b) CAR en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	77
Figura 27. Citotoxicidad de los 8 extractos secuenciales determinada mediante la metodología MTT sobre células VERO: a) EET-B; b) EET-N; c) EAE-B; d) EAE-N; e) EDCM-B; f) EDCM-N; g) EHEX-B; h) EHEX-N.	83
Figura 28. Parámetros asociados con la homeostasis de la glucosa, donde a) curvas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTGIp), b) áreas bajo la curva de tolerancia a la glucosa, c) insulina plasmática en ayunas y d) índice HOMA-IR calculado a partir de la ecuación (2). * diferencia significativa con $p < 0,05$. *** diferencia significativa con $p < 0,001$. **** diferencia significativa con $p < 0,0001$. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).	86
Figura 29. Fotografías de hígados representativos de a) grupo DN; b) grupo DAG; c) grupo DAG-EN y d) grupo DAG-EB. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).	90
Figura 30. Perfil hepático. Concentración en suero de a) transaminasa glutámico-oxalacético (GOT), b) transaminasa glutámico-pirúvico (GPT) y c) fosfatasa alcalina (FA) para todos los grupos en estudio. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).	91
Figura 31. Imágenes microscópicas de la histología de hígados representativos de cada grupo en estudio. De izquierda a derecha aumentos de 10x, 40x y 100x. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).	93
Figura 32. Puntaje calculado para estimar el daño hepático según la escala de Liang y col. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).	94
Figura 33. Imágenes representativas registradas con microscopio confocal que ilustran los niveles de PL en GL de hepatocitos aislados de cada grupo alimentado con DAG. Azul: núcleos de los hepatocitos, marcados con DAPI; rojo: BODIPY no oxidado; verde: BODIPY oxidado. DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).	97
Figura 34. a) Número de gotas lipídicas por núcleo para cada grupo y b) porcentaje de PL para cada grupo alimentado con DAG. ** diferencia significativa con $p < 0,01$. *** diferencia significativa con $p < 0,001$. **** diferencia significativa con $p < 0,0001$. DN: dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).	98

Figura 35. Resumen de los principales resultados referentes a la variación fenotípica y temporal de la CA y el contenido de polifenoles.....	100
Figura 36. Resumen de los principales resultados referentes a la CA y el contenido de polifenoles de los extractos secuenciales realizados con los fenotipos negra y blanca..	101
Figura 37. Resumen de los principales resultados referentes la reversión del daño casado por una dieta alta en grasas (DAG) debida a la suplementación de los extractos etanólicos de ambos fenotipos comerciales.....	101
Figura I. Esqueletos básicos de los flavonoides	116
Figura II. Ruta simplificada de biosíntesis de polifenoles.....	116
Figura III. Curva normalizada de decaimiento de la fluorescencia para el extracto AWA del fenotipo negra en el segundo muestreo	117
Figura IV. Curva normalizada de decaimiento de la absorbancia para el extracto AWA del fenotipo negra en el segundo muestreo	117
Figura V. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo Blanca a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).	119
Figura VI. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo Tardía a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).	119
Figura VII. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo Pinta a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).	120
Figura VIII. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo P2N54 a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).	120
Figura IX. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo B54 a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).	121
Figura X. Cromatogramas registrados a 278 nm para los 4 extractos secuenciales (EET, EAE, EDCM y EHEX) para el fenotipo negra donde a) cromatograma completo y b) ampliación de la zona (iii) (22 a 36 min).....	121
Figura XI. Estructuras químicas de los compuestos identificados mediante espectrometría de masas en los extractos secuenciales de hojas de chía.	122

Resumen

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae originaria de la zona Mesoamericana (México y Guatemala). Los pueblos precolombinos de la zona no solo utilizaban sus semillas como alimento energizante si no que las hojas y raíces las utilizaban con fines medicinales. La colonización española de la zona resultó en la pérdida de las variedades domesticadas de esta especie, así como de la información folklórica de su uso medicinal. Actualmente su cultivo se centra en la producción de su semilla, que presenta una alta calidad nutricional, especialmente debido a su alto contenido de ácidos grasos ω -3. Sin embargo, durante el cultivo se estarían desechando cerca de 500 kg de hoja de chía por hectárea, lo que representa un nicho comercial no explorado como fuente de compuestos bioactivos.

Los polifenoles son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas conocidos principalmente por su capacidad antioxidante, que presentan actividad biológica como antiviral, antiinflamatoria, antibacteriana, reguladora del metabolismo de la glucosa, antitumoral entre otras, por lo que su uso en tratamientos medicinales está siendo investigado. Estos compuestos también presentan actividad importante en el metabolismo de las plantas, principalmente como medio de respuesta ante estresores y reguladores del crecimiento.

En este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de seis fenotipos de chía en tres muestreos mediante la optimización de la extracción con una mezcla de acetona, agua y ácido acético (AWA; 70:29,5:0,5 %v/v) con el fin de desarrollar una metodología rápida y miniaturizada que permita la comparación con la base de datos que mantiene el Instituto Nacional de Tecnología de los Alimentos en nuestro país. En paralelo se realizó la caracterización química de extractos secuenciales de dos fenotipos comerciales y se comparó con la metodología optimizada. Adicionalmente, se evaluó la toxicidad de los extractos obtenidos y su capacidad antioxidante celular. Finalmente, se evaluó el efecto de los extractos etanólicos de ambos fenotipos comerciales en la reversión de los indicadores de resistencia a la insulina y de daño hepático en un modelo de ratón obeso alimentado con dieta alta en grasas.

Los resultados muestran que tanto la capacidad antioxidante como el contenido fenólico muestran un máximo cuando la planta se encuentra en etapa de floración, y ambos factores disminuyen hacia fechas cercanas a la cosecha de las semillas. El fenotipo que presentó

mayor capacidad antioxidante y contenido polifenólico resultó ser el tardío, seguido de los dos fenotipos comerciales.

Para servir al doble propósito del cultivo de chíá, las hojas de ambos fenotipos comerciales del tercer muestreo se utilizaron para realizar los extractos secuenciales. El extracto secuencial con mayor capacidad antioxidante tanto química como celular y contenido fenólico fue el etanólico, y ambos factores disminuyeron significativamente junto con la polaridad del solvente utilizado. Ningún fenotipo resultó ser citotóxico en células de mamífero.

Los resultados *in vivo* sobre el modelo de ratón alimentado con dieta alta en grasas muestran una tendencia a la mejoría en cuanto a los parámetros que evalúan la resistencia a la insulina, siendo el extracto del fenotipo blanca el que presentó mejores resultados. En cuanto a la reversión del daño hepático, ambos extractos muestran una disminución importante en el número y tamaño de las gotas lipídicas en hepatocitos aislados, así como en la disminución de la peroxidación lipídica. El extracto etanólico del fenotipo blanca tuvo un efecto significativo en la disminución de estos factores en comparación con el grupo no suplementado.

Summary

Chia (*Salvia hispanica* L.) is a plant belonging to the Lamiceae family original from the Mesoamerican area (México and Gautemala). The precolombian people used this plant not only as a food source (seeds) but also as medicine (leaves and roots). The Spanish colonization led to the loss of the domesticated varieties of this plant, as well as the loss of the folkloric information about its uses in medicinal treatments. Nowadays, chia cultivation is centered in seed production due to its great nutritional value mainly because its high content of ω -3 fatty acids. Nevertheless, about 500 kg/ha of leaves biomass is produced and discarded once the seed is collected, matrix that is jet to be exploited as a commercial opportunity.

Polyphenolic compounds are secondary metabolites synthesized by plants known for their antioxidant capacity that also have biological activity such as antiviral, anti-inflammatory, antibacterial, regulatory of glucose metabolism, antitumoral among many others, which is why polyphenols use in medicinal treatments is being investigated. These compounds also have relevant activity in plants as response mechanism against different stressors and growth regulators.

In this work, the antioxidant capacity and polyphenolic content of six different chia phenotypes in three sampling dates was evaluated after the optimization of the ultrasound assisted extraction methodology using a mixture of acetone, water, and acetic acid (AWA; 70:29.5:0.5 %v/v). This quick and miniaturized methodology was developed as means to enable the comparison with the Insituto Nacional de Tecnología de los Alimentos database in our country. In parallel, the chemical characterization of sequential leaf extracts of two commercial phenotypes was carried out and compared to the optimized AWA extraction, evaluating the extract's chemical and cellular antioxidant capacity as well as the polyphenolic profile and toxicity. Finally, the reversal properties of the ethanolic extracts of both commercial phenotypes on insulin resistance and hepatic damage was studied using a mice obese model fed with a high fat diet.

1. Introducción

1.1. *Salvia hispanica* L.

El género *Salvia* es uno de los más amplios de la familia Lamiaceae e incluye al romero (*Salvia rosmarinus*), a la comúnmente conocida como salvia (*Salvia officinalis*) y a la chía (*Salvia hispanica*) entre otras. Esta última, es una planta procedente de Mesoamérica, específicamente del sur de México y norte de Guatemala (Cahill, 2004; Jamboonsri et al., 2012), y posee tallos ramificados cuadrangulares y puede alcanzar hasta 1,5 m de altura, sus hojas ovaladas simples y opuestas pueden medir entre 8 - 12 cm de largo y entre 4 - 7 cm de ancho. Sus semillas ovoides miden entre 1,5 - 2 mm de longitud y entre 1 - 1,2 mm de ancho y se forman en grupos de 3 ó 4 en cada flor que pueden presentarse en forma axial o terminal (Figura 1) (Di Sapio O. et al., 2012).



Figura 1. Fotografía cultivo experimental de chía.

Los pueblos precolombinos de la zona mesoamericana utilizaban la chía para distintos fines, entre los que se encuentran el alimenticio, el comercial y el medicinal (Cahill, 2004) entre otros. Según los registros de la época precolombina, la semilla se utilizaba como alimento energizante, así como también su aceite se utilizaba para la confección de pinturas. La semilla de chía también se utilizaba como moneda de intercambio y como tributo, de forma que se destinaba una gran cantidad de terreno a su cultivo, de forma que esta semilla mantenía un valor social y comercial en la sociedad maya y tolteca (Cahill, 2003).

Dentro del uso medicinal, se destaca el uso de raíces y hojas para el tratamiento de diversas dolencias que incluyen afecciones al sistema digestivo, ocular y a la piel, entre otras (Cahill, 2003). Con la llegada de los españoles al continente, se prohibió el cultivo de chía, con lo que se perdieron la mayoría de las variedades domesticadas junto con el conocimiento folklórico de su uso medicinal (Cahill, 2003).

Durante las últimas décadas, el cultivo de chía se ha vuelto a impulsar gracias a la gran cantidad de estudios científicos que posicionan a la semilla de chía como una fuente importante de nutrientes, especialmente ácidos grasos omega-3, proteínas, minerales y compuestos bioactivos como polifenoles (Kulczyński et al., 2019; de Falco et al., 2017). Dada su alta calidad nutricional, las investigaciones referentes a aplicaciones de la semilla de chía son diversas, e incluyen no solo estudios sobre la semilla en bruto, sino que también de otros subproductos como el mucílago, harina, aceites y concentrados proteicos (Chen et al., 2021; Elshafie et al., 2018; Grancieri et al., 2021; Melo et al., 2019; Motyka et al., 2023).

A pesar del vasto número de estudios realizados en semilla de chía, hasta la fecha, muy pocos estudios se han realizado en otros órganos de la planta (Amato et al., 2015; Elshafie et al., 2018; Janicsák et al., 2011; Jones, 2016; Nkomo et al., 2019; Zúñiga-López et al., 2021). Considerando que la chía es una planta anual, es decir, muere una vez producido el fruto (semilla), la producción de este ocurre en la etapa final, de forma que es necesario que la planta se desarrolle completamente antes de la floración, produciendo gran cantidad de masa foliar. Según una estimación realizada por Silva y colaboradores, en la fecha de máximo crecimiento vegetativo (122 días después de la siembra), habría cerca de 32 g de masa seca total por planta, si este valor representa el 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 aproximadamente 500 kg de hoja verde por hectárea al año (Herman et al., 2016). Actualmente, esta biomasa se considera como un desecho industrial del cultivo de chía al no presentar valor comercial, de forma que su aprovechamiento como fuente de compuestos bioactivos añadiría un segundo propósito a su cultivo comercial.

1.1.1. Contenido de polifenoles en hojas de *Salvia hispanica* L.

Gracias a la gran cantidad de estudios científicos enfocados en determinar la calidad nutricional de las semillas de chía, su composición química se conoce con detalle, no solo en cuanto a su contenido de aceites y proteínas, sino que también en cuanto a su contenido de metales y metabolitos secundarios. Dentro de los polifenoles que se ha logrado identificar en esta matriz se encuentran flavonoides como la catequina, la quercetina, el kaempferol y ácidos cinámicos como el ácido clorogénico y el cafeico (Amato et al., 2015; Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014; Reyes-Caudillo et al., 2008).

El primer estudio científico que incluye experimentos en hoja de chía se enmarca en una publicación centrada en establecer la calidad nutricional de las semillas producidas en Italia (Amato et al., 2015). En este trabajo, los autores realizan extractos metanólicos de hojas de chía mediante maceración a temperatura ambiente, logrando identificar tentativamente 34 metabolitos secundarios mediante HPLC-ESI-MS, dentro de los que se encuentran ácidos hidroxicinámicos como el ácido cafeico (AC) y el ácido rosmarinico (AR), además de flavonoides, principalmente derivados de luteolina y apigenina.

En estudios previos del grupo de investigación del Laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, Soto C. determinó tanto la capacidad antioxidante (CA) como la presencia de ácido protocatecuico, catequina, quercetina y hesperetina en extractos realizados mediante extracción con solvente acelerado (ESA) no solo de las hojas, sino que también de los tallos e inflorescencias, encontrando una mayor CA y contenido polifenólico en los extractos foliares (Soto, 2015). Posteriormente, en una investigación realizada en 2019, se estudió la variación de la CA y el perfil fenólico de hojas de seis fenotipos distintos de semillas de chía. En esta oportunidad se realizó un cultivo experimental en invernadero a dos niveles de riego (20% y 70% de riego), recolectándose muestras en tres etapas del crecimiento de la planta. En este estudio se demostró que los fenotipos comerciales (negra y blanca) presentaron la mayor CA y contenido polifenólico de la serie y que el estrés hídrico

altera el perfil fenólico variando en mayor medida la concentración que la identidad de los compuestos encontrados. Adicionalmente se logró identificar y cuantificar AC en todos los extractos analizados, siendo mayor en el segundo muestreo para las plantas cultivadas con estrés hídrico y, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los muestreos 2 y 3 para las plantas cultivadas sin estrés hídrico. El contenido de AC reportado en este trabajo se encontró dentro de los rangos reportados para otras especies del género *Salvia* (Maturana, 2019).

Por otro lado, en 2020 por Kiani y colaboradores, utilizaron extractos acuosos de hojas de chía para la síntesis verde de nanopartículas de Pd, evaluando por un lado la actividad antibacteriana, catalítica y antioxidante y por otro, la citotoxicidad de las nanopartículas resultantes (Kiani et al., 2020). Por su parte, en 2018 Elshafie y colaboradores publicaron un estudio donde se reporta la composición de terpenos del aceite esencial extraído desde las hojas de chía, además de la actividad antimicrobiana de este aceite (Elshafie et al., 2018).

1.2. Compuestos fenólicos

Se clasifica como compuesto fenólico o polifenol a todas aquellas moléculas orgánicas constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno que contengan en su estructura al menos un grupo fenol, lo que da paso a una amplia familia de compuestos que se clasifica principalmente en dos grupos: los flavonoides y los no flavonoides. El primer grupo lo componen todos aquellos compuestos fenólicos que posean dos unidades de benceno unidas por un puente de tres carbonos ($C_6C_3C_6$) (Figura 2a y 2b) y se puede subclasificar en flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavanoles, y antocianinas entre otros dependiendo del grado de saturación y oxidación del puente de tres carbonos (Anexo 1) (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019). Los no flavonoides por su parte son aquellos que no poseen la estructura básica de los flavonoides ($C_6C_3C_6$), y se pueden subclasificar en ácidos benzoicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos y cumarinas entre otros (Figura 2c y 2d) (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019).

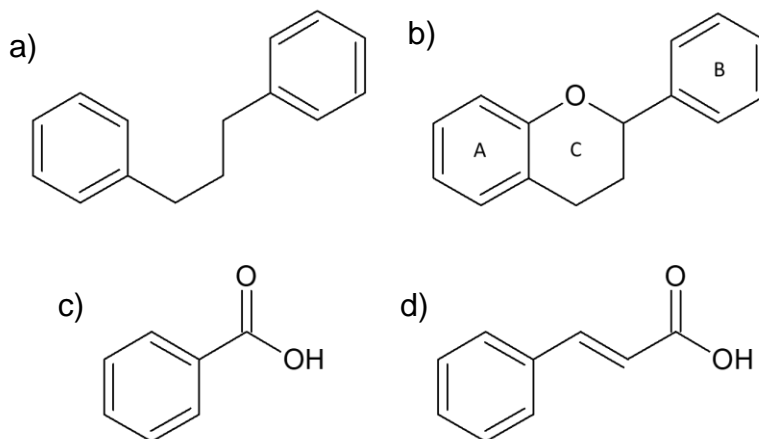


Figura 2. Estructuras químicas de a) esqueleto básico de los flavonoides $C_6C_3C_6$; b) esqueleto básico de algunas subclasificaciones de flavonoides; c) Ácidos fenólicos y d) Ácidos hidroxicinámicos.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios distribuidos ampliamente en el reino vegetal y son sintetizados a partir de la ruta del ácido chiquímico y de los fenilpropanoides (Habtemariam, 2019) (Anexo 2). Una de las características más conocidas de estos compuestos es su CA, que puede atribuirse principalmente a la presencia del grupo fenol característico. La CA presenta dos posibles mecanismos químicos: la transferencia de electrones (mecanismo ET por sus siglas en inglés) y la de átomo de hidrógeno (mecanismo HAT por sus siglas en inglés) (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005). En primera instancia, se podría suponer que a mayor número de grupos hidroxilo unidos a los anillos de benceno, mayor será la CA de un polifenol, sin embargo, es necesario considerar la disponibilidad estructural química de estas funciones para reaccionar. Es así como se han establecido algunas relaciones estructura-actividad en medio acuoso. Para flavonoides, es importante la presencia de un grupo catecol en el anillo B, además de la insaturación 2,3 en el anillo C conjugado con la función 4-oxo en el mismo anillo y la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (Figura 2) (Heim et al., 2002; Rice-Evans et al., 1996). En el caso de ácidos cinámicos, la posición y número de grupos OH en el anillo aromático modela la CA (Rice-Evans et al., 1996).

Los mecanismos ET y HAT podrían considerarse como mecanismos directos de CA, dado que consideran la reacción directa entre el radical libre y el antioxidante, pero

en medio biológico, la evidencia sugiere que algunos polifenoles son capaces de regular la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y modular la concentración de glutatión, principal antioxidante endógeno en mamíferos (Hsu et al., 2009). En las últimas décadas se han descubierto otros efectos a nivel biológico entre los que destaca el antiinflamatorio, antiviral y antibacteriano entre otros, incluso se han descrito efectos positivos tanto en obesidad como en resistencia a la insulina y esteatosis (Cazzola & Cestaro, 2011; Clifford et al., 2017; Gupta et al., 2015; Habtemariam, 2018, 2019; Hawas et al., 2013; Hsu et al., 2009; Jayanthi & Subramanian, 2015; H. Li et al., 2009; Miao et al., 2023; Wan & Jiang, 2018; Wu et al., 2010; Xiao et al., 2016; Yang et al., 2013).

Además de sus efectos beneficiosos en la salud humana, estos compuestos cumplen roles importantes en el metabolismo de las plantas, los que abarcan desde la defensa contra estresores bióticos y abióticos como modular el crecimiento y la germinación hasta la fertilización de las flores, incluso cumpliendo roles de aleloquímicos (Lattanzio et al., 2006; Reine Judesse Soviguidi et al., 2022; Riaz et al., 2018; Tanase et al., 2019).

1.2.1. Capacidad antioxidante (CA) y estrés oxidativo

La CA se puede considerar como la capacidad de apagar o neutralizar un radical libre y/o como la capacidad de inhibir la oxidación de otros sustratos. De esta forma, es importante tener en consideración que la CA se debe evaluar bajo estos dos conceptos, es decir, evaluar tanto la velocidad de *scavenging* como la cantidad de radicales atrapados (Galleano et al., 2010; Huang et al., 2005). Un radical libre (RL) por su parte, es todo compuesto químico que posea en su estructura al menos un electrón desapareado, característica que le confiere una gran reactividad, y, por consiguiente, inestabilidad. Ambos mecanismos de CA (ET y HAT) generan como producto un nuevo RL, el cual debe ser más estable que el RL original para que la molécula pueda ser considerada como antioxidante. Otra característica importante de un antioxidante es que debe ser capaz de prevenir o retardar la oxidación de otros sustratos a concentraciones bajas relativas a la concentración del sustrato (Rice-Evans et al., 1996).

En condiciones normales, existe un equilibrio entre los RL naturalmente generados durante los distintos procesos metabólicos y los mecanismos antioxidantes endógenos celulares. Pero este equilibrio se puede romper en favor de una mayor concentración de RL por factores externos abióticos como exposición extrema a luz, temperatura, sequía y contaminación entre otros y bióticos en el caso de infecciones. Cuando esto sucede, la célula entra en un estado que se conoce como estrés oxidativo, momento en el que pueden ocurrir con más facilidad daños estructurales a nivel de ADN, proteínas y membrana plasmática entre otros. La evidencia científica apunta a relacionar este estado de estrés oxidativo con enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, y cáncer entre otros (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Los RL más importantes a nivel biológico incluyen el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), peroxilo ($\cdot\text{OOR}$), y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que junto con el agua oxigenada (H_2O_2) conforman lo que se conoce comúnmente como especies reactivas de oxígeno (ERO). Si bien un aumento considerable en la concentración de ERO puede causar graves daños a nivel celular, estas moléculas cumplen funciones biológicas importantes como, por ejemplo, ante una infección bacteriana los fagocitos secretan $\text{O}_2^{\cdot-}$ de forma de combatir la infección (Abdal Dayem et al., 2017).

1.2.2. Metodologías para evaluar la CA

Existen varias metodologías para evaluar la CA *in vitro* en medio acuoso, siendo de las más utilizadas las metodologías ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), DPPH, TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) y FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). En todas ellas se evalúa la CA de una muestra frente a un RL que puede ser semi estable (DPPH) o generado *in situ* (ORAC y TEAC) o frente a un átomo metálico cuyo estado de oxidación se reduce al reaccionar con los agentes reductores (o antioxidantes) presentes en la muestra (FRAP) (López-Alarcón & Denicola, 2013). Es importante realizar la evaluación de la CA utilizando más de una metodología puesto que ninguna de ellas es absoluta, y por tanto, entregan información complementaria acerca de la calidad de un antioxidante.

Las metodologías ORAC evalúan la CA principalmente por el mecanismo HAT, mediante la generación *in situ* de radicales centrados en oxígeno y una molécula sonda como la fluoresceína o el pirogalol rojo para seguir la reacción y el experimento se realiza a pH fisiológico (7,4) en busca de un acercamiento a lo que ocurriría en medio biológico. (Dorta et al., 2018; López-Alarcón & Denicola, 2013; López-Alarcón & Lissi, 2006). Por su sencillez, una de las metodologías más habitualmente reportada es la capacidad de *scavenging* del radical DPPH. En ella, se evalúa la CA principalmente por el mecanismo ET y se utiliza el radical semi estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) que presenta una coloración morada característica con una banda de absorción 517 nm, la cual desaparece al reaccionar con el antioxidante, permitiendo la evaluación fotométrica de la CA (López-Alarcón & Denicola, 2013).

Otra alternativa es monitorear directamente la reacción entre los RL y los antioxidantes mediante espectroscopía de resonancia de espín electrónico (REE o EPR por sus siglas en inglés), técnica que permite la detección de especies paramagnéticas. Esta técnica se basa en el rompimiento de la degeneración de los niveles energéticos del RL mediante la aplicación de un campo magnético adecuado, para luego realizar un barrido de radio frecuencia que perturba los electrones del estado de menor energía e induce la transición electrónica entre ambos niveles, para finalmente registrar la segunda derivada del espectro de absorción. La intensidad de las señales será proporcional a la cantidad de RL presentes. Ahora bien, considerando el bajo tiempo de vida de los RL, es común el uso de moléculas diamagnéticas conocidas como atrapadores de espín o *spin trap*, cuya función es aumentar el tiempo de vida de los RL de forma de hacer factible el registro instrumental (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.3. Técnicas de extracción

El proceso de extracción cumple un rol fundamental en la composición y, por ende, propiedades finales del extracto, de forma que es importante considerar la eficiencia de extracción no solo en términos de rendimiento (Pietrzak et al., 2014), sino que también es importante considerar el gasto de energía y reactivos involucrados, así

como la seguridad del analista y de los desechos generados en el proceso (Vergara-Salinas et al., 2016). A grandes rasgos, la mayoría de los métodos de extracción hacen uso de un extractante o solvente, generalmente orgánico en estado líquido, cuya función es penetrar la matriz de la muestra, solvatar el analito y transportarlo fuera de la matriz.

Para el caso de matrices vegetales, una de las técnicas clásicas más utilizadas es la maceración que consiste en el contacto simple sólido-líquido entre la matriz vegetal y el solvente de extracción de forma que los compuestos de interés difundan hacia la fase líquida. En este caso, la extracción está controlada principalmente por la permeabilidad de la matriz y la polaridad del solvente utilizado, de forma que es posible separar los componentes de la matriz según su polaridad al realizar extracciones secuenciales con solventes de polaridad creciente. Las principales desventajas de esta metodología hacen referencia por una parte a la utilización de volúmenes importantes de solvente y por otra a tiempo considerable requerido para finalizar el proceso, aunque la maceración permite realizar la extracción hasta agotamiento de la matriz, punto que se puede revelar por cromatografía en placa fina. Para reducir estas desventajas, las primeras variaciones implementadas consistieron en aumentar la temperatura y/o realizar el proceso bajo agitación constante, ambos factores aumentan la velocidad de difusión de los compuestos de interés hacia la fase líquida. Así mismo, se desarrollaron otras metodologías clásicas de extracción como la extracción Soxhlet, donde es posible realizar extracciones consecutivas, o sifonajes, con la posibilidad de recuperar el solvente para su reutilización, aunque de igual manera esta técnica requiere de volúmenes importantes de solvente.

Con el desarrollo tecnológico, surgieron nuevas posibilidades, buscando siempre disminuir los tiempos requeridos, el uso energético, la cantidad de solvente necesaria y la toxicidad de éste. Es así como se desarrollaron la extracción asistida con ultrasonido (EAU), la extracción con solvente presurizado (ESP) y la extracción con solvente en estado supercrítico entre otras (Golmohamadi et al., 2013; Vergara-Salinas et al., 2016). Durante la EAU, la muestra se somete a ultrasonido de

frecuencias entre 20 kHz y 1 MHz para facilitar la transferencia de masa mediante la formación y colapso de burbujas de cavitación, aumentando el rendimiento de extracción (Golmohamadi et al., 2013). Por su parte, durante la ESP, durante el proceso de extracción, se aumenta la presión del sistema con tal de elevar el punto de ebullición del extractante y así aumentar tanto la solubilidad de los polifenoles como la permeabilidad del solvente, resultando en un proceso de mayor eficiencia comparado con la maceración (Vergara-Salinas et al., 2016). El mismo principio aplica durante la extracción con solvente en estado supercrítico, pero en este caso, las temperatura y presión se aumentan hasta superar las condiciones supercríticas del solvente utilizado (Doane-Weideman & Liescheski, 2019). El extractante más utilizado en la extracción con solvente supercrítico es el CO₂, lo que hace que esta técnica resulte conveniente para extraer compuestos de características apolares, con la posibilidad de agregar de algún modificador de polaridad como metanol en una proporción que permita alcanzar experimentalmente las condiciones supercríticas.

1.4. Identificación y cuantificación de polifenoles

1.4.1. Contenido fenólico total

De forma complementaria a la determinación de la CA, se utiliza habitualmente la metodología de Folin-Ciocalteu para cuantificar el contenido fenólico total de una muestra vegetal. El reactivo de Folin se compone de una mezcla de sales de tungsteno y de molibdeno y posee un intenso color amarillo, el cual cambia a azul luego de una reacción de reducción, permitiendo el seguimiento espectrofotométrico de la reacción. En el caso de una muestra vegetal, mientras mayor sea la intensidad del color azul registrado a 765 nm, mayor será el contenido de polifenoles, lo cual se compara habitualmente a la respuesta que entrega el ácido gálico, utilizado como patrón en esta metodología (Dudonné et al., 2009).

1.4.2. Métodos cromatográficos

La cromatografía es una técnica de separación donde los componentes de una mezcla se separan dependiendo de su interacción con una fase estacionaria, la que

puede ser sólida o líquida que se encuentra estática, mientras son transportados por una fase móvil que fluye en una dirección específica (Rizzi, 1998). La separación de los componentes de la mezcla depende de la afinidad de cada compuesto por ambas fases, de forma que un compuesto que presente mayor afinidad con la fase estacionaria, será retenido en ella por un mayor tiempo que uno que sea más afín a la fase móvil, lográndose así una distribución diferencial de cada compuesto entre ambas fases, logrando su separación (Rizzi, 1998). Para lograr identificar y cuantificar los componentes de la mezcla separados por cromatografía, es necesario acoplar algún medio de detección, el que dependerá del tipo de cromatografía utilizada.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (o HPLC por sus siglas en inglés) acoplada a detectores fotométricos o de arreglo de diodos (DAD) es una de las técnicas más utilizada para el análisis de una gran variedad de analitos y matrices. En el caso de la HPLC, la fase estacionaria se encuentra empacada en columnas y está compuesta principalmente de sílice funcionalizada ya sea con grupos polares (cromatografía en fase directa) o con grupos apolares (cromatografía en fase reversa). En cuanto a la fase móvil, esta se bombea hacia la columna por medio de un sistema de bombeo, y debe ser de polaridad opuesta a la fase estacionaria. Luego de la columna se acoplan en serie el(los) detector(es), de forma de detectar cada componente de la muestra una vez se haya realizado la separación de estos en la columna. Uno de los detectores más utilizados es el fotométrico, seguido del DAD que permite registrar los espectros de absorbancia de los componentes de la mezcla, facilitando su identificación. Para identificar un compuesto en una muestra, se comparan tanto los tiempos de retención como los espectros de absorbancia de cada pico cromatográfico de la muestra con el obtenido para un patrón medido bajo las mismas condiciones experimentales.

Durante las últimas décadas ha cobrado fuerza el uso de HPLC acoplada a detectores de espectrometría de masas, los que permiten diferenciar moléculas dependiendo de su masa molar y del patrón de fraccionamiento (espectro de masas). La espectrometría de masas consta de tres pasos fundamentales: la

ionización, la separación de los iones y la detección. Durante la primera etapa, las moléculas de la muestra se ionizan gracias a una fuente de ionización que puede ser ionización por impacto electrónico, ionización química, ionización química a presión atmosférica, ionización por electro spray, ionización por desorción con láser y la ionización por desorción asistida por matriz entre otras (Siuzdak, 2004). La ionización por electrospray es una de las más utilizadas y puede acoplarse directamente a técnicas de separación como la cromatografía líquida y la electroforesis capilar (Siuzdak, 2004). Luego de ionizarse, los componentes de la muestra son conducidos hacia el analizador, donde ocurre la separación de ellos según la proporción masa/carga (m/z) que posean. Dentro de los analizadores más comunes se encuentra el cuadrupolo (simple o triple), el analizador de tiempo de vuelo y el de trampa de iones. Finalmente, los iones alcanzan el detector donde la señal es traducida y se registra el espectro de masas de la muestra, que ilustra la abundancia relativa de los iones en función de su relación m/z .

Para el análisis de polifenoles en muestras vegetales, se suele utilizar HPLC en fase reversa con columnas C18 y fases móviles compuestas de mezclas binarias de soluciones acuosas al 01-5% de ácidos orgánicos de cadena corta (ácido fórmico, ácido acético, entre otros) y un solvente orgánico como el acetonitrilo o el metanol. Habitualmente se acopla a detectores fotométricos, de arreglo de diodos o de masas (Adımcılar et al., 2019; Amato et al., 2015; Farhat et al., 2013; Koşar et al., 2011; Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014; Rizzi, 1998).

1.5. Obesidad, resistencia a la insulina y daño hepático

La obesidad es una enfermedad que se caracteriza por acumulación excesiva de tejido adiposo debido a un desbalance entre la ingesta y gasto de energía, y se relaciona fuertemente con otras patologías como resistencia a la insulina (RI), problemas cardiovasculares y esteatosis entre otros (Garvey, 2019; S. Wang et al., 2014). Al ingerir una cantidad de calorías superior a lo necesario, éstas se almacenan en forma de grasas principalmente en el tejido adiposo e hígado, lo que genera cambios metabólicos distintivos a nivel celular en estos tejidos. Dentro de los cambios más característicos se encuentra el incremento de la secreción y

concentración de citoquinas proinflamatorias desde el tejido adiposo, lo que altera la señalización de insulina, el metabolismo de la glucosa y la generación de esteatosis en el hígado (Gregor & Hotamisligil, 2011). Gregor y colaboradores describen este estado de obesidad en base a 4 características principales: en primer lugar, es una inflamación metabólica, puesto que surge en respuesta a estímulos internos y no a factores externos como en el caso de las inflamaciones agudas por heridas, golpes u otras causas. En segundo lugar, es moderada en cuanto a que la respuesta inmune no es lo suficientemente extrema como para reparar el tejido, lo que la lleva a la tercera característica: es una inflamación crónica. Por último, se ha reportado una mayor infiltración de células inmunes al tejido adiposo de sujetos obesos con respecto a sujetos sanos, lo que altera la composición de células inmunes en favor de un ambiente proinflamatorio (Gregor & Hotamisligil, 2011).

El metabolismo de la glucosa se regula principalmente, aunque no exclusivamente, por la acción de dos hormonas antagónicas: la insulina y el glucagón. La primera estimula la absorción de glucosa por el hígado y músculo esquelético principalmente y se secreta por el páncreas luego del consumo de alimentos. En el hígado, también promueve la glucogénesis, proceso que convierte la glucosa en glicógeno para su almacenamiento en este órgano (Aronoff et al., 2004). Por su parte, el glucagón promueve la glicogenólisis, proceso que convierte el glicógeno en glucosa para su posterior secreción al torrente sanguíneo y así aumentar la concentración de glucosa en sangre (glicemia) y su secreción pancreática está regulada en parte por esta variable (Aronoff et al., 2004). Según parámetros de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en humanos adultos sanos, la concentración plasmática de glucosa (glicemia) debe situarse entre 70 y 99 mg/dL. La RI, es una condición que se alcanza cuando el umbral de concentración de insulina necesaria para mantener la glicemia dentro de rangos normales aumenta, necesitándose una mayor secreción de esta hormona para lograr regular la glicemia. Durante la obesidad, al verse alterada la señalización de insulina, aumentan las probabilidades de desarrollar RI.

En este ambiente proinflamatorio y, en conjunto con la alteración de la señalización de insulina, ocurren alteraciones específicas en el hígado, específicamente, la acumulación de grasas. La acumulación excesiva de grasa en el hígado da paso a enfermedades de hígado graso no alcohólico, y abarca desde esteatosis hasta esteatohepatitis no alcohólica y es considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico y se asocia fuertemente con diabetes, hipertensión e hipertrigliceridemia (Basaranoglu & Neuschwander-Tetri, 2006).

1.5.1. Polifenoles y obesidad, resistencia a la insulina y daño hepático

El tratamiento habitual de la obesidad se basa principalmente en el cambio de hábitos alimenticios hacia una dieta baja en carbohidratos en conjunto con un aumento de la actividad física del paciente, con apoyo de medicamentos que aumenten la sensibilidad a la insulina según lo prescriba el médico tratante. Estos medicamentos tradicionales, han sido desarrollados con la idea de interactuar con una sola diana celular o ruta metabólica, que lleve a la ausencia del padecimiento (Van De Wier et al., 2017). Los compuestos fenólicos en cambio, presentan una acción multi diana, de forma que su efecto fisiológico abarca simultáneamente un amplio rango de acción, dentro de los que se incluye desde su acción antioxidante directa y reguladora del equilibrio redox celular (Hsu et al., 2009), la inhibición de α -amilasa (KUSANO et al., 1998), la interacción con la microbiota intestinal (Mu et al., 2021), hasta la acción antiinflamatoria y reguladora de la secreción de citoquinas proinflamatorias (Pastor-Villaescusa et al., 2018) y el aumento de la sensibilidad a la insulina (Habtemariam, 2019; Jayanthi & Subramanian, 2015; Miao et al., 2023). Esta característica multi diana, hace de los compuestos fenólicos un interesante foco de investigación en obesidad, resistencia a la insulina y enfermedades hepáticas, donde la suplementación de extractos vegetales ricos en estos compuestos ya sea en la dieta o como parte del tratamiento médico, podría resultar en cambios favorables que permitan controlar los problemas relacionados con estas patologías.

2. Hipótesis

De acuerdo con los antecedentes sobre la actividad biológica de los compuestos fenólicos y a la capacidad antioxidante y cantidad de polifenoles presentes en hoja de *S. hispanica* L., los extractos foliares de este órgano presentarían efectos beneficiosos sobre la obesidad y la resistencia a la insulina inducida por una dieta de elevado contenido graso en un modelo murino. Adicionalmente, el efecto biológico sería dependiente del fenotipo de *S. hispanica* L.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante, el perfil fenólico y el efecto biológico de extractos foliares de cuatro fenotipos de *S. hispanica* L sobre la obesidad y resistencia a la insulina inducida por dieta sobre ratón.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1.** Optimizar y comparar la extracción de compuestos antioxidantes de seis fenotipos de *S. hispanica* mediante extracción con ultrasonido (extractos AWA).
- 3.2.2.** Obtener extractos secuenciales realizados con hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol para los fenotipos comerciales
- 3.2.3.** Determinar la capacidad antioxidante mediante ORAC-FL, ORAC-PGR, ORAC-EPR y DPPH, además del contenido fenólico total de los extractos AWA y de los extractos secuenciales.
- 3.2.4.** Caracterizar el perfil fenólico mediante HPLC-DAD y UPLC-MS de los extractos AWA optimizados en tres fechas de muestreo y de los extractos secuenciales.
- 3.2.5.** Determinar la capacidad antioxidante celular y la citotoxicidad de los extractos secuenciales.
- 3.2.6.** Determinar los efectos biológicos de los extractos secuenciales etanólicos sobre el perfil bioquímico y la glicemia en un modelo de ratón obeso.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Cultivo experimental

Se realizó un cultivo experimental de chíá entre enero y junio del 2020 en las inmediaciones de INIA Intihuasi perteneciente a la Universidad de Chile, en las cercanías de la ciudad de La Serena, Chile a cargo del profesor Marco Garrido de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile. Se cultivaron seis fenotipos de chíá distintos correspondientes a: negra, blanca, tardía, pinta, B54 y P2N54. Los fenotipos negra y blanca corresponden a fenotipos comerciales, mientras que los fenotipos tardía, pinta, B54 y P2N54 corresponden a variedades mutantes cortesía del profesor Dr. Guillermo Orozco de Rosas de la Universidad de Jalisco, México. La distribución de los fenotipos en el terreno de cultivo fue aleatoria, separándose en parcelas de 5 m por 3 hileras de plantas. Se cultivaron 4 parcelas por fenotipo según se muestra en la Figura 3.

Blanca	Tardía	Tardía	B54
Pinta	P2N54	P2N54	Blanca
Tardía	Blanca	P2N54	B54
Negra	P2N54	Blanca	Negra
B54	B54	Pinta	Negra
Pinta	Negra	Pinta	Tardía

Muestreos: 23 de abril de 2020 (23-04)
23 de mayo de 2020 (23-05)
03 de junio de 2020 (03-06)

Figura 3. Diseño experimental del cultivo de chíá realizado y fechas de muestreo.

Se realizaron 3 muestreos según se detalla en la Figura 3, recolectándose entre 5 y 7 plantas por fenotipo por muestreo. Las muestras fueron congeladas y transportadas al Laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes en Santiago. Una vez en Santiago, las muestras fueron separadas en raíz, hojas, tallos e inflorescencias y se secaron a 30°C hasta peso constante. Posteriormente las

muestras de hoja se trituraron en mortero de porcelana y se almacenaron rotuladas por fenotipo y muestreo hasta su uso.

4.1.2. Reactivos

Reactivos sólidos: TROLOX (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; Sigma Aldrich), Pirogalol rojo (Merck S.A.), Fluoresceína (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.), MCPIO (2-(2-Carboxietil)-2-metil-4-fenil-2H-imidazol-1-óxido).

Polifenoles: Ácido gálico (AK Scientific), Ácido protocatecuico (Sigma Aldrich), Catequina (Sigma Aldrich), Ácido Cafeico (Sigma Aldrich), Ácido p-cumárico (Sigma Aldrich), Ácido clorogénico (Sigma Aldrich), Ácido Ferúlico (Sigma Aldrich), Polidatina (Sigma Aldrich), Resveratrol (Sigma Aldrich), Ácido rosmarínico (Sigma Aldrich), Hesperedina (Sigma Aldrich), Mirecitina (Sigma Aldrich), Quercetin (Sigma Aldrich), Hesperetina (Sigma Aldrich) y Caempferol (AK Scientific).

Reactivos líquidos: Acetona grado HPLC (Merck S.A.), Agua miliQ, Agua grado HPLC (Merck S.A.), Metanol grado HPLC (Merck S.A.), Acetonitrilo grado HPLC (Merck S.A.), Ácido acético glacial (Merck S.A.), Reactivo de Folin (Merck S.A.), Diclorometano (Merck S.A.), Etanol (Merck S.A.), Acetato de etilo (Merck S.A.) y Hexano (Merck S.A.).

4.2. Métodos

4.2.1. Extracción asistida con ultrasonido

Para preparar los extractos se realizó en primer lugar la optimización de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) mediante una superficie de respuesta utilizando un modelo Doehlert de 6 puntos y tres centros. Este modelo utiliza una distribución equidistante de los experimentos dentro del modelo, lo que permite un mejor ajuste estadístico con los datos experimentales. Esta extracción se llevó a cabo en dos etapas: la primera consiste en someter la muestra con el extractante a

un baño de ultrasonido de 44 mHz, y la segunda, en macerar esta mezcla. De esta forma, las variables a optimizar fueron el tiempo de ultrasonido y el tiempo de maceración (Tabla 1), utilizando la capacidad antioxidante determinada por el ensayo ORAC-FL como respuesta, y una mezcla de Acetona:Agua:ácido acético (AWA; 70:29,5:0,5 v/v) como solución extractante. Para cada experimento, se masaron entre 5 y 10 mg de hoja seca y se agregó extractante en proporción a 20 mg de hoja con 500 µL de solución extractante. Una vez transcurrido el tiempo de maceración, cada muestra se centrifugó por 5 min a 7000 rpm y luego se recolectó la fase líquida para su análisis.

Tabla 1. Modelo Doehlert utilizado para la optimización de la extracción de compuestos con capacidad antioxidante a partir de hojas de chíca.

Experimento	Tiempo de ultrasonido (min)		Tiempo de maceración (h)	
	Real	Código	Real	Código
1	60	-0,5	0	-0,866
2	90	+0,5	0	-0,866
3	45	-1	24	0
4	105	+1	24	0
5	60	-0,5	48	+0,866
6	90	+0,5	48	+0,866
Centro	75	0	24	0
Centro	75	0	24	0
Centro	75	0	24	0

Una vez obtenidos los resultados de la optimización, se procedió a la evaluación química en cuanto a la capacidad antioxidante, contenido fenólico total y perfil fenólico de cada fenotipo en los tres muestreos utilizando las condiciones de extracción óptimas. Para esto, se masaron entre alrededor de 10 mg de muestra en un microtubo de centrifuga y se agregó solución extractante AWA en la misma proporción utilizada para la optimización y siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente.

Esta extracción, tiene como objetivo desarrollar una metodología rápida que no solo permita evaluar químicamente las muestras en un plazo moderado, sino que también permita la comparación de éstas con los datos disponibles en el portal antioxidantes de CA y contenido fenólico total (CFT) que mantiene el Instituto Nacional de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA) (INTA, 2021).

4.2.2. Preparación de extractos secuenciales

Los extractos secuenciales se realizaron con muestras del tercer muestreo para los fenotipos comerciales (negra y blanca) con solventes de polaridad creciente (Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo y Etanol) de forma de obtener 4 extractos para el fenotipo negro (EHEX-N; EDCM-N; EAE-N y EET-N) y 4 para el blanco (EHEX-B; EDCM-B; EAE-B y EET-B), con un total de 8 extractos.

Cada extracción se llevó a cabo mediante maceración a temperatura ambiente hasta agotar la matriz (aproximadamente una semana por solvente). Entre extracciones, la matriz se secó a temperatura ambiente antes de agregar el siguiente volumen de solvente. Finalmente, cada extracto se secó en un rotavapor a presión reducida, para obtener así los 8 extractos secos como se muestra en la Figura 4.

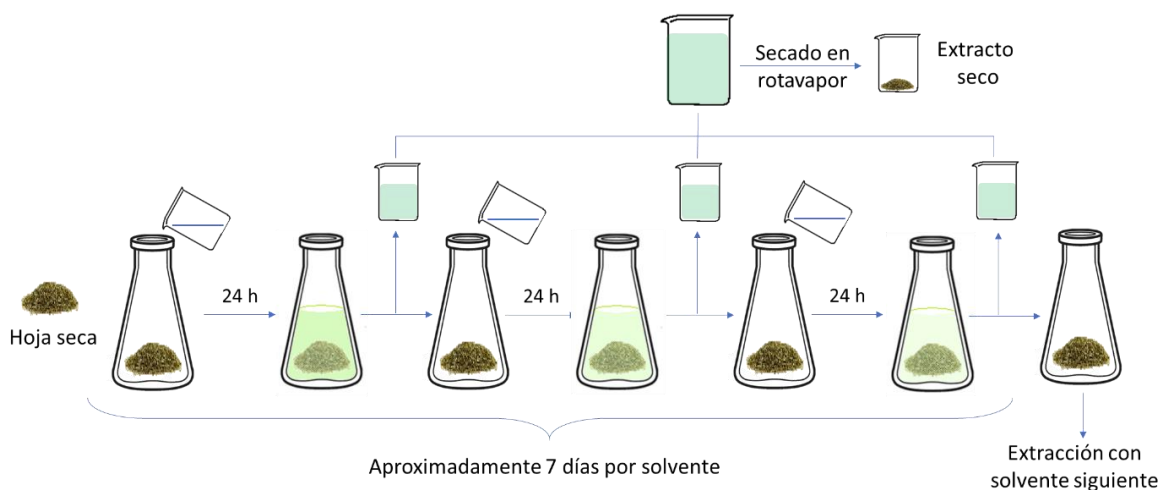


Figura 4. Esquema del proceso de extracción realizado para la extracción secuencial. Este procedimiento se repitió secuencialmente con hexano, dicloro metano, acetato de etilo y etanol para los dos fenotipos comerciales (negra y blanca).

4.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayos ORAC

4.2.3.1. ORAC-FL

Esta metodología evalúa el grado de protección que la muestra otorga ante la acción de los radicales formados a partir de la descomposición térmica aeróbica del AAPH ((2,2'-Azo-bis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro), utilizando fluoresceína como molécula sonda (Ou et al., 2001). La fluorescencia se midió utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión 528 nm a intervalos de un minuto en un multilector de microplacas Synergy (Bio-Tek Instruments, Inc.), utilizando microplacas de poliestireno blancas de 96 pocillos y el programa Gen 5 para controlar el equipo.

Para el caso de los extractos AWA, la muestra fue preparada tomando 25 μL de extracto y diluyéndolo a 250 μL con buffer fosfato 75 mM ajustado a pH 7,4 para luego tomar una alícuota de 10 μL de esta solución y diluirla a 500 μL con buffer fosfato pH 7,4. A cada pocillo de la microplaca se agregaron 150 μL de una solución de fluoresceína en buffer fosfato pH 7,4 cuya concentración final en placa fue 40 nM, y 25 μL de muestra (10 mg/L en pocillo), para ser incubada por 7 minutos a 40°C en el multilector. Trascurrido este tiempo, se agregaron 25 μL de una solución de AAPH cuya concentración final en placa fue 18,21 mM, resultando así en un volumen final de 200 μL por pocillo. El blanco se realizó utilizando solución buffer fosfato pH 7,4 en lugar de la muestra. Para el caso de los extractos secuenciales, se prepararon soluciones madre de 5000 mg/L en metanol, de la cual se tomaron 2 μL y se llevaron a un volumen final de 1000 μL . El llenado de la placa se realizó de manera similar a la descrita para los extractos AWA.

Luego de obtener las curvas de decaimiento de la fluorescencia en el tiempo, éstas fueron normalizadas (F/F_0) y se calculó el área bajo la curva para cada muestra. Esta área neta fue interpolada en una curva de calibración de Trolox (1; 6; 8; 16 y 18,5 μM en celda) construida previamente bajo las mismas condiciones de análisis, para finalmente expresar los resultados en μmol equivalentes de trolox por 100 g de peso de hoja seca (μmol eq. trolox/100 g p.s.). Todas las muestras fueron medidas

en triplicado. En este ensayo, las curvas de decaimiento de la fluoresceína presentan un tiempo de latencia (Anexo 3), que corresponde al tiempo en que la sonda está siendo protegida por los antioxidantes presentes en los extractos.

4.2.3.2. ORAC-PGR

Al igual que para ORAC-FL, esta técnica mide el grado de protección que ofrecen los extractos frente a la oxidación de los RL generados a partir de la descomposición del AAPH, salvo que, en este caso, la molécula sonda es pirogalol rojo (PGR). Esta molécula, reacciona rápidamente con los RL, por lo que, al utilizar esta sonda, se está evaluando la reactividad de los antioxidantes presentes en la muestra (López-Alarcón & Lissi, 2006). El decaimiento de la absorbancia se registró a 540 nm a intervalos de 35 s en un multilector de microplacas Synergy (Bio-Tek Instruments, Inc.), utilizando microplacas de poliestireno transparentes de 96 pocillos y el programa Gen 5 para controlar el equipo.

Para el caso de los extractos AWA, las muestras fueron preparadas tomando 30 μL de extracto y diluyéndolo a un volumen final de 120 μL con buffer fosfato pH 7,4. A cada pocillo de la microplaca se agregaron 150 μL de una solución de pirogalol rojo (419,2 μM) en buffer fosfato pH 7,4 cuya concentración final en placa fue 52,4 μM y 25 μL de muestra (5.000 mg/L en pocillo) para ser incubada por 7 minutos a 40°C en el multilector. Trascurrido este tiempo, se agregaron 25 μL de una solución de AAPH cuya concentración final en placa fue 0,1 M, resultando así en un volumen final de 200 μL por pocillo. El blanco se realizó utilizando solución buffer fosfato pH 7,4 en lugar de la muestra. Para el caso de los extractos secuenciales, se tomó una alícuota de 10 μL de la solución madre de 5000 mg/L y se llevaron a un volumen final de 1000 μL con solución buffer fosfato pH 7,4. El llenado de la placa se realizó de manera similar a la descrita para los extractos AWA.

Luego de obtener las curvas de decaimiento, se realizó el mismo tratamiento de datos que para ORAC-FL, utilizando en este caso una curva de calibración de Trolox preparada con PGR (86,7; 275,9; 400,1; 524,3 y 650,4 μM en celda), obteniéndose una medida de la reactividad de los antioxidantes presentes en el extracto. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol eq. trolox}/100 \text{ g p.s.}$ La medición de las

muestras se realizó en triplicado para cada extracto. A diferencia de ORAC-FL, en este ensayo, las curvas de decaimiento de la absorbancia no presentan un tiempo de latencia (Anexo 4).

4.2.3.3. ORAC-EPR

La capacidad de apagamiento de radicales centrados en oxígeno de todos los extractos se determinó mediante espectroscopia de resonancia de espín electrónico o EPR. Para esto, se empleó MCPIO (2-(2-Carboxietil)-2-metil-4-fenil-2H-imidazol-1-oxido) como atrapador de espín y AAPH como generador de radicales.

Para el caso de los extractos AWA, se tomaron 40 μL de una solución en buffer fosfato pH 7,4 de concentración de 1000 mg/L y se mezclaron con 150 μL de una solución de AAPH 40 mM en buffer pH 7,4, y 10 μL de una solución de atrapador MCPIO a concentración de 100 mM en buffer pH 7,4. La generación de los radicales se realizó mediante termólisis de AAPH a 60°C durante 5 minutos, para luego registrar los espectros de EPR. Para el caso de los extractos secuenciales, se mezclaron 150 μL de una solución de AAPH 40 mM en buffer pH 7,4, con 40 μL de muestra a concentración de 100 mg/L en buffer pH 7,4 y 10 μL de atrapador MCPIO a concentración de 100 mM en buffer pH 7,4. En ambos casos, el blanco se preparó con buffer fosfato pH 7,4 en lugar de muestra y los espectros se registraron en la banda X (9,7 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 con una cavidad rectangular y modulación de campo de 50 kHz, equipado con un resonador de alta sensibilidad a temperatura ambiente. Las condiciones del espectrómetro fueron: frecuencia de microondas de 9,80 GHz, modulación de amplitud de 0,90 G, constante de tiempo 81,92 ms y tiempo de conversión de 40,96 ms. Los espectros se registraron entre 3420 y 3520 G. Cada mezcla de reacción se midió en triplicado y los resultados se expresaron como % de apagamiento (%APA) (ecuación 1) luego de integrar las señales espectrales y compararlas con la señal obtenida para el blanco.

$$\%Apagamiento = \left(\frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{A_{blanco}} \right) \times 100 \quad (1)$$

4.2.4. Determinación de la capacidad antioxidante mediante DPPH

Este ensayo se basa en que la reacción entre el radical semi estable DPPH y los antioxidantes presentes en la muestra provoca un cambio de color que se traduce en una disminución en la absorbancia en aproximadamente 517 nm (Prior et al., 2005).

Para el caso de los extractos AWA, se procedió a añadir 20 μ L del extracto a un microtubo de centrífuga ámbar al que previamente se agregaron 980 μ L de una solución metanólica de DPPH de concentración 40 mg/L. Luego de homogeneizar, las muestras se incubaron por 15 min en oscuridad. La absorbancia a 517 nm se registró en un lector de microplacas Synergy (Bio-Tek Instruments, Inc.) utilizando placas de poliestireno transparentes. A cada pocillo se agregaron 200 μ L de la muestra y se registró la absorbancia a 517 nm luego del periodo de incubación. El blanco se preparó agregando 200 μ L de la solución metanólica de DPPH (40 mg/L) y el porcentaje de apagamiento (%APA) se calculó utilizando la ecuación 1 (sección 4.2.3.3.). Este ensayo se realizó por triplicado para cada extracto.

Para el caso de los extractos secuenciales, 20 μ L de la solución madre de 5000 mg/L fueron agregados a 2,980 mL de una solución metanólica de DPPH de concentración 50 μ M o equivalente a 0,9 unidades de absorbancia. Las muestras se incubaron durante 15 min en oscuridad y posteriormente se registró la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis. Como blanco se utilizó la solución metanólica de DPPH (50 μ M). El %APA se calculó utilizando la ecuación 1 (sección 4.2.3.3.).

4.2.5. Determinación del contenido fenólico total

Este método se basa en el cambio de color de amarillo a azul que sufre el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) al reaccionar con los agentes reductores presentes en la muestra, el cual se puede registrar fotométricamente a 765 nm (Dudonné et al., 2009). La absorbancia a 765 nm se registró utilizando un lector de microplacas PerkinElmer y multiplacas transparentes de poliestireno de 96 pocillos.

Los extractos AWA se prepararon tomando 40 μL de extracto y diluyéndolos a 500 μL con agua miliQ. A cada pocillo de la microplaca se agregaron 200 μL de reactivo de FC, 40 μL de una solución al 10% de Na_2CO_3 , 45 μL de agua miliQ y 15 μL de muestra, dando un volumen final de reacción de 300 μL en cada pocillo. La absorbancia a 765 nm se registró luego de un incubar la microplaca durante 30 min a 37°C dentro del multilector. El blanco se preparó utilizando agua miliQ en vez de muestra. Para el caso de los extractos secuenciales, se tomaron 40 μL de la solución madre de 5000 mg/L y se diluyeron a un volumen final de 1 mL con agua miliQ. El llenado de la placa se realizó de manera similar a la descrita para los extractos AWA. A la absorbancia de cada muestra se restó la obtenida para el blanco y luego se interpoló en una curva de calibración de ácido gálico previamente realizada (0,98; 3,99; 6,02; 10,01; 12,04 y 14 mg/L en pocillo). Finalmente, los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálicoEAG/100 g ps. Todas las muestras se analizaron por triplicado

4.2.6. Determinación del perfil fenólico mediante HPLC-DAD-FLD

Para la determinación del perfil fenólico de los extractos, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa acoplado en serie a un detector de arreglo de diodos (DAD) y a un detector de fluorescencia (FLD) marca Agilent Technologies 1200 system, equipado con una bomba cuaternaria, inyección automática y un módulo termorregulador para la columna. La columna utilizada fue una C18e Chromolith® HighResolution de 100-4,6 mm de diámetro y 10 cm de largo marca Merck. El volumen de inyección fue de 20 μL . 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% (Zúñiga-López et al., 2021). El gradiente de fase móvil se detalla en el Anexo 5. 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 identidad de los picos cromatográficos se determinó en primera instancia comparando los tiempos de retención con estándares previamente analizados, y

posteriormente, se corroboró mediante comparación tanto de los espectros de absorbancia como los de fluorescencia (en caso de que correspondiera). La tabla 2 resume tanto los tiempos de retención como las condiciones espectrales de los estándares utilizados (Maturana, 2019).

Tabla 2. 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 (λ_m) de cada compuesto además de las longitudes de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) en los casos correspondientes.

Polifenol	Tiempo de retención	Detección por DAD	Detección por FLD	
	tr (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Ácido Gálico	1,9	272	-	-
Ácido Protocatecuico	2,6	260, 290	-	-
Ácido clorogénico	4,5	326	-	-
Catequina	4,8	278	280	328
Ácido Cafeico	5,2	322	-	-
Ácido p-cumarico	8,1	310	-	-
Ácido ferúlico	10,6	322	-	-
Polidatina	11,2	306, 318	320	395
Mirecitina	18,2	254, 370	-	-
Hesperetina	18,6	284	-	-
Ácido rosmarinico	19,7	326	-	-
Quercetina	24,6	254, 370	-	-
Apigenina	27,6	266, 338	-	-
Camferol	28,1	266, 366	-	-
Hesperedina	28,1	288	-	-

Los extractos AWA se prepararon tomando 20 μ L de extracto y diluyéndolos a 500 μ L con agua miliQ (concentración final de 3200 mg/L). Para el caso de los extractos secuenciales, se inyectaron directamente las soluciones madre a 5000 mg/L. Cada extracto fue analizado por triplicado. Una vez identificado, la cuantificación se llevó a cabo interpolando el área del pico correspondiente en una curva de calibración previamente realizada para cada estándar bajo las mismas condiciones. Todas las curvas de calibración fueron realizadas utilizando una mezcla de los estándares a distintas concentraciones (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1; 1,5 y 2 mg L⁻¹), las que fueron inyectadas al cromatógrafo en triplicado. Tanto las curvas de calibración, como la

cuantificación de los polifenoles se realizaron utilizando los cromatogramas registrados a la longitud de onda de máxima absorbancia respectiva de cada polifenol.

4.2.7. Determinación del perfil fenólico mediante espectrometría de masas

El perfil fenólico de los extractos secuenciales se determinó paralelamente mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) acoplada a un detector de masas Orbitrap. Para la separación cromatográfica se utilizó un cromatógrafo Accela UHPLC (Thermo Fisher Scientific) equipado con una bomba cuaternaria, un módulo de inyección automática y un módulo de regulación de temperatura para la columna. La columna utilizada fue una columna de capa porosa Ascentis Express C18 (150 x 2,1 mm, 2,7 μm parcialmente porosa) de Supelco. La fase móvil estuvo compuesta de una mezcla binaria donde la fase móvil A correspondió a agua y la fase móvil B a acetonitrilo, ambas con un 0,1% v/v de ácido fórmico. El detalle del gradiente de fase móvil se detalla en el Anexo 6. El flujo de trabajo fue de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ con un volumen de inyección de 1 μL . Se utilizó el modo de inyección *full loop*. El detector utilizado fue un Q-Exactive Orbitrap HRMS, Thermo Fisher Scientific con una fuente de ionización electrospray caliente (HESI-II), operada en modo negativo y positivo con un voltaje del capilar de -2,5 kV. Se utilizó nitrógeno como gas carrier, gas de barrido y gas auxiliar a flujos de 60, 0 y 10 unidades arbitrarias respectivamente. La temperatura del HESI-II fue de 350°C, mientras que la temperatura del capilar fue de 320°C y se empleó un nivel S-Lens RF de 50 V. El analizador Q-Exactive HRMS Orbitrap fue ajustado y calibrado utilizando soluciones de calibración Thermo Fisher comerciales cada tres días. Se empleó el modo *full scan* con un rango de m/z desde 100 hasta 1500, con un control de ganancia automático (AGC) objetivo de $1,0 \times 10^6$ y un tiempo de inyección (IT) máximo de 200 ms. Se utilizó el modo de adquisición dependiente de los datos (DDA), operado en modo *scan* de ion producto y aplicando energías de colisión escalonadas y normalizadas (NCE) de 17,5; 35 y 52,5 eV. Los espectros de ion producto se registraron con una ventana de aislamiento de 0,5 m/z y una masa inicial fija de 50

m/z. En este caso, se utilizó una resolución de masa de 17,500 FWHM (a m/z 200), con un AGC objetivo de $2,5 \times 10^5$, y un IT máximo de 200 ms. El modo DDA fue activado cuando se registró una señal con intensidad superior a $1,0 \times 10^5$ en el modo *full MS scan*. La adquisición de los datos y control del equipo se llevó a cabo con el software Xcalibur 2.2 TM (Thermo Fisher Scientific).

El cribado e identificación de polifenoles en los extractos secuenciales se llevaron a cabo mediante el procesamiento de los cromatogramas con el software Trace-Finder TM versión 3.3 (Thermo Fisher Scientific) y una base de datos propia, realizada de acuerdo con los compuestos polifenólicos reportados en diferentes matrices vegetales. Para todas las muestras, los criterios de confirmación de la presencia e identidad de los compuestos fenólicos consistieron en errores de masa exactos (menores a 5 ppm) y patrones isotópicos concordantes (superiores al 85%) además de la comparación de los tiempos de retención cuando el patrón se encontraba disponible.

4.3. Evaluación biológica *in vitro*

4.3.1. Capacidad antioxidante celular

La capacidad antioxidante celular (CAA por sus siglas en inglés: Cell Antioxidant Activity) se evaluó según lo descrito por Wolfe y colaboradores (Wolfe & Rui, 2007), en el que se utiliza la sonda DCFH₂-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato), la cual en presencia de esterasas y ERO genera el producto fluorescente DCF (dicloro fluoresceína), de forma que, a menor fluorescencia, mayor CAA.

Se emplataron células VERO® en microplacas de poliestireno estériles de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de 50.000 células por pocillo y se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO₂ en medio de cultivo RPMI 1640. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con 100 µL de buffer fosfato pH 7,4 y luego se incubaron por 30 min a 37°C con 300 µL de medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®) que contenía DCFH₂-DA a una concentración de 25 mM. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas dos veces con 200 µL de buffer fosfato pH7,4 para luego agregar a cada pocillo 100 µL de soluciones

de los extractos a concentración de 5 mg/L. Luego de 1 h de incubación, se descartó el medio y las células fueron lavadas dos veces con 200 µL de buffer fosfato pH 7,4, para luego ser incubadas con AAPH a concentración final de 600 mM en buffer fosfato. La fluorescencia se registró cada 60 s durante 1 h inmediatamente después de agregar el AAPH en un multilector EnSpire de PerkinElmer a 37°C usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 538 nm. Los valores de CAA se calcularon utilizando la ecuación 2 (Wolfe & Rui, 2007).

$$CAA\% = \left(\frac{\Delta F - \Delta F_{AH}}{\Delta F} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde: ΔF = intensidad de fluorescencia en presencia de AAPH y en ausencia de extractos. ΔF_{AH} = intensidad de fluorescencia en presencia de AAPH y extractos. Todas las mediciones se realizaron en el mismo periodo.

4.3.2. Citotoxicidad

Para evaluar el posible efecto citotóxico de los extractos secuenciales, se realizó el ensayo de la reducción de la sal de tatrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium. En presencia de reductasas mitocondriales el MTT es reducido para formar cristales de formazán, el cual presenta una coloración morada que permite su cuantificación fotométrica. La cantidad de formazán formado es proporcional al número de células vivas, de forma que mediante esta técnica es posible determinar la citotoxicidad de los extractos secuenciales.

Para determinar la citotoxicidad de los extractos se cultivaron células VERO® (fibroblasto de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) ATCC® CCL-81TM) en frascos de cultivo celular de 75 cm² (250 mL) con medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®) suplementado con NaHCO₃ (2 mg/mL), estreptomycin (50 µg/ml), penicilina (50 µl/mL) y suero fetal bovino (SFB) al 10% para crecimiento, o al 5% para mantenimiento, a 37°C en un ambiente humedecido con CO₂ al 5%, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas.

Para estimar la citotoxicidad de los 8 extractos, se sembraron 50.000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos y se incubaron por 24 horas, luego de lo cual

se removieron las células no adheridas para posteriormente incubar las células restantes durante 24 horas a 37°C en presencia de concentraciones crecientes (20, 30, 50, 100, 150 y 200 mg/L) de los 8 extractos secuenciales. Transcurrido este tiempo, se removió el extracto no absorbido por las células y se agregó tanto MTT (5 mg/mL) como metasulfato de fenacina (0,22 mg/mL) para una incubación por 4 h. Una vez transcurrido este tiempo, los cristales de formazán se solubilizan con SDS 10% y HCl 0,01 M durante toda la noche a 37°C. Finalmente, se determinará la absorbancia del formazán a 570 nm en un lector de microplacas Varioskan Flash Multimode (Thermo Fisher®).

4.4. Evaluación del efecto en modelo de ratón obeso

4.4.1. Protocolo de mantención y suplementación

El efecto de los extractos secuenciales etanólicos sobre marcadores bioquímicos se evaluó sobre ratones macho (*Mus musculus*) de cepa C57BL/6J. Para esto, los animales se obtuvieron desde el Bioterio del Instituto Salud Pública y se trasladaron hacia dependencias de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas para su mantención en la unidad de mantención animal (UMA) del Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) de la Universidad de Chile, la cual cuenta con una habitación con temperatura constante entre 21-23°C y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno.

Al ingresar a la UMA, se eligieron al azar 6 animales como control y se alimentaron con una dieta estándar (10% grasa, 20% proteína y 70% de carbohidratos D12450J, Research Diets, New Brunswick, NJ) durante todo el período del ensayo (Grupo control; DC). Paralelamente, 18 animales fueron alimentados con una dieta alta en grasa (DAG) (60% grasa, 20% proteína y 20% de carbohidratos, D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ) durante 12 semanas. Ambas dietas se dispusieron *ad libitum*. Posterior a esto, los animales alimentados con DAG se dividieron en 3 grupos de 6 ratones cada uno: DAG-EN, correspondiente a los ratones suplementados con extractos de hojas de chíá negra; DAG-EB correspondiente al grupo suplementado con extractos de hojas de chíá blanca y DAG, correspondiente al grupo control obeso sin suplementación de extractos. Los grupos DAG-EN y

DAG-EB fueron suplementados vía oral una vez al día durante tres semanas con soluciones acuosas de los extractos etanólicos a una concentración de 50 mg/kg de ratón, mientras que los grupos DC y DAG recibieron agua en vez de los extractos. Los extractos fueron administrados utilizando una jeringa de modo de asegurar el completo consumo de este. El protocolo de tratamiento se resume en la Figura 5.

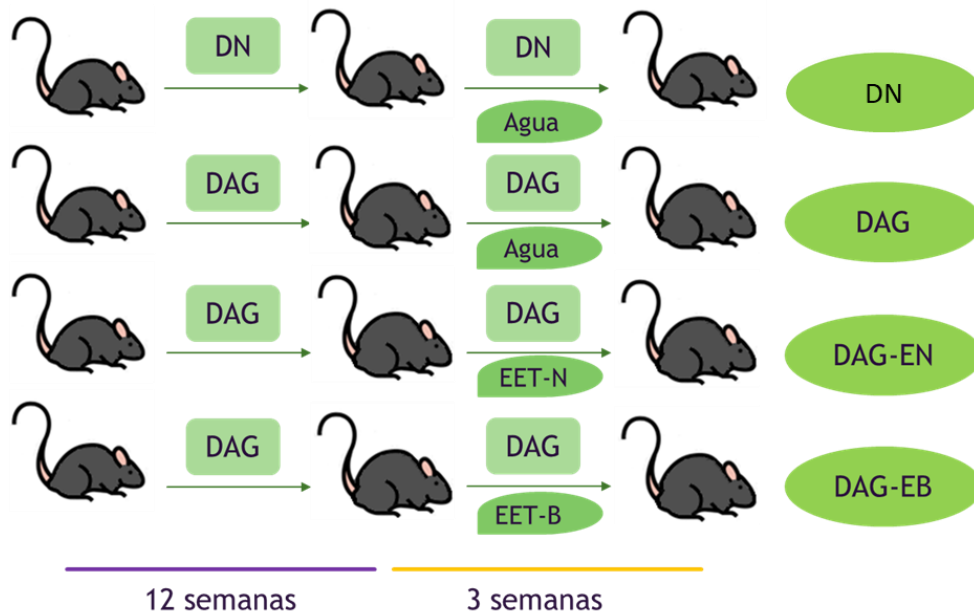


Figura 5. Protocolo de alimentación y suplementación. DN: dieta normal; DAG: dieta alta en grasa; EET-B: Extracto etanólico de hojas de chía blanca; EE-N: Extracto Etanólico de hojas de chía negra; DAG-EN: grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B (n=6 para cada grupo).

La suplementación con los extractos se realizó durante tres semanas, posterior a lo cual se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTGIp) con tal de evaluar el estado de la homeostasis de la glucosa. La eutanasia de los animales se realizó el día posterior a la PTGIp, durante la cual se masaron los animales y se tomaron muestras de sangre, hígado y tejido graso epididimal, registrando la masa de los dos últimos separadamente. Las muestras de hígado se depositaron en un cassette de inclusión y fueron sumergidos en formalina al 4% p/v hasta la fecha de análisis.

Todos los procedimientos que se realizaron fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile en el protocolo #19274-CyQ-UCh.

4.4.2. Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTGIp)

Para evaluar el estado de la homeostasis de la glucosa, se realizó una PTGIp a todos los animales en estudio el día previo a la eutanasia. Para esto, luego de 4 horas de ayuno, se administró vía inyección intraperitoneal una solución de glucosa a concentración de 2 g/ kg ratón, para posteriormente realizar mediciones de la glicemia a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos utilizando un glucómetro comercial (Johnson and Johnson, New Jersey, USA) tomando muestras de sangre de la cola de los animales.

4.4.3. Determinación de la insulinemia

Para la determinación de la insulinemia de cada muestra de sangre recolectada durante la eutanasia, estas se centrifugaron a 4000 G durante 15 min a 4°C con tal de obtener el suero, el que fue almacenado a -20°C hasta la realización de los análisis.

La insulinemia se determinó utilizando un inmunoensayo enzimático en fase sólida de dos sitios, el cual permite una medición no competitiva “tipo sándwich”. Esta determinación consta de dos anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos específicos separados en la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina reacciona por un lado con el anticuerpo adherido al pocillo de la placa del kit y por el otro, con el anticuerpo conjugado con peroxidasa. Luego de la incubación, el conjugado con la peroxidasa se determina mediante su reacción con 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina, la cual se detiene agregando solución de detención (ácido sulfúrico 0,5 M) para finalmente realizar la cuantificación fotométrica a 450 nm.

4.4.4. Determinación del índice HOMA-IR

Para evaluar la resistencia a la insulina se utiliza regularmente el índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance), que posee puntos de diagnóstico establecidos según edad y sexo en humanos (Gayoso-Diz et al., 2013), pero no en murinos. A pesar de esto, este índice permite evaluar el comportamiento de la glicemia e insulinemia en los animales en estudio por medio de la ecuación (3).

$$HOMA - IR = \frac{\text{Glicemia en ayunas} \left(\frac{mg}{dL} \right) \times \text{Insulinemia en ayunas} \left(\frac{\mu UI}{mL} \right)}{405} \quad (3)$$

4.4.5. Efecto de los extractos sobre la reversión del daño hepático y la acumulación de gotas lipídicas en ratones alimentados con DAG.

4.4.5.1. Estudio macroscópico y determinación de parámetros bioquímicos séricos.

En primera instancia, se realizó una caracterización macroscópica de los hígados disecados, evaluando tanto su coloración como tamaño. Posterior a esto, se realizó la determinación de parámetros séricos, mediante técnicas de química seca utilizando los kits KENSHIN-2 Arkray y Panel V-2 Arkray (SPOTCHEM TM EZ, Minneapolis, USA) que permiten la determinación simultánea de la actividad de las enzimas Transaminasa glutámico-oxaloacética (GOT) y transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) (kit KENSHIN) y de fosfatasa alcalina (FA).

4.4.5.2. Microscopía de gotas lipídicas en tejido hepático

Para el análisis de las muestras de hígado preservadas en formalina, estas se deshidrataron, aclararon, impregnaron e incluyeron en parafina (Hisotec ®) para luego realizar cortes de 3 µm en microtomo, de forma de obtener láminas de cortes histológicos dispuestos en portaobjetos. Una vez realizado este procedimiento, las láminas se tiñeron con Hematoxilina de Mayer y Eosina acuosa al 1% y se prepararon para su visualización en el microscopio de campo claro. Los núcleos

celulares se observaron en azul, mientras que el citoplasma se observó con una coloración rosada.

4.4.5.3. Análisis del estado de peroxidación lipídica en hepatocitos aislados y cuantificación de gotas lipídicas.

Con el fin de determinar el estado de peroxidación lipídica (PL) se utilizó el ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-undecanoico (BODIPY® 581/591 C11; Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), análogo de ácido graso fluorescente que sufre un cambio de color de rojo a verde al oxidarse, lo que permite su utilización como marcador de PL. Para obtener los hepatocitos aislados, muestras de hígado de entre 4-5 mm fueron desagregadas mecánicamente utilizando un homogeneizador de tejido Tearor (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) y posteriormente fueron purificados utilizando Ficol, para posteriormente ser centrifugados a 3000G por 90 s. Los hepatocitos aislados frescos fueron incubados con BODIPY 581/591 por 1 h a temperatura ambiente, posterior a lo cual fueron lavados dos veces con 100 µL de PBS. Las señales fluorescentes roja y verde se midieron en un microscopio confocal Nikon Spectral C2+ que cuenta con excitación simultánea (líneas láser Ex 488 / Em 520 y Ex 561 / Em 595 nm, respectivamente). La fluorescencia en ambos canales fue cuantificada mediante Fiji (NIH, MD, USA).

4.5. Análisis estadístico

Para la evaluación de las diferencias significativas entre muestras y tratamientos, se realizaron test ANOVA considerando diferencias entre fenotipo y muestreo para los extractos globales, diferencias entre solvente para los extractos secuenciales y diferencias entre tratamientos para la evaluación en modelo animal. Para este fin, se emplearon los programas STATGRAPHICS Centurión y Graph Pad Prism 8. Los datos se presentan como promedio \pm desviación estándar del número total de datos.

5. Resultados y discusión

Las propiedades finales del extracto dependen no solo del tipo sino que también de la concentración de los compuestos extraídos, de manera que es necesario realizar una caracterización química de cada tipo de extracto generado. En este trabajo de tesis se realizaron dos tipos de extracción distintas considerando dos objetivos: el desarrollo de los extractos AWA está orientado a la posibilidad de su comparación con la base de datos que mantiene el Instituto Nacional de Tecnología de los Alimentos (INTA) en su Portal Antioxidantes (www.portalantioxidantes.com), además del desarrollo de una metodología de extracción miniaturizada que utiliza ultrasonido como medio para mejorar la extracción de compuestos fenólicos desde la matriz vegetal. Por su parte, con la extracción secuencial se pretende generar una gran cantidad de extracto, principalmente etanólico, para asegurar suficiente dosis para los experimentos *in vivo*. Si bien este último procedimiento de extracción utiliza un gran volumen de solventes, permite dar la primera aproximación a la caracterización química de las hojas de chía.

5.1. Extractos AWA

5.1.1. Optimización de la extracción asistida por ultrasonido

En primera instancia, se procedió a realizar la optimización de la EAU utilizando un modelo $2^3 + 3$ centros, sin embargo, este modelo presentó un ajuste a los datos experimentales menor al 0,7, es decir, este modelo explica menos de un 70% de la variabilidad experimental de los datos. De esta forma, se optó por realizar la optimización con un modelo Doehlert en busca de un mejor ajuste de los datos experimentales. Este modelo presenta una distribución más homogénea de los experimentos en el espacio experimental comparando con el modelo $2^3 + 3$ centros, de forma que es posible aumentar el ajuste de los datos experimentales. Los resultados obtenidos con este último modelo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Modelo Doehlert utilizado para la optimización de compuestos con capacidad antioxidante desde hojas de chía y respuesta asociada a cada experimento.

Experimento	Tiempo de ultrasonido (min)		Tiempo de maceración (h)		Respuesta ORAC-FL ($\mu\text{mol eq. Trolox /100 g p.s.}$)
	Real	Código	Real	Código	
1	60	-0,5	0	-0,866	87,40
2	90	+0,5	0	-0,866	86,62
3	45	-1	24	0	84,68
4	105	+1	24	0	81,79
5	60	-0,5	48	+0,866	80,06
6	90	+0,5	48	+0,866	88,69
Centro	75	0	24	0	90,08
Centro	75	0	24	0	93,85
Centro	75	0	24	0	93,28

A partir de los datos resumidos en la Tabla 3, se obtuvo la superficie de respuesta que muestra la Figura 6, donde se observa un máximo de la capacidad antioxidante cuando el tiempo de ultrasonido es 74,32 min y el tiempo de maceración es 20,09 h, así mismo, la Figura 7 muestra que solamente la interacción AA (A: tiempo de ultrasonido) tiene un efecto significativo en la CA de los extractos, y que este efecto es negativo a pesar de que el efecto de A (tiempo de ultrasonido) es positivo, aunque no significativo. Adicionalmente, este modelo presenta un ajuste de $R^2=0,8456$, explicando así un 84% de la variabilidad de los datos experimentales.

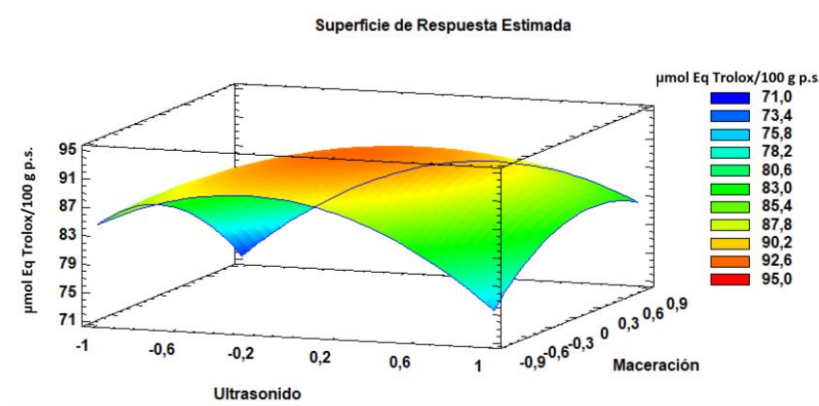


Figura 6. Superficie de respuesta obtenida al realizar los experimentos según el modelo Doehlert estipulado en la Tabla 3.

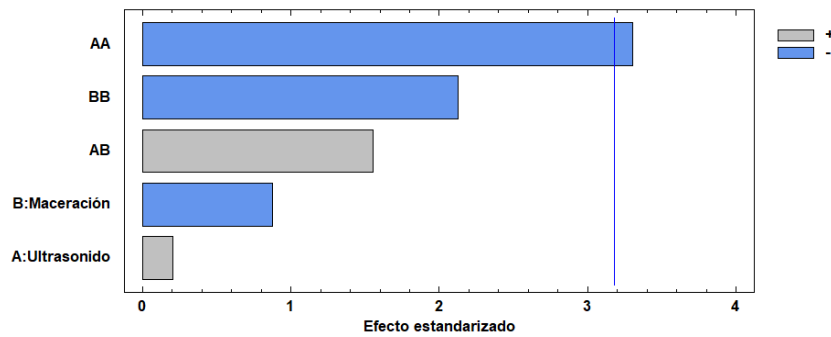


Figura 7. Diagrama de Pareto obtenido para el modelo Doehlert estipulado en la Tabla 3.

5.1.2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayos ORAC

Considerando que el ensayo ORAC-FL fue utilizado como metodología validada para medición de la capacidad antioxidante (CA) de alimentos y suplementos alimenticios por la USDA (United States Department of Agriculture) durante algunos años y que en nuestro país el INTA (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos) mantiene una base de datos con valores de ORAC-FL para hortalizas y frutas (INTA, 2021) se utilizará esta metodología como medida referencial de la capacidad antioxidante de los extractos de hoja de chíá analizados en este trabajo.

Como se muestra en la Figura 8, y siguiendo la tendencia que ha mostrado la variación temporal de la CA en trabajos previos del grupo de investigación, tres de los fenotipos en estudio (negra, blanca y tardía) presentan un máximo en la CA en

el segundo muestreo, fecha en que las plantas han alcanzado la madurez vegetativa y comienza la etapa de floración y producción de semilla. Dentro de los fenotipos que presentan este comportamiento, el que presentó la mayor CA fue el fenotipo tardío en el segundo muestreo, con un valor de $167.707 \pm 5.148 \mu\text{mol eq. Trolox}/100 \text{ g hoja seca}$, siendo significativamente mayor a los demás valores reportados en este trabajo. Por el contrario, los fenotipos P2N54, B54 y pinta, presentan una disminución significativa en su CA en el tiempo, presentando los valores más bajos de CA en el último muestreo con valores de $48.621 \pm 7.995 \mu\text{mol eq. Trolox}/100 \text{ g hoja seca}$, $42.187 \pm 4.687 \mu\text{mol eq. Trolox}/100 \text{ g hoja seca}$ y $44.153 \pm 1.830 \mu\text{mol eq. Trolox}/100 \text{ g hoja seca}$ respectivamente. En general, a excepción del fenotipo negra, la capacidad antioxidante es significativamente menor en el tercer muestreo, fecha en la que comienza la defoliación natural de las plantas y se ha finalizado la recolección de las semillas.

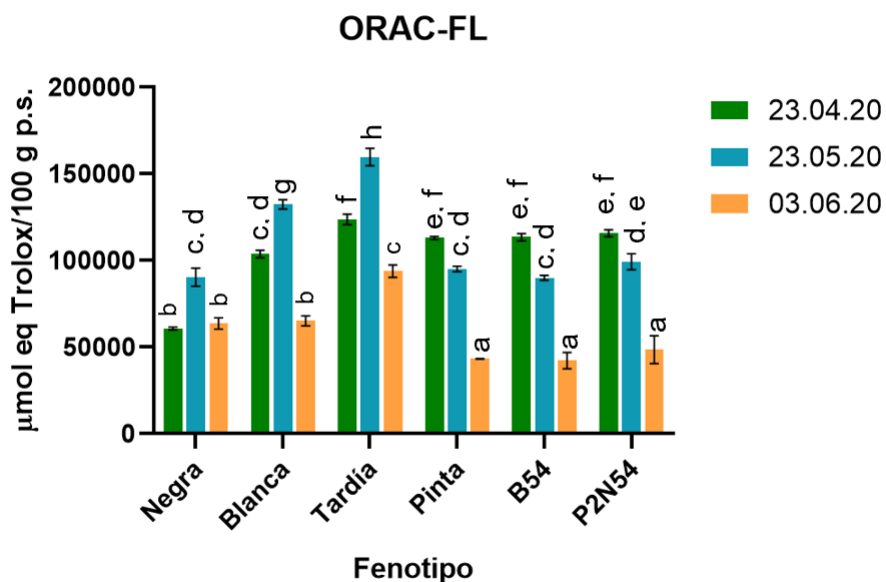


Figura 8. Capacidad antioxidante de los extractos AWA determinada por ORAC-FL en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los datos.

El aumento de la CA en el segundo muestreo está ligado a los requerimientos metabólicos de las plantas, dado que en esta fecha la planta se encuentra comenzando el proceso de floración y producción de semilla. En este sentido, durante las últimas décadas de investigación, se ha descubierto una serie de funciones que cumplen los polifenoles en las plantas, entre las que se encuentran la protección frente a ERO, la regulación del transporte de auxina, el desarrollo de las raíces y la germinación del polen (Di Ferdinando et al., 2014; Taylor & Grotewold, 2005) entre otras.

La auxina es una fitohormona encargada del crecimiento de las plantas y de la maduración de los frutos. Esta hormona se transporta verticalmente desde las hojas hacia los demás órganos de la planta mediante sistemas regulados por polifenoles, especialmente flavonoides como la quercetina, el kampferol y la apigenina (Di Ferdinando et al., 2014). La evidencia muestra que una mayor concentración de flavonoides afecta negativamente el tamaño de las plantas, dado que estos compuestos inhiben el transporte polar de auxina. Por otra parte, se ha demostrado que también presentan un rol en el catabolismo de auxina, actuando como inhibidores (quercetina y ácido cafeico) o como co-factores (kampferol y ácido p-cumarico) de auxina oxidasa, enzima que cataliza la oxidación de la hormona (Di Ferdinando et al., 2014).

En cuanto a la germinación del polen, se ha demostrado que algunos flavonoides contribuyen a la elongación del tubo de polínico, estructura encargada de transportar el espermatozoide desde el polen hasta el pistilo para asegurar la fertilización del óvulo en plantas con semilla. Se ha demostrado que la ausencia de flavonoides puede producir tubos polínicos no funcionales, aunque el polen sea fértil (Taylor & Grotewold, 2005).

Considerando los efectos que algunos flavonoides poseen en la regulación del crecimiento y germinación del polen, sería natural pensar que en etapas tempranas de desarrollo (primer muestreo) exista baja concentración de estos compuestos, luego esta aumente para favorecer la germinación del polen (segundo muestreo)

para finalmente disminuir nuevamente una vez se ha cumplido el ciclo de vida para asegurar la muerte del individuo.

Dado que la CA de los fenotipos Pinta, B54 y P2N54 disminuye significativamente entre los muestreos realizados, estos no estarían cumpliendo con la hipótesis planteada anteriormente. La diferencia de comportamiento puede deberse a diferencias a nivel genético de expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos o también al carácter puntual de los muestreos, en el eventual caso de que estos fenotipos hayan presentado un máximo de CA en una fecha anterior o posterior al segundo muestreo, incluso podría considerarse una eventual sensibilidad especial de estos fenotipos a estresores bióticos y/o abióticos que genere un aumento de la CA en el primer muestreo, a pesar de los posibles efectos en el tamaño de los individuos.

Es importante recordar que la CA determinada mediante ORAC-FL entrega más bien una medición estequiométrica de los compuestos con CA (Poblete et al., 2009) y expresa el resultado de la sinergia de todos los compuestos presentes en el extracto que presenten CA, por lo que si el objetivo de la plantación de chíá es la producción de semilla, es necesario recolectar las hojas una vez que estas se hayan recolectado, lo que implica que la cantidad de antioxidantes será menor que si fuesen recolectadas en el segundo muestreo.

Al comparar los resultados del segundo muestreo con algunos valores para frutas y hortalizas presentes en la base de datos que mantiene el INTA (Figura 9) se puede observar que, todos los fenotipos en estudio presentan mayor CA que el calafate y el maqui, ambas frutas reconocidas por su gran potencial antioxidante. Por otro lado, la CA de la albahaca es significativamente ($p < 0,05$) superior a los resultados de todos los fenotipos de chíá estudiados en este trabajo. Se ha documentado previamente que, al comparar la CA entre hojas y frutas de frutilla, son las hojas las que presentan los mayores valores comparativos (S. Y. Wang & Lin, 2000), tendencia que se repite en *S. hispanica* (Soto, 2015).

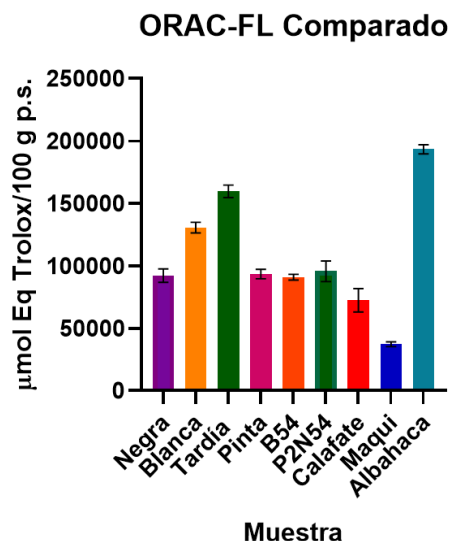


Figura 9. Comparación entre la CA determinada por ORAC-FL en el segundo muestreo para los seis fenotipos en estudio y datos disponibles en la base de datos del INTA para algunas frutas y hortalizas.

De forma de complementar los datos entregados mediante la metodología ORAC-FL, se procedió a determinar la CA por medio de ensayos que entregan información concerniente a la reactividad de los antioxidantes presentes, como es el caso de la espectroscopía de paramagnética de espín o EPR por sus siglas en inglés, empleando MCPIO como atrapador de espín. Sin embargo, los datos obtenidos por esta metodología presentaron una variación considerable de la señal experimental, haciendo que la medición fuera poco reproducible.

Tomando en cuenta que esta técnica evalúa la reactividad de los antioxidantes presentes utilizando un atrapador de espín para realizar la medición instrumental, es posible que las condiciones de reacción no fuesen las apropiadas para obtener datos reproducibles. Si bien se realizaron experimentos modificando tanto la temperatura como el tiempo de reacción y el atrapador elegido, es posible que la variabilidad en la respuesta recaiga en que las condiciones de medición son puntuales, a diferencia de ORAC-FL donde se registra la acción antioxidante en el tiempo. Sería importante realizar un estudio cinético para establecer el tiempo en el que se alcanza el estado estacionario de la reacción para realizar las mediciones considerando esta variable. Ahora bien, para realizar este estudio, es importante

tomar en cuenta la estabilidad temporal del espín aducto, cuya señal disminuye en el tiempo por descomposición propia de este radical. Adicionalmente, el tiempo en el que se alcanza el estado estacionario dependerá también de la composición de la muestra, y, por tanto, las condiciones podrían diferir ampliamente entre extractos, pudiendo no hacer factible la medición por decaimiento del espín aducto.

Es así que para complementar los resultados de ORAC-FL, se incluyeron análisis de CA mediante ORAC-PGR y DPPH. Los resultados determinados por ORAC-PGR se resumen en la Figura 10, y en ella se muestra una variación similar a ORAC-FL tanto en la comparación entre fenotipos como en la variación de las fechas de muestreo. En este caso, nuevamente fue el fenotipo tardío el que presenta un valor significativamente mayor de CA en el segundo muestreo, con un valor puntual de $8.228 \pm 202 \mu\text{mol Eq. Trolox}/100 \text{ g p.s.}$, mientras que para todos los fenotipos se presentó un mínimo en el primer muestreo de entre $4.977 \pm 244 \mu\text{mol Eq. Trolox}/100 \text{ g p.s.}$ y $6.897 \pm 154 \mu\text{mol Eq. Trolox}/100 \text{ g p.s.}$

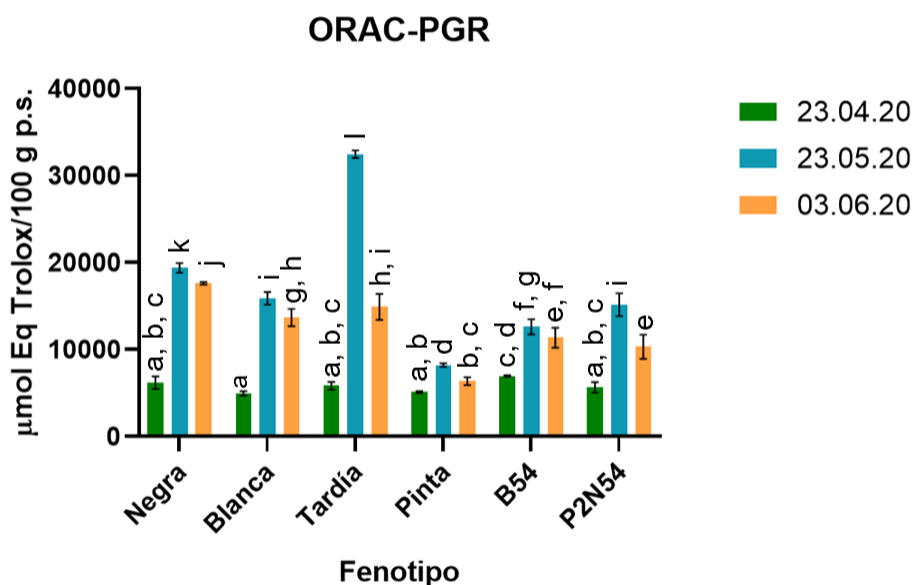


Figura 10. Capacidad antioxidante de los extractos globales determinada por ORAC-PGR en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los datos.

La variante con pirogalol rojo de la metodología ORAC se ha descrito como una forma de determinar la reactividad de los antioxidantes presentes en la muestra y, una de las principales diferencias con ORAC-FL es la ausencia de tiempo de latencia al inicio de la reacción debida a la mayor reactividad, frente a los RL, del pirogalol rojo en comparación con la fluoresceína (López-Alarcón & Lissi, 2006) (Anexos 3 y 4). Esta característica hace necesario que los antioxidantes de la muestra presenten una reactividad mayor que el pirogalol para ejercer su acción antioxidante, de forma que los datos obtenidos con esta metodología estarían proporcionando información sobre la calidad de los antioxidantes presentes en la muestra.

Al igual que en ORAC-FL, los datos de ORAC-PGR resumidos en la Figura 10 muestran un aumento significativo de la CA entre el primer y segundo muestreo, en este caso, para todos los fenotipos en estudio. Así mismo, también se observa una disminución de la CA hacia el tercer muestreo. Nuevamente, el fenotipo con mayor CA fue el tardío en el segundo muestreo, con un valor de 31.788 ± 1.433 $\mu\text{mol eq. Trolox}/100$ g p.s., mientras que el menor valor se encuentra para todos los fenotipos en el primer muestreo, con un valor promedio de 5.838 ± 761 $\mu\text{mol eq. Trolox}/100$ g p.s. De esta forma, la reactividad de los antioxidantes presentes en los extractos sigue un patrón común entre los fenotipos en estudio, a diferencia de los resultados de ORAC-FL para los fenotipos Pinta, B54 y P2N54 que muestran una disminución significativa de la CA en el tiempo (Figura 8). Así mismo, otra diferencia entre los resultados de ORAC-FL y ORAC-PGR hace referencia a que la disminución de la CA es porcentualmente menor entre los muestreos 2 y 3 para el caso de ORAC-PGR, lo que es indicio de que a pesar de que existe una disminución importante en la disponibilidad de sitios de reacción (ORAC-FL), la reactividad del extracto disminuye en menor medida.

5.1.3. Determinación de la capacidad antioxidante mediante DPPH

Para complementar los datos obtenidos mediante ORAC, se realizó la determinación de la CA mediante DPPH. Las metodologías ORAC expuestas anteriormente, determinan la CA en un medio acuoso a pH 7,4 en busca de emular lo que pasaría en un medio biológico y se rigen principalmente por el mecanismo HAT, por el contrario, la metodología DPPH se realiza en metanol como medio de reacción, lo que permite evaluar la CA de compuestos de carácter más apolar y se rige principalmente por el mecanismo ET. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 11.

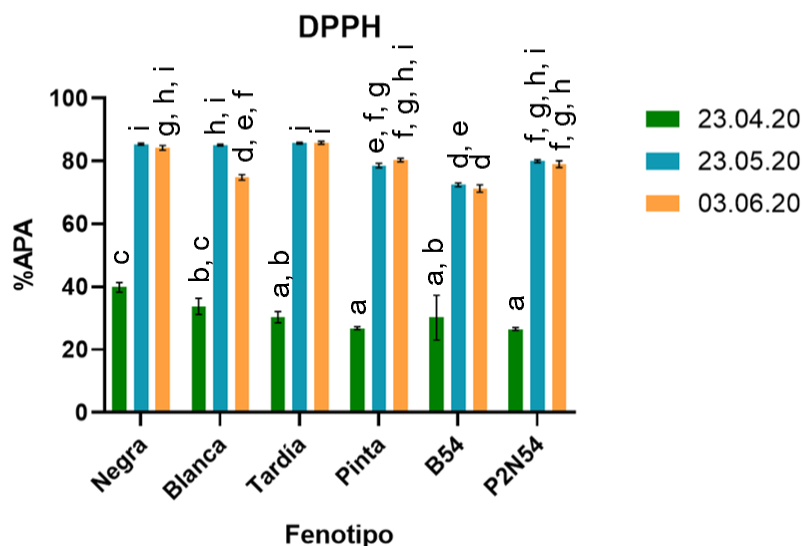


Figura 11. Capacidad antioxidante de los extractos globales determinada por DPPH en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Quizás uno de los resultados más llamativos al analizar los resultados expuestos en la Figura 11, es la homogeneidad de comportamiento de los 6 fenotipos en estudio al evaluar la CA por DPPH, específicamente en consideración al aumento significativo de la CA entre el primer y segundo muestreo y la casi nula disminución de esta entre los muestreos 2 y 3 a diferencia de lo reportado por ORAC. Otra diferencia con respecto a los resultados expuestos anteriormente para los ensayos

ORAC, es que para DPPH el fenotipo tardía no presenta una CA significativamente mayor a los demás en el segundo muestreo, emplazándose en el mismo grupo estadístico junto con los fenotipos negra, blanca y N54 con un valor aproximado del 84% de apagamiento del radical DPPH para estos 4 fenotipos en el segundo muestreo. De esta forma, resulta difícil encontrar diferencias entre los distintos fenotipos en estudio, lo que podría estar indicando que, en este caso, la CA está mayormente mediada por los antioxidantes comunes entre fenotipos, lo que guarda relación con las similitudes encontradas durante el análisis de los perfiles fenólicos obtenidos por HPLC-DAD que se expone más adelante. Adicionalmente, y a diferencia de los ensayos ORAC, el medio de reacción utilizado para determinar el %APA del radical DPPH es metanol, lo que podría estar influenciando positivamente la solubilidad de los antioxidantes de la muestra, lo que junto con que esta metodología evalúa la CA principalmente mediante el mecanismo de transferencia de electrones (ET), podría explicar el cambio en la tendencia de comportamiento de la CA de los extractos en estudio.

5.1.4. Contenido fenólico total

El contenido fenólico total (CFT) de una muestra vegetal se determina comúnmente mediante el método de Folin-C, el cual se basa en el cambio de color que sufre el reactivo de Folin al reducirse por efecto de los compuestos reductores presentes en la muestra, dentro de los que se incluyen los compuestos fenólicos. Se registra la aparición de un compuesto azul a 765 nm luego de 30 minutos de reacción con la muestra a 37°C. El CFT se obtiene luego de interpolar la absorbancia en una curva de calibración de ácido gálico y expresar los resultados como mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de hoja seca (mg EAG/100 g h.s.).

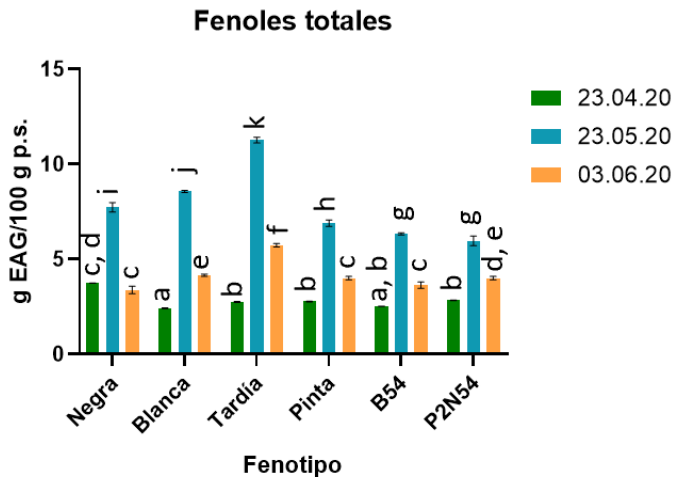


Figura 12. Contenido polifenólico total los extractos AWA determinado mediante Folin-C en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A pesar de que esta metodología se utiliza para determinar el contenido total de polifenoles, y que ORAC-FL entrega una medida estequiométrica de la CA, no se encontró correlación entre ambas para ninguno de los fenotipos, aunque la tendencia con un máximo en el segundo muestreo es la misma. Esto puede deberse a que la metodología de Folin-C puede presentar interferencia de compuestos no polifenólicos que presenten la capacidad de reducir el reactivo de Folin, sin embargo, es una metodología ampliamente utilizada para este fin, lo que permite la comparación entre muestras.

Como se muestra en la Figura 12, todos los fenotipos en estudio presentan un máximo en el CFT en el segundo muestreo, aumento que es significativo ($p < 0,05$) para todos los casos. Estos resultados se encuentran acordes con la hipótesis planteada anteriormente (sección 5.1.2) que hace referencia a la necesidad metabólica de las plantas a aumentar el contenido de polifenoles para asegurar la germinación del polen, la elongación del tubo polínico y, consecuentemente, la producción de semillas.

Nuevamente, es el fenotipo tardío el que presenta el mayor CFT en el segundo muestreo, alcanzando un valor de $11,1 \pm 0,3$ g EAG/100 g p.s. mientras que los menores valores se encontraron en el primer muestreo para la mayoría de los

fenotipos con valores que rondan los 2,7 g EAG/100 g p.s. con la excepción del fenotipo Negra que no presenta diferencias significativas entre los muestreos 1 y 3.

5.1.5. Determinación del perfil fenólico

Actualmente, la evidencia apunta a que los polifenoles cumplen un rol importante en la defensa de las plantas frente a los cambios ambientales (radiación UV, escasez de agua, alta concentración de metales, etc.) y frente a infecciones y heridas. Es por esto que, el patrón polifenólico puede variar no solo entre especies, sino que también entre individuos y poblaciones. Algunos autores plantean que los compuestos fenólicos se sitúan diferencialmente dentro de las plantas, ubicándose preferencialmente en los sitios y tejidos donde ejercen un rol fundamental en la defensa y/o señalización de las plantas (Lattanzio et al., 2006).

De forma de facilitar el análisis de los cromatogramas obtenidos, se definieron tres zonas diferentes: la zona (i) correspondiente al intervalo entre los 0 y 10 min donde se observan varios picos con espectros similares que presentan máximos de absorbancia cercanos a los 320 nm, entre los que se encuentra a 4,7 min el pico correspondiente a ácido clorogénico (ACLO), a 5,2 min el pico correspondiente al ácido cafeico (AC) y a 8,1 min el pico correspondiente a ácido p-cumarico (APCUM); la zona (ii) entre los 10,1 y 22 min donde se encuentran los picos con mayor intensidad y a 19,7 min se encuentra el pico del ácido rosmarinico (AR); y la zona (iii) entre los 22,1 y 35 min donde se observan un gran número de picos cromatográficos con baja resolución y a 27,6 min se logró identificar apigenina (API). En las zonas (ii) y (iii) se encuentran una gran cantidad de picos que poseen un espectro de absorción típico de flavonoides, esto es un banda de absorbancia entre los 250-285 nm, correspondiente a la señal del anillo A, y otra banda entre 320 y 385 nm correspondiente a la señal del anillo B (Figura 2) (Rice-Evans et al., 1996). A modo de ejemplo, en la Figura 13 se muestran los cromatogramas registrados a 278 nm para el fenotipo negro en los tres muestreos realizados, mientras que en el Anexo 7 se muestran los cromatogramas representativos registrados a 278 nm para los 5 fenotipos restantes.

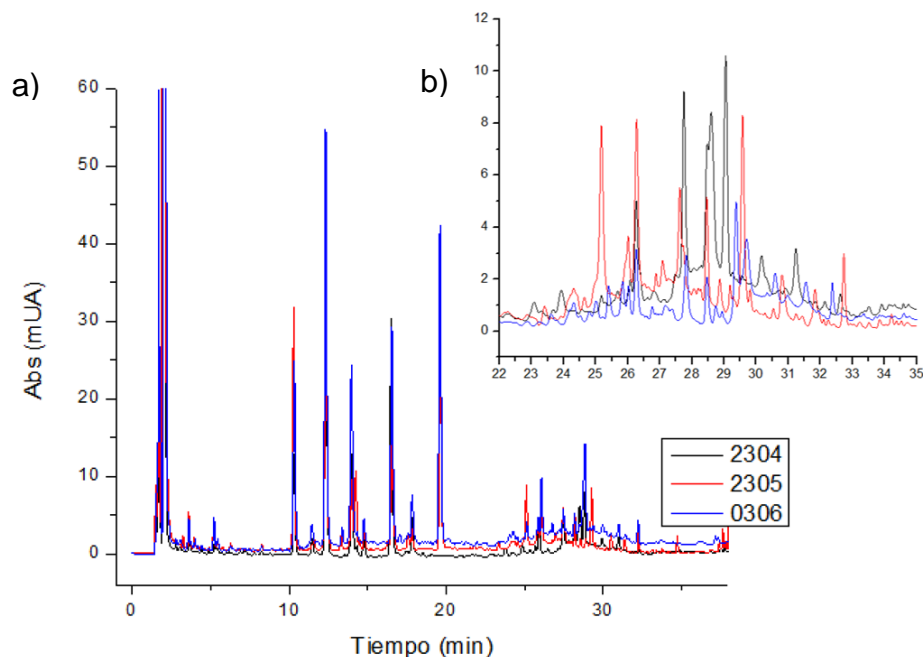


Figura 13. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo Negro a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).

Los cromatogramas de los extractos AWA muestran picos comunes en las tres zonas, entre los cuales se encuentran los picos cuya identidad se logró dilucidar, y los picos de mayor intensidad de la zona (ii) con tiempos de retención de 10,3 min, 12,5 min y 17,5 min, presentan el espectro típico de los flavonoides, cuya identidad no coincide con ninguno de los estándares utilizados en esta tesis.

En contraposición, la identificación de ACLO, APCUM y API varía tanto entre muestreos como entre fenotipos, de forma que no se logró su cuantificación en todas las muestras. Así mismo, es la zona (iii) la que presenta la mayor variabilidad entre fenotipos y muestreos, variando no solo la intensidad de la señal registrada, sino que también el número y la identidad de compuestos presentes en el cromatograma. En general, el muestreo del 24 de abril (primer muestreo) presentó un menor número de picos cromatográficos independiente del fenotipo, mientras que el muestreo del 23 de mayo (segundo muestreo) presentó el mayor número de picos, así como también, picos de mayor intensidad, lo que concuerda con lo descrito previamente respecto a la variación de la CA entre muestreos.

5.1.5.1. Zona (i): Contenido de ácidos clorogénico, cafeico y p-cumarico

En la zona (i) fue posible la identificación y cuantificación de AC en todas las muestras analizadas, además se logró la identificación y cuantificación de ACLO y APCUM en algunos de los muestreos y fenotipos. Como se muestra en la Figura 14, el contenido de ácido cafeico (CAC) sigue el mismo patrón que la CA determinada por ORAC, es decir, un máximo estadísticamente significativo en el segundo muestreo para todos los fenotipos, con la única excepción del fenotipo B54 para el cual el CAC no muestra una disminución entre los muestreos 2 y 3.

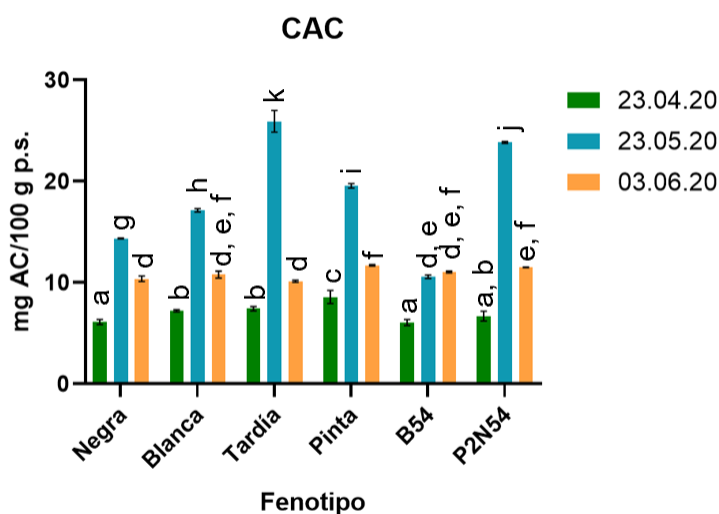


Figura 14. Contenido de ácido cafeico de los extractos AWA determinada por HPLC-DAD en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Nuevamente fue el fenotipo tardía el que obtuvo un mayor valor de la variable en estudio, con un valor de 26 ± 1 mg AC/100 g p.s., mientras que el menor valor se registró para los fenotipos negra, B54 y P2N54 en el primer muestreo con un valor promedio aproximado de 6,3 mg AC/100 g p.s. La variación del CAC entre fenotipos es aproximadamente de un 30% en el primer muestreo, un 60% en el segundo y de un 14 % en el último, lo cual muestra que la demanda metabólica de este compuesto depende del fenotipo principalmente durante la etapa reproductiva, mientras que, al

momento de comenzar la etapa final de la vida de la planta, esta demanda resulta relativamente independiente del fenotipo.

El ácido cafeico es una molécula que está ampliamente distribuida en el reino vegetal, y dentro de las especies del género *Salvia* se reporta comúnmente. Farhat y colaboradores analizaron el contenido de polifenoles en extractos metanólicos realizados mediante extracción soxhlet de 4 especies de *Salvia* que crecen en diferentes hábitats del centro y norte de Túnez, encontrando que el CAC varía no solo entre especies, sino que también entre localidades (Farhat et al., 2013). En este trabajo, la especie con mayor CAC resultó ser *S. officinalis*, que presentó una variación entre 22 ± 1 mg /100 g p.s. y 69 ± 2 mg /100 g p.s. entre las distintas localidades estudiadas. Estos valores se encuentran sobre el promedio (11 mg/100 g p.s. aprox.) de CAC encontrado para los 6 fenotipos en el tercer muestreo, momento en el que ya se han recolectado las semillas y se cumpliría con el doble propósito del cultivo de chía.

En otro estudio de los mismos autores, ocasión en la que evaluaron la variación del perfil fenólico de hojas de *S. officinalis* recolectados en tres etapas de maduración (vegetativa, floración y producción de frutos), los autores reportan que el perfil fenólico no solo depende del origen (localidad) de las plantas, sino que también del momento de recolección, y es así como la variación del AC sigue la misma tendencia que lo expuesto para *S. hispanica* en la Figura 14, con un máximo en la etapa de floración (Farhat et al., 2014). En esta oportunidad, el valor más alto de CAC encontrado para *S. officinalis* fue de 35 ± 2 mg AC/100 g h.s., mayor que los 26 ± 1 mg AC/100 g h.s encontrados para el fenotipo tardía en el muestreo de mayo para los extractos AWA. Como se mencionó anteriormente, el ácido cafeico puede actuar como inhibidor de la auxina oxidasa (Di Ferdinando et al., 2014) lo que impacta directamente en la disponibilidad de esta hormona, y la maduración del fruto (semilla), lo cual podría estar ligado a la similitud en el comportamiento de la variación de este polifenol entre *S. officinalis* y *S. hispanica*.

Sin embargo, el metabolismo y las funciones de este ácido en los organismos vegetales es variado y se asocia fuertemente con la respuesta defensiva ante

estresores bióticos y abióticos como el ataque de patógenos, falta de agua, aumento en la concentración de sales o luz UV entre otros. Se ha descrito que, frente a infecciones por hongos, el AC participa en el engrosamiento de la pared celular, lo que potencia la defensa frente a la infección (Riaz et al., 2018). En cuanto a estresores abióticos, regula la respuesta antioxidante aumentando la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa, ayuda a regular la actividad de los cloroplastos y disminuye la concentración de ERO dependiendo del tipo de estrés estudiado (Riaz et al., 2018). En 2016 Jons y colaboradores demostraron que el ácido cafeico impacta positivamente en el crecimiento de brotes de chíá, aumentando en un 16% la longitud del brote comparado con el control, mientras que la longitud de los brotes sometidos a estrés salino fue un 36% menor que el control. Al comparar con brotes sometidos a estrés salino en conjunto con AC (100 μ M), la longitud de los brotes aumentó un 24% comparado con los brotes sometidos solamente a estrés salino, demostrando que la inclusión de este compuesto en el cultivo podría ser beneficioso en la producción de biomasa (Jones, 2016).

Ante tan basto funcionar de esta molécula en el metabolismo vegetal, es difícil establecer una razón clara por la cual se presenta un aumento significativo del CAC en el segundo muestreo para la mayoría de los fenotipos. Dentro de la ruta de los fenilpropanoides, el AC es sintetizado a partir de ácido p-cumárico, y puede ser utilizado como sustrato para la síntesis de ácido ferúlico y otros derivados como el ácido clorogénico (Habtemariam, 2018) (Anexo 2).

Al analizar los espectros de los picos cromatográficos encontrados en la zona (i), sobre todo para las muestras recolectadas en el segundo muestreo, se observan cerca de 5 picos con espectros correspondientes a derivados de ácido cinámico, de los cuales, fue posible identificar y cuantificar ACLO y APCUM en los muestreos y fenotipos que se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Contenido de ácido clorogénico (ACLO) y ácido p-cumárico (APCUM) de los extractos AWA bajo estudio.

Muestreo	23 abril 2020		23 mayo 2020		03 junio 2020	
Fenotipo	ACLO mg/100g p.s.	APCUM mg/100g p.s.	ACLO mg/100g p.s.	APCUM mg/100g p.s.	ACLO mg/100g p.s.	APCUM mg/100g p.s.
Negra	n.d.	n.d.	9,2±0,2 ^F	5,86±0,08 ^a	6,2±0,2 ^A	n.d.
Blanca	n.d.	n.d.	n.d.	3,83±0,04 ^b	6,3±0,5 ^{A, B}	n.d.
Tardía	n.d.	6,7±0,4 ^e	60±3 ^G	16,9±0,6 ^c	74±2 ^C	11,8±0,4 ^f
Pinta	n.d.	n.d.	n.d.	3,8±0,2 ^b	51,8±0,1 ^{A, B, D}	n.d.
B54	n.d.	n.d.	n.d.	4,6±0,3 ^d	8,6±0,1 ^{A, B, C, E}	n.d.
P2N54	n.d.	n.d.	5,42±0,08 ^H	6,3±0,3 ^{a, e}	18,6±0,1 ^{B, C, E}	n.d.

n.d.: no detectado.

a, b: letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre concentraciones de APCUM.

A, B: letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre concentraciones de ACLO.

Como se muestra en la tabla 4, el contenido de ACLO en el primer muestreo se encontró bajo el límite de detección de la técnica para todos los fenotipos en estudio, sin embargo, si fue posible determinar el contenido de este ácido en el tercer muestreo para todos los fenotipos. En los muestreos 2 y 3, fue nuevamente el fenotipo tardía el que presentó el mayor valor de la variable en estudio, y tanto para este fenotipo como para el fenotipo P2N54, el contenido de ACLO aumentó significativamente entre los muestreos 2 y 3, mientras que para el fenotipo negra el contenido de ACLO disminuyó entre estos mismos muestreos. A diferencia de lo ocurrido para el AC, la variación de la concentración de este ácido entre fenotipos en el último muestreo es significativa con una variación del 92% aproximadamente.

Según lo reportado por Farhat y colaboradores, la presencia de ACLO parece ser altamente dependiente de la especie, puesto que solo reportan presencia de este compuesto en *S. argentea* con una variación de entre 6,05±0,04 mg ACLO/100 g h.s y 6,34±0,06 mg AC/100 g h.s dependiendo de la localidad en estudio (Farhat et al., 2013), similar al contenido de este polifenol en los fenotipos comerciales (negra y blanca) en el muestreo de junio, mientras que el fenotipo tardía excede

ampliamente el reportado por Farhat y colaboradores para *S. argentea* en los muestreos de mayo y junio. Los autores no lograron determinar la presencia de este compuesto en *S. officinalis*.

El ACLO es un éster de ácido cafeico y ácido quínico que se puede encontrar en productos alimenticios, siendo uno de los más consumidos, el café. Hasta la fecha, se suponen tres vías biosintéticas a partir del ácido cinámico, y, así como el AC, la evidencia muestra que la síntesis de este compuesto está ligada a la defensa frente a factores bióticos y abióticos (A. Kundu & Vadassery, 2019; Reine Judesse Soviguidi et al., 2022).

En cuanto al contenido de APCUM, solo para el fenotipo tardía se logró la cuantificación de este compuesto en los tres muestreos, presentando un aumento de cerca del 60% entre el primer y segundo muestreo para luego disminuir un 30% entre los muestreos de mayo y junio. La variabilidad entre fenotipos es de cerca del 78% en el segundo muestreo, donde, nuevamente el fenotipo tardía presentó el valor más alto de la variable. Dentro de los 34 compuestos que Amato y colaboradores lograron identificar tentativamente en extractos metanólicos de hojas de chíca, se encuentra el ácido cumárico-O-hexosa, y dos isómeros de ácido cumaroilquínico (Amato et al., 2015).

El APCUM es un compuesto de alta importancia en la ruta de los fenilpropanoides pues a partir de él se sintetizan no solo otros derivados de ácido cinámico, sino que también el compuesto 4-cumaroil-CoA, molécula que es el esqueleto básico del anillo B de los flavonoides (Anexo 2), de forma que el aumento de la concentración de este compuesto en el segundo muestreo podría estar ligado al aumento de la CA en la misma fecha, así como también con la mayor intensidad de los picos cromatográficos de la zona (ii) encontradas para las muestras del mismo muestreo.

En un estudio llevado a cabo por Li y colaboradores, los autores reportan que el APCUM reprime la expresión genética de sistemas proteicos capaces de translocar proteínas virulentas desde el patógeno *Dickeya dadantii*, una bacteria gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, hacia el hospedero vegetal. En este estudio, los autores investigaron 31 compuestos similares al ácido p-cumárico,

incluyendo al ácido cafeico, los que mostraron menor eficiencia en la represión genética que el ácido p-cumarico (Y. Li et al., 2009). Esta actividad reguladora del APCUM está ligada a la función defensora de compuestos fenólicos dentro del organismo vegetal. Por otra parte, se ha reportado que este compuesto fenólico estimula el crecimiento de los brotes de chíá (Nkomo et al., 2019), contrario a lo observado en otras especies donde actúa como aleloquímico, impidiendo o retrasando el crecimiento de los brotes de soya (Patterson, 1981; Zanardo et al., 2009).

Este compuesto se ha reportado previamente en otras especies de *Salvia* como *S. potentillifolia*, *S. nydeggeri* y *S. albimaculata* en concentraciones de 31,2±0,1 mg APCUM/100 g p.s, 21,5±0,1 mg APCUM/100 g p.s. y 42,4±0,4 mg APCUM/100 g p.s. respectivamente (KIVRAK et al., 2019), todas superiores a lo informado en esta tesis para los extractos AWA de hojas de *S. hispanica*. En un estudio realizado por Hanganu y colaboradores, los autores reportan el contenido de 5 derivados de ácido cinámico en extractos obtenidos mediante maceración a 60°C con una solución de etanol al 70% por 30 min. Los autores informan que el contenido de AC fue mayor que el de APCUM en las 6 especies de *Salvia* en estudio, donde *S. sclarea* presentó el mayor CAC con 77,6±0,1 mg AC/100 g p.s., mayor a lo encontrado para el fenotipo tardía en el segundo muestreo (26±1mg AC/100 g p.s.), mientras que *S. nutans* presentó el mayor contenido de APCUM con 39,92±0,03 mg APCUM/100 g p.s., también mayor a lo encontrado para el fenotipo tardía en el segundo muestreo (16,9±0,6 mg APCUM/100 g p.s.). La presencia de ACLO resultó altamente dependiente de la especie, y se encontró en concentraciones menores a 0,002 mg ACLO/100 g p.s. (Hanganu et al., 2019).

5.1.5.2. Zona (ii): Contenido de ácido rosmarinico

En la segunda zona de los cromatogramas registrados, se logró identificar y cuantificar ácido rosmarinico, y de forma tentativa, se clasificaron como flavonoides los picos mayoritarios de la zona con tiempos de retención 10,3 min, 12,5 min y 17 min debido a que presentan espectros de absorbancia concordantes con lo

reportado para compuestos de esta familia (Lattanzio et al., 2006; Rice-Evans et al., 1996), sin embargo, no fue posible la identificación de ellos. La Figura 15 resume los resultados obtenidos para la cuantificación de AR, el cual es un éster de ácido cafeico y ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

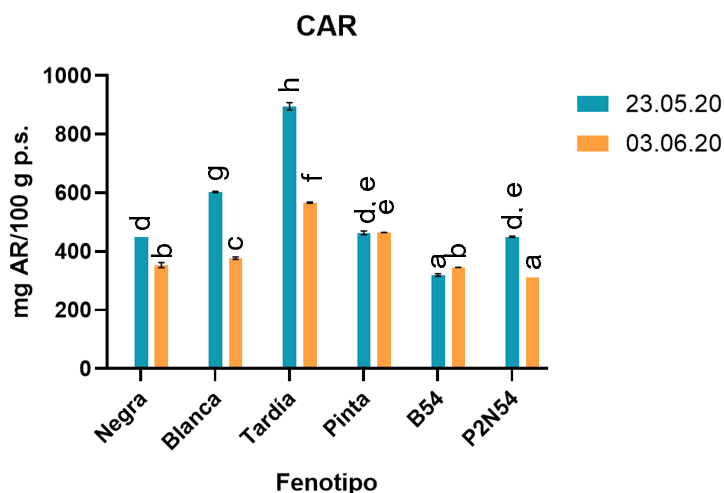


Figura 15. Contenido de ácido rosmarinico de los extractos AWA determinada por HPLC-DAD en las condiciones óptimas de extracción para los seis fenotipos en estudio en tres muestreos distintos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En primer lugar, no fue posible ni la identificación ni cuantificación de AR en el primer muestreo para ninguno de los fenotipos al igual que lo expuesto previamente para ACLO (tabla 4). En segundo lugar, como se muestra en la Figura 15, nuevamente el fenotipo que presenta mayor contenido de ácido rosmarinico (CAR) es el tardío en el segundo muestreo (895 ± 13 mg AR/100g h.s.) y se observa una disminución significativa en el tercer muestreo para la mayoría de los fenotipos con excepción de los fenotipos Pinta y B54. En tercer lugar, y siguiendo la tendencia de lo informado en otras especies de *Salvia* (Adimcilar et al., 2019; Farhat et al., 2013; Koşar et al., 2011), el CAR es mayor que el CAC en los muestreos 2 y 3. Así mismo, Adimcilar y colaboradores reportaron que el contenido de AR en extractos metanólicos de 14 especies del género *Salvia* varía desde 108 ± 1 mg AR/100 g p.s. en *S. chionantha* a 1.870 ± 200 mg AR/100 g p.s. en *S. caespitosa* (Adimcilar et al., 2019), de forma que los valores de CAR reportados en la presente tesis, se

encuentran dentro del rango reportado por estos autores en los dos muestreos. Farhat y colaboradores reportan que el CAR en *S. officinalis* disminuye significativamente entre las etapas vegetativa y de formación del fruto (Farhat et al., 2014) a diferencia de lo expuesto en la Figura 15 para los extractos AWA de *S. hispanica*. El valor más alto de CAR reportado por los autores para los extractos de hoja de *S. officinalis* fue de 1.172 ± 34 mg AR/100 g h.s., valor superior al máximo encontrado para el fenotipo tardía en el segundo muestreo (896 ± 13 mg AR/100 g p.s.), lo cual concuerda con otros trabajos donde el contenido de este polifenol en *S. officinalis* fluctúa entre 1.368 ± 10 mg AR/100 g p.s. y 1.838 ± 39 mg AR/100 g p.s. dependiendo de la localidad (Farhat et al., 2013), encontrándose también por sobre lo encontrado para los extractos AWA.

Al igual que el AC, ACLO y APCUM, el AR también cumple roles importantes en la defensa de las plantas frente a estresores externos, por ejemplo, se ha reportado que regula el intercambio gaseoso, además de aumentar la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa entre otros efectos, en un estudio realizado en *Arabidopsis thaliana* bajo estrés térmico (Arikan et al., 2022). Por otro lado, Kusano y colaboradores demostraron que el ácido rosmarinico inhibe el crecimiento de las raíces de *Sesamun indicum* y *Brassica rapa L. var. akana* entre un 40 y un 70% dependiendo de su concentración, mientras que el efecto del ácido cafeico fue dependiente de la especie, inhibiendo el crecimiento un 66% en *S. indicum* mientras que en *B. rapa L. var. akana*, la longitud de las raíces aumentó aproximadamente un 34% al comparar con los individuos control (no administración de ácidos) (KUSANO et al., 1998), lo cual sugiere un rol como aleloquímico de estos compuestos, controlando no solo la respuesta ante estresores, sino que también modulando el crecimiento de otras especies. Considerando esto último, puede ser importante que la concentración de AR sea baja en el primer muestreo si las plantas aún se encuentran en la etapa de crecimiento vegetativo, en favor de lograr un desarrollo adecuado de las raíces.

5.1.5.3. Zona (iii): Contenido de apigenina

En la zona comprendida entre los 20,1 y 38 min se pueden observar una gran cantidad de picos cromatográficos de baja intensidad y resolución. Dentro de ellos, se logró identificar y cuantificar apigenina (API) en los muestreos y fenotipos que se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de apigenina (API) de los extractos AWA bajo estudio.

Muestreo	23 abril 2020	23 mayo 2020	03 junio 2020
Fenotipo	API mg/100g p.s.	API mg/100g p.s.	API mg/100g p.s.
Negra	n.d.	28,0±0,5 ^a	n.d.
Blanca	n.d.	26,3±0,2 ^a	n.d.
Tardía	n.d.	55,3±0,6 ^e	76±3 ^f
Pinta	n.d.	32±1 ^b	n.d.
B54	n.d.	32,9±0,2 ^b	n.d.
P2N54	n.d.	41,4±0,5 ^c	51±3 ^d

n.d.: no detectado.

^{a, b}: letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Al igual que en el caso del APCUM, solo en el segundo muestreo se logró determinar el contenido de API (CAPI) para todos los fenotipos en estudio, nuevamente con el fenotipo tardía presentando el mayor valor de la variable. En este muestreo la variabilidad entre fenotipos alcanza un valor cercano al 52%, con los fenotipos comerciales siendo los con menor CAPI en dicho muestreo. Para los fenotipos tardía y P2N54 fue posible determinar la concentración de este compuesto en el tercer muestreo, y para ambos fenotipos, el CAPI aumentó entre un 20 y un 28% entre los muestreos de mayo y junio.

Dentro del metabolismo vegetal, la apigenina se sintetiza relativamente temprano en la ruta de los fenilpropanoides y ha sido reportada en otras especies de *Salvia* procedentes del noreste de la República de Moldova en concentraciones que abarcan desde los 4,8±0,1 mg API/100 g p.s. en *S. aetiopsis*, y *S. verticillata* y los 121,5±0,2 mg API/100 g p.s. en *S. austriaca* (Hanganu et al., 2019). Considerando que los autores recolectaron las muestras de hoja en el período de floración de las plantas, los resultados resumidos en la tabla 5 para el segundo muestreo (floración)

se encuentra dentro del rango mencionado para todos los fenotipos en estudio. En otro estudio, Farhat y colaboradores lograron determinar el CAPI en los tres muestreos realizados (etapa vegetativa, de floración y de producción de fruto), mostrando un aumento en su concentración a medida que la planta madura (Farhat et al., 2014), al igual que lo encontrado para los fenotipos tardía y P2N54 (tabla 5). Los autores informan que el valor más alto de CAPI fue de $12,3 \pm 0,6$ mg API/100 g h.s. en la etapa de formación de los frutos, el que resulta inferior a lo expuesto en la tabla 5 para los extractos AWA de los fenotipos tardía y P2N54 en el tercer muestreo.

La apigenina es una flavona que ha sido reportada previamente en hojas de chía por Amato y colaboradores, aunque en este trabajo los autores no lograron determinar la presencia de la aglicona (apigenina), pero sí de apigenina-8-C-glucósido (vitexina), apigenina-C-pentosa, apigenina-7-O-glucósido y apigenina-O-glucurónido además de derivados de vitexina (Amato et al., 2015).

5.2. Extractos secuenciales

5.2.1. Rendimiento de extracción

Los extractos secuenciales se obtuvieron a partir de 13,7149 g de hoja seca para las muestras del fenotipo de semilla negra y 6,6056 g de hoja seca para las muestras del fenotipo de semilla blanca. La tabla 6 resume la eficiencia de extracción para cada extracto, así como también la masa final de extracto obtenida.

Estos resultados muestran que el mayor rendimiento de extracción se obtuvo para los extractos de hexano (EHEX) para ambos fenotipos, seguido de los extractos de etanol (EET). La eficiencia de extracción total fue de un 51,185% para las hojas del fenotipo negro y 68,172% para las hojas del fenotipo blanco.

Tabla 6. Rendimiento de extracción y masa obtenida para los 8 extractos secuenciales.

Extracto	Extracción (%)	Masa (g)
EET-N	11,279	1,5507
EAE-N	2,389	0,3285
EDCM-N	1,727	0,2374
EHEX-N	35,790	4,9231
EET-B	14,668	0,9689
EAE-B	7,267	0,4800
EDCM-B	3,043	0,2010
EHEX-B	43,194	2,8532

5.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayos ORAC

Al igual que para los extractos AWA, se determinó la CA de los 8 extractos secuenciales mediante las metodologías ORAC-FL, ORAC-PGR y ORAC-EPR. Como se estableció anteriormente, los resultados de ORAC-FL se utilizarán de forma referencial para la discusión general de CA considerando que esta técnica se utiliza para mantener una base de datos de CA por el INTA en nuestro país. La

Figura 16 resume los resultados obtenidos para los 8 extractos secuenciales, expresados tanto por 100 g de extracto seco (Figura 16a), como por 100 g de hoja seca (Figura 16b).

Como se muestra en la Figura 16a, los extractos EET fueron los que mostraron mayor CA, la que disminuye significativamente junto con la polaridad del extracto utilizado para la extracción. Considerando la polaridad de los compuestos fenólicos, solventes como el etanol y el acetato de etilo logran solubilizar de mejor manera estos compuestos y, con ello, aumenta el contenido de polifenoles en los extractos EET y EAE con respecto a los extractos obtenidos con solventes más apolares como es el caso de EDCM y EHEX. De la misma forma, dadas las características más apolares de estos últimos extractos, es posible que contengan compuestos más apolares, no necesariamente antioxidantes. Otra arista por considerar hace referencia a que la técnica ORAC utiliza como medio de reacción una solución acuosa, y, por tanto, es posible que los compuestos de características más apolares no se encuentren totalmente solubilizados en este medio y, por consiguiente, haya menor disponibilidad de antioxidantes para retardar la oxidación de la molécula sonda, lo que se traduce en una menor CA. Adicionalmente, tomando en cuenta que ORAC-FL entrega información estequiométrica de los antioxidantes presentes en cuanto al número de grupos hidroxilo disponibles para reaccionar con los RL generados durante el experimento, a partir de los resultados, se puede decir que los extractos etanólicos presentaron una mayor cantidad de antioxidantes, la cual disminuyó junto con la polaridad del solvente utilizado para la extracción.

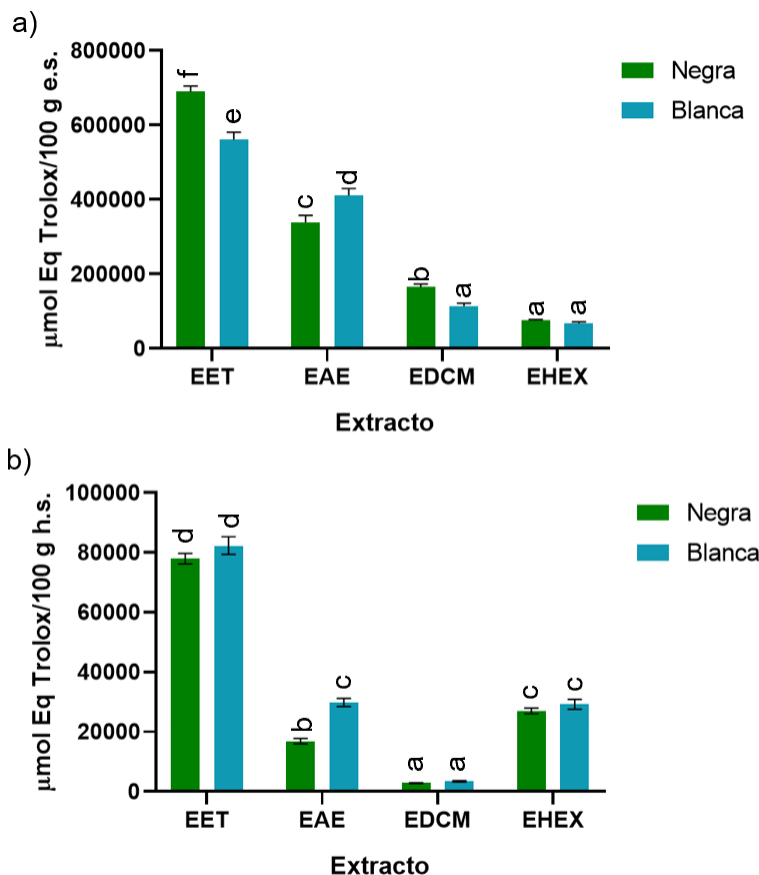


Figura 16. CA determinada por ORAC-FL para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CA en función a la masa de extracto seco; b) CA en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para poder comparar y estandarizar los resultados de CA, se expresaron en función a la masa de hoja utilizada para la extracción, obteniéndose los resultados que muestra la Figura 16 b. El valor más alto de CA lo obtuvo el EET-B con 82.298 ± 2.952 µmol Eq. Trolox/100 g h.s. seguido del EET-N con 77.986 ± 1.741 µmol Eq. Trolox/100 g h.s. mientras que los valores más bajos fueron para los EDCM con 3.452 ± 349 µmol Eq. Trolox/100 g h.s. y 2.859 ± 132 µmol Eq. Trolox/100 g h.s. para los fenotipos blanca y negra respectivamente. Al comparar estos resultados con la CA reportada por el INTA para frutas y hortalizas (Figura 9), ambos EET presentan una CA similar a la del calafate (72.425 ± 9.376 µmol Eq. Trolox/100 g p.s.), superior a la de la espinaca (36.213 ± 1.140 µmol Eq. Trolox/100 g p.s.) e inferior a la de la albahaca (193.335 ± 3.673 µmol Eq. Trolox/100 g p.s.), mientras que al comparar con

los extractos AWA, los EET de ambos fenotipos presentan una CA menor a la reportada para el segundo muestreo (cerca a los 100.000 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100\text{ g}$ p.s.).

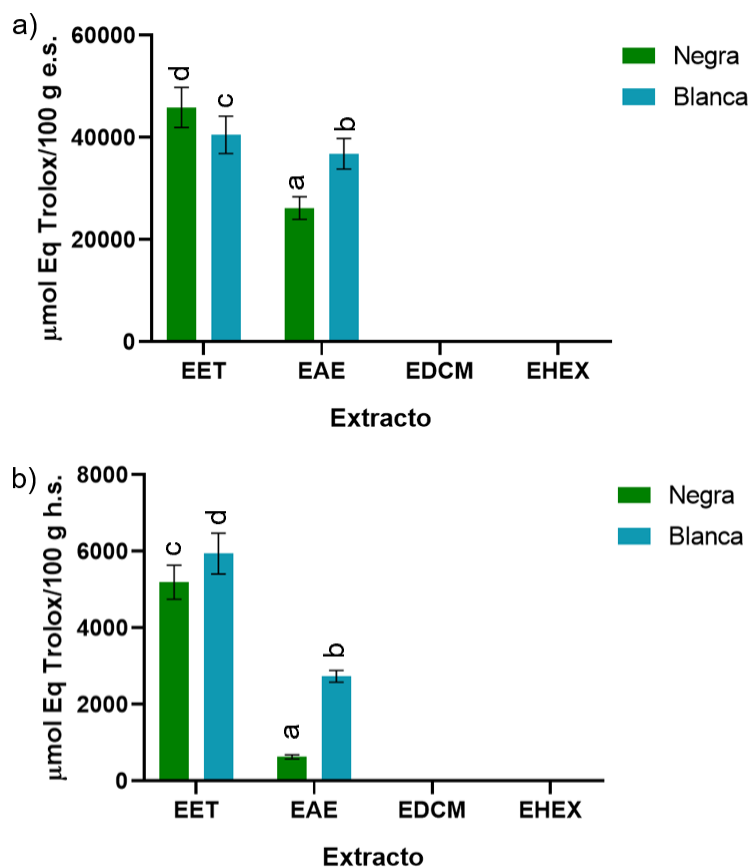


Figura 17. CA determinada por ORAC-PGR para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CA en función a la masa de extracto seco; b) CA en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al igual que los resultados de ORAC-FL, los resultados de ORAC-PGR se expresaron tanto por 100 g de extracto seco como por 100 g de hoja seca y se resumen en las Figuras 17 a y 17 b respectivamente. En primer lugar, al realizar el experimento tal como se describió en la respectiva metodología, no fue posible observar claramente la CA de los EDCM y EHEX, de forma que se procedió a doblar la concentración de la muestra, sin embargo, no fue posible determinar la CA (en cuanto a la reactividad de los extractos) por ORAC-PGR para ninguno de los

fenotipos comerciales, lo cual puede deberse a que, al ser una técnica de absorbancia, ORAC-PGR resulta menos sensible y su límite de detección es mayor que ORAC-FL. A pesar de esto, y al igual que para ORAC-FL, fueron los EET los que presentaron mayor CA para los dos fenotipos con valores de 5.943 ± 532 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100$ g h.s. para el fenotipo blanca y de 5.191 ± 443 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100$ g h.s. para el fenotipo negra.

Tomando en cuenta que los resultados de ORAC-PGR son una medida de la reactividad de los antioxidantes presentes en la muestra (López-Alarcón & Lissi, 2006), de forma que lo expuesto en las Figura 16 y 17, muestra que los antioxidantes presentes en los EET no solo son los que presentaron mayor cantidad de antioxidantes (ORAC-FL), sino que también son los que presentan mayor reactividad de la serie (ORAC-PGR). Al contrario que en ORAC-FL, en este caso, si se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre fenotipos tanto para los EET como para los EAE, mostrando una dependencia de la reactividad de los antioxidantes con el fenotipo en estudio, al igual que lo expuesto para los extractos AWA (Figura 10).

Al comparar estos resultados con la CA determinada por ORAC-PGR de los extractos AWA en el segundo muestreo (19.784 ± 912 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100$ g h.s. para el fenotipo negra y 15.914 ± 718 $\mu\text{mol Eq. Trolox}/100$ g h.s. para el fenotipo blanca; Figura 10), se observa que la CA de los extractos secuenciales es menor que para los extractos AWA, lo que estaría dando indicios de que, a pesar de que los EET presentan mayores valores de ORAC-FL que los extractos AWA (Figura 8), la reactividad global de los antioxidantes presentes en los extractos AWA es mayor. Es importante mencionar que la CA determinada por las metodologías expuestas en este trabajo hacen referencia a la CA global de los extractos en cuestión, por lo que no es posible descartar algún efecto sinérgico o antagónico de los compuestos presentes en ellos, cuya presencia depende de la metodología de extracción. De esta forma, cada extracto presentará interacciones distintas dependiendo de su composición química y de la concentración de cada compuesto.

Para complementar la información entregada por ORAC-FL y ORAC-PGR, se determinó el % de inhibición de los extractos secuenciales mediante la técnica de EPR utilizando MCPIO como atrapador de espín. En esta técnica, se registra el efecto de los extractos frente a los RL formados a partir de la descomposición térmica del AAPH, permitiendo la evaluación directa de estos. La cuantificación del efecto antioxidante de los extractos se evalúa con la premisa de que, al añadir la muestra, la intensidad de la señal del espín aducto disminuye con respecto al blanco debido a que la reacción entre los antioxidantes de la muestra y los radicales disminuye la concentración de los últimos. Adicionalmente, es posible identificar la naturaleza del radical formado mediante la forma del espectro y el valor de la constante de acoplamiento, de forma que es posible separar la contribución de cada radical al estado redox del sistema.

Considerando la forma del espectro registrado (Figura 18), y la constante de acoplamiento obtenida ($\alpha H=13,2$) es posible decir que los radicales atrapados por el MCPIO corresponden a radicales hidroxilo y que no se observan señales correspondientes a otros radicales. El cálculo del % apagamiento (%APA) se realizó mediante la ecuación (1) utilizando las áreas resultantes de la integración de la segunda señal espectral. Analizando los resultados que se resumen en la Figura 19, es importante notar que dado la imposibilidad de controlar completamente la concentración de radicales formados a partir de la descomposición del AAPH, la variabilidad de los resultados fue mayor a la esperada en todos los casos.

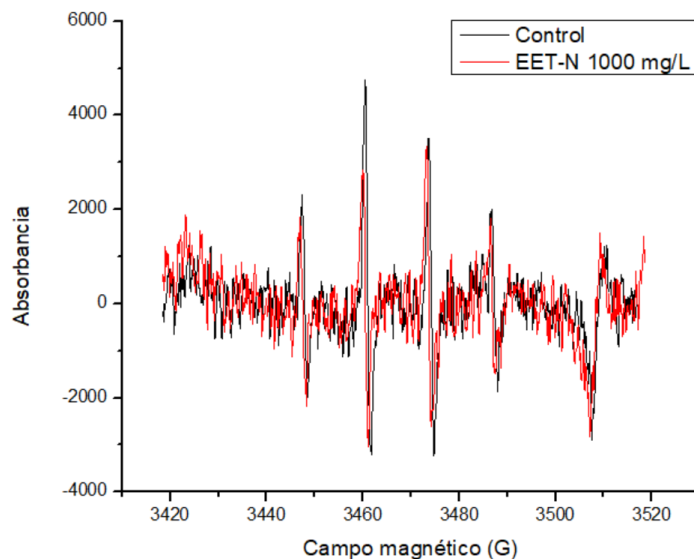


Figura 18. Espectros de EPR registrados utilizando MCPIO como atrapador para un blanco experimental (negro) y el EET-N (rojo).

Por otra parte, se observó una disminución significativa del %APA con el aumento de la polaridad del solvente de extracción (Figura 19 a), tendencia contraria a lo encontrado por ORAC-FL. Dorta y colaboradores (2015) informaron que durante el experimento de ORAC-FL, se forman tanto radicales peroxilo como alcoxilo, por lo que la CA determinada por esta metodología hace referencia a la acción de los antioxidantes ante esta mezcla de radicales (Dorta, y otros 2015), mientras que una de las características de la determinación de la CA por EPR, es la posibilidad de su evaluación frente a radicales alcoxilo, por lo que este resultado podría estar mostrando una diferencia en la reactividad de los antioxidantes frente a los radicales alcoxilo (EPR) y frente a la mezcla de radicales alcoxilo y peroxilo (ORAC-FL). Al comparar la CA de los extractos, no fue posible determinar diferencias estadísticamente significativas entre fenotipos para ningún caso.

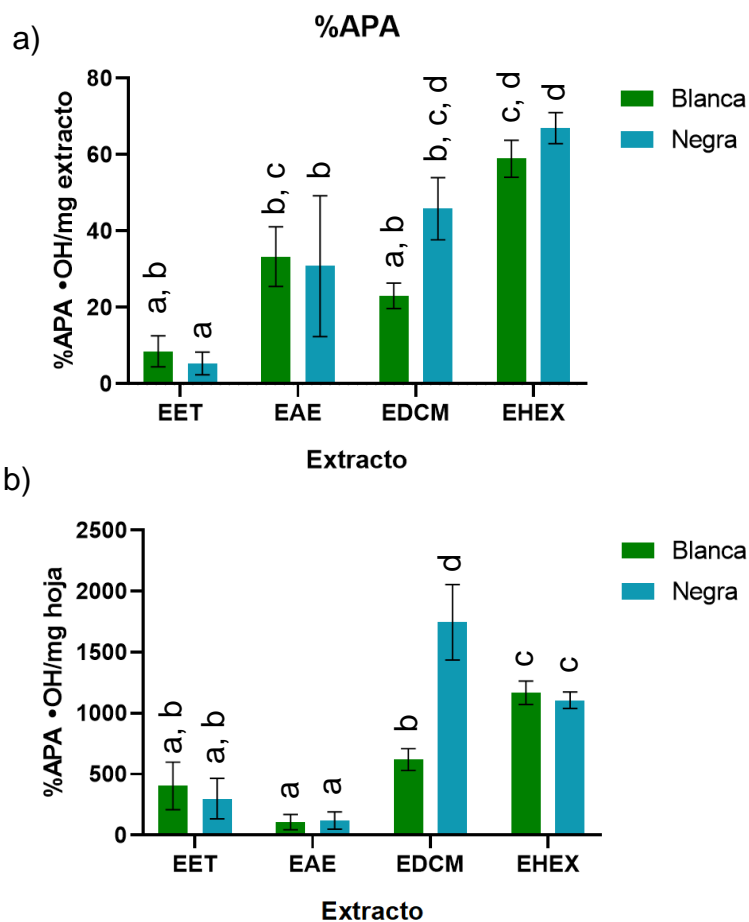


Figura 19. % de apagamiento del radical alcoxilo calculado utilizando la ecuación 1. a) CA en función de la masa de extracto; b) CA en función de la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

La Figura 19 b muestra los resultados normalizados por mg de hoja seca, mostrando de igual manera la misma tendencia con la polaridad del solvente. A diferencia de los resultados por mg de extracto seco (Figura 19 a), al normalizar por mg de hoja seca, es posible evidenciar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre fenotipos para el caso de los extractos EHEX y EDCM, mas no para los demás casos.

5.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante mediante DPPH

Al igual que para los extractos AWA, la CA se determinó utilizando la metodología DPPH y calculando el %APA mediante la ecuación 1 (sección 4.2.3.3.). Como se mencionó anteriormente, a diferencia de las metodologías ORAC, la CA

determinada por DPPH utiliza un medio de reacción que permite evaluar la acción de los antioxidantes por medio del mecanismo ET principalmente, de forma que es posible complementar los datos anteriormente discutidos. Los resultados obtenidos para los 8 extractos secuenciales se resumen en la Figura 20.

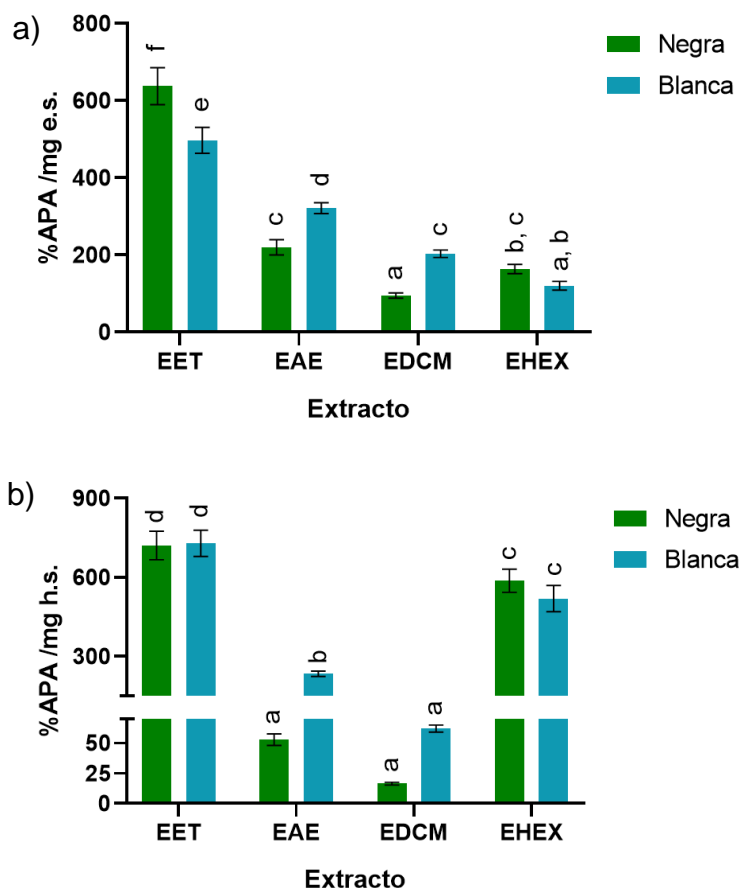


Figura 20. % de apagamiento del radical DPPH calculado utilizando la ecuación 1. a) CA en función de la masa de extracto; b) CA en función de la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Al igual que para ORAC-FL y ORAC-PGR, se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) de la CA junto con la polaridad del solvente utilizado (Figura 20 a), con la excepción de la comparación entre EDCM-B y EHEX-B, donde esta tendencia se rompe. De igual manera, para la mayoría de los casos, se observan diferencias significativas entre fenotipos salvo para los EDCM. Comparando con los resultados obtenidos para los extractos AWA (Figura 11), se observa que al comparar ambos fenotipos comerciales (blanca y negra), el único muestreo en el que no se

encontraron diferencias significativas entre ambos fue el segundo, muestreo que mostró la mayor CA en todas los ensayos ORAC. Al expresar los resultados en función de la masa de hoja seca presente en la celda de reacción (Figura 20 b), se muestra que los EHEX presentan una CA significativamente superior a los EAE para ambos fenotipos. Es posible que el medio de reacción (metanol) permita la solubilización de compuestos de características más apolares y que por esa razón, a diferencia de ORAC, los EHEX muestren mayor CA que los EAE y EDCM.

En un trabajo de Koşar y colaboradores, los autores realizaron extracciones soxhlet secuenciales de partes aéreas de *S. halophila* utilizando hexano, acetato de etilo, metanol, y una mezcla de metanol y agua al 50% en la extracción secuencial, y paralelamente realizaron una extracción acuosa. Los autores informan que la CA por DPPH del extracto realizado con acetato de etilo presentó la mayor CA de la serie seguido del extracto metanol 50%. Adicionalmente los autores reportan que no fue posible determinar la CA del extracto realizado con hexano (Koşar et al., 2011). En este trabajo, los autores realizan las extracciones durante 8 h seguidas, lo cual no necesariamente asegura una extracción exhaustiva, razón por la cual el extracto con hexano puede haber marcado una CA por debajo del límite de detección de la técnica empleada. Por otra parte, como la composición química del extracto depende fuertemente de la muestra, así como del solvente utilizado y de la técnica de extracción, es posible que las diferencias entre ambas especies de *Salvia* se reflejen en el cambio de tendencia de la variación de la CA con la polaridad del solvente.

5.2.4. Capacidad antioxidante celular

La capacidad antioxidante celular (%CAA) tiene como objetivo evaluar la CA global de los extractos en medio celular, es decir, no solo la acción antioxidante directa de los antioxidantes presentes en los extractos al reaccionar con los RL, sino que también la posible modulación de los sistemas antioxidantes celulares (Kumar & Pandey, 2013). La reacción de la sonda (DCFH₂) con las ERO genera un producto fluorescente, de forma que un extracto o muestra que disminuya la fluorescencia del sistema, poseerá CA celular (CAA).

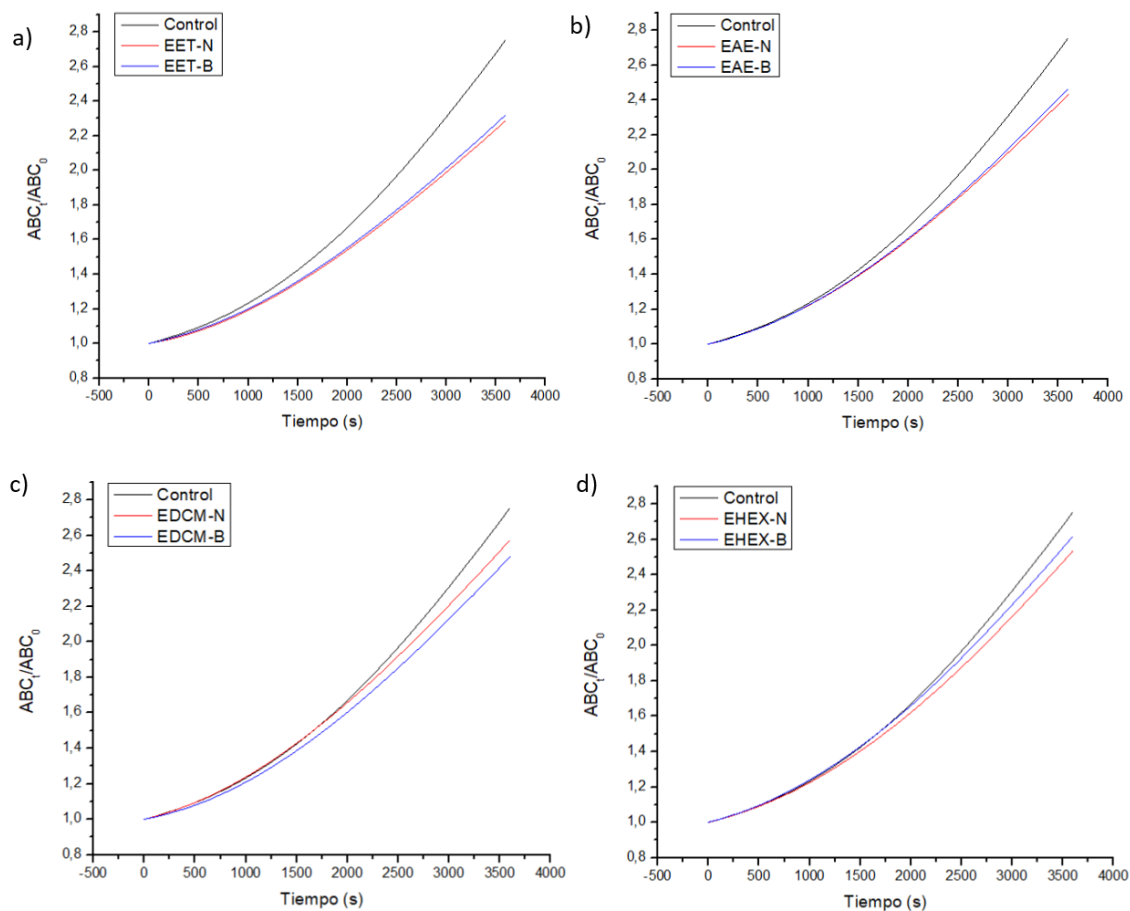


Figura 21. Capacidad antioxidante celular (%CAA) evaluada en células VERO de a) EET; b) EAE; c) EDCM y d) EHEX.

Los resultados resumidos en la Figura 21, muestran que todos los extractos presentaron una CAA entre 1,6 y 10%, y que esta es dependiente del solvente de extracción, disminuyendo junto con la polaridad de este. Los EET presentaron la mayor CAA de la serie con valores de $10 \pm 2\%$ para EET-N y $8,3 \pm 0,8\%$ para EET-B, mientras que la CAA de los EHEX y EDCM no superó el 5,2%. En la reciente publicación derivada de este trabajo de tesis (Zúñiga-López et al., 2021), se publicaron resultados de CAA para extractos secuenciales etanólicos de hojas de chía de un cultivo realizado el año 2016, cuyos resultados son comparables con los presentados en la Figura 12, de extractos obtenidos del cultivo del año 2020, con la sola diferencia que para los extractos del 2016, la CAA del extracto EET-B fue mayor que la del EET-N ($28 \pm 2\%$ y $13,2 \pm 0,6\%$ respectivamente), tendencia que no se observa para los extractos del año 2020.

Para el caso de la CAA, es necesario que los compuestos activos presentes en los extractos difundan hacia el citoplasma para ejercer su acción antioxidante, en este sentido, es posible que haya una mayor retención de los compuestos de carácter más apolar en la membrana plasmática, y que el porcentaje de difusión sea menor que para los compuestos más polares, incidiendo directamente en la CAA. La evidencia muestra que la difusión pasiva de los flavonoides es baja (Ran et al., 1988), y que existen transportadores que moderan la absorción rápida de estos compuestos por células endoteliales humanas (Schramm et al., 1999). Schramm y colaboradores concluyen en su trabajo que estos transportadores pueden transportar una amplia variedad de compuestos hidroxilados y que su actividad aumenta en presencia de ATP, lo que podría estar definiendo la acción global de los extractos

5.2.5. Determinación del contenido fenólico total

El contenido fenólico total (CFT) se determinó utilizando la técnica de Folin-C para los 8 extractos secuenciales y los resultados se resumen en la Figura 22. Nuevamente se observa una disminución significativa de la variable junto con la polaridad del solvente (Figura 22 a), donde los EET fueron los que presentaron mayor CFT de la serie, con el fenotipo negra presentando un valor promedio de 76 ± 1 g EAG /100 g e.s. mientras que los EHEX presentan cerca de 7 veces menos CFT. Al estandarizar los resultados por masa de hoja (Figura 22 b) se observa que el CFT de los EHEX es mayor que los EAE y EDCM, rompiendo la tendencia al decrecimiento del CFT junto con la polaridad del solvente. Es importante recordar que como se mencionó anteriormente, esta técnica presenta comúnmente interferencia de los compuestos capaces de reducir el reactivo de Folin, los que no necesariamente son compuestos fenólicos, de forma que, si bien los EHEX presentan mayor CFT que los EAE, es posible que esta respuesta instrumental esté ligada a la presencia de otros compuestos reductores de carácter más apolar.

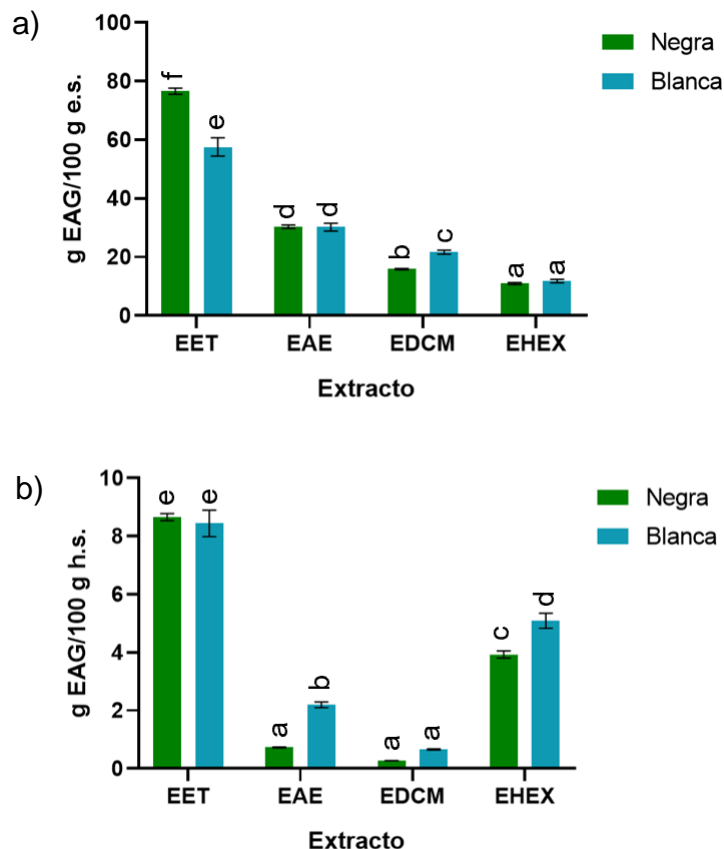


Figura 22. CFT determinado por Folin-C para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CFT en función a la masa de extracto seco; b) CFT en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, Koşar y col. reportan que el CFT de los extractos secuenciales de *S. halophila* varía entre $10,6 \pm 2$ g EAG/100 g p.s. para el extracto metanol 50% y $2,92 \pm 0,06$ g EAG/100 g p.s para el extracto de hexano, aunque la tendencia con la polaridad del solvente no es tan clara, puesto que el extracto realizado con metanol presentó menor CFT que el extracto realizado con acetato de etilo (Koşar et al., 2011). Por otra parte, al comparar con la base de datos que mantiene el INTA, los extractos EET presentan un CFT similar al reportado para albahaca (7.446 ± 173 mg EAG/100 g p.s) y aproximadamente 2,5 veces más que lo reportado para maqui (3.116 ± 155 mg EAG/100 g p.s) y perejil (3.291 ± 100 mg EAG/100 g p.s), lo que situaría a las hojas de chíá como una de las matrices vegetales con mayor CFT del listado.

5.2.6. Determinación del perfil fenólico

El perfil fenólico de los 8 extractos secuenciales se determinó mediante HPLC-DAD-FLD y espectrometría de masas según lo expuesto en las secciones 4.2.7 y 4.2.8. La Figura 23 muestra los cromatogramas obtenidos a 278 nm mediante HPLC-DAD de los 4 extractos del fenotipo blanca. Al igual que para el caso de los extractos AWA, se logró la identificación y cuantificación de ácido clorogénico (ACLO), ácido cafeico (AC), ácido p-cumarico (APCUM), ácido rosmarinico (AR) y apigenina (API) en concentraciones dependientes del solvente utilizado para la extracción.

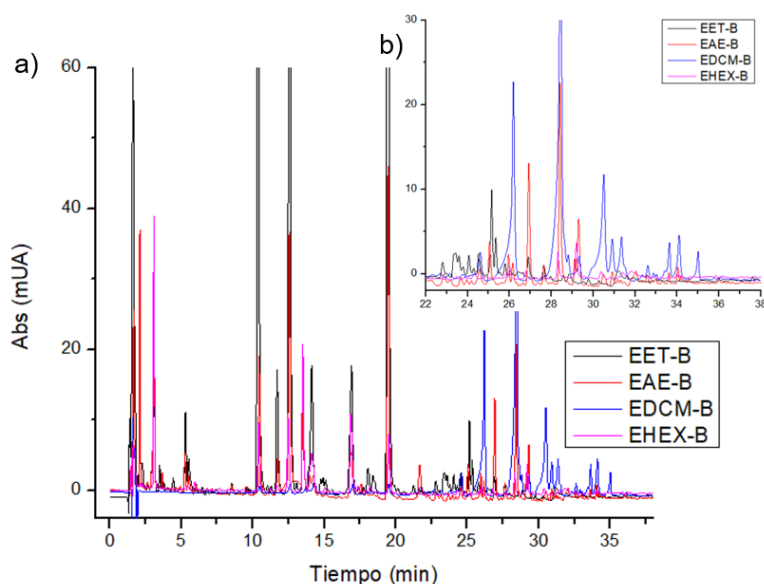


Figura 23. Cromatogramas registrados a 278 nm para los 4 extractos secuenciales (EET, EAE, EDCM y EHEX) para el fenotipo blanca donde a) cromatograma completo y b) ampliación de la zona (iii) (22 a 36 min).

Al comparar los cromatogramas obtenidos para los 8 extractos (Figura 23 y anexo 8) se puede observar un mayor número de picos cromatográficos para los extractos más polares (EET y EAE) de ambos fenotipos, lo cual se encuentra dentro de lo esperado considerando que los compuestos fenólicos presentan mayor afinidad por solventes de características más polares. Adicionalmente, el mayor número de picos cromatográficos en estos extractos es concordante con la mayor capacidad antioxidante y contenido fenólico total que estos presentan (Figuras 16, 17, 20, 21 y 22).

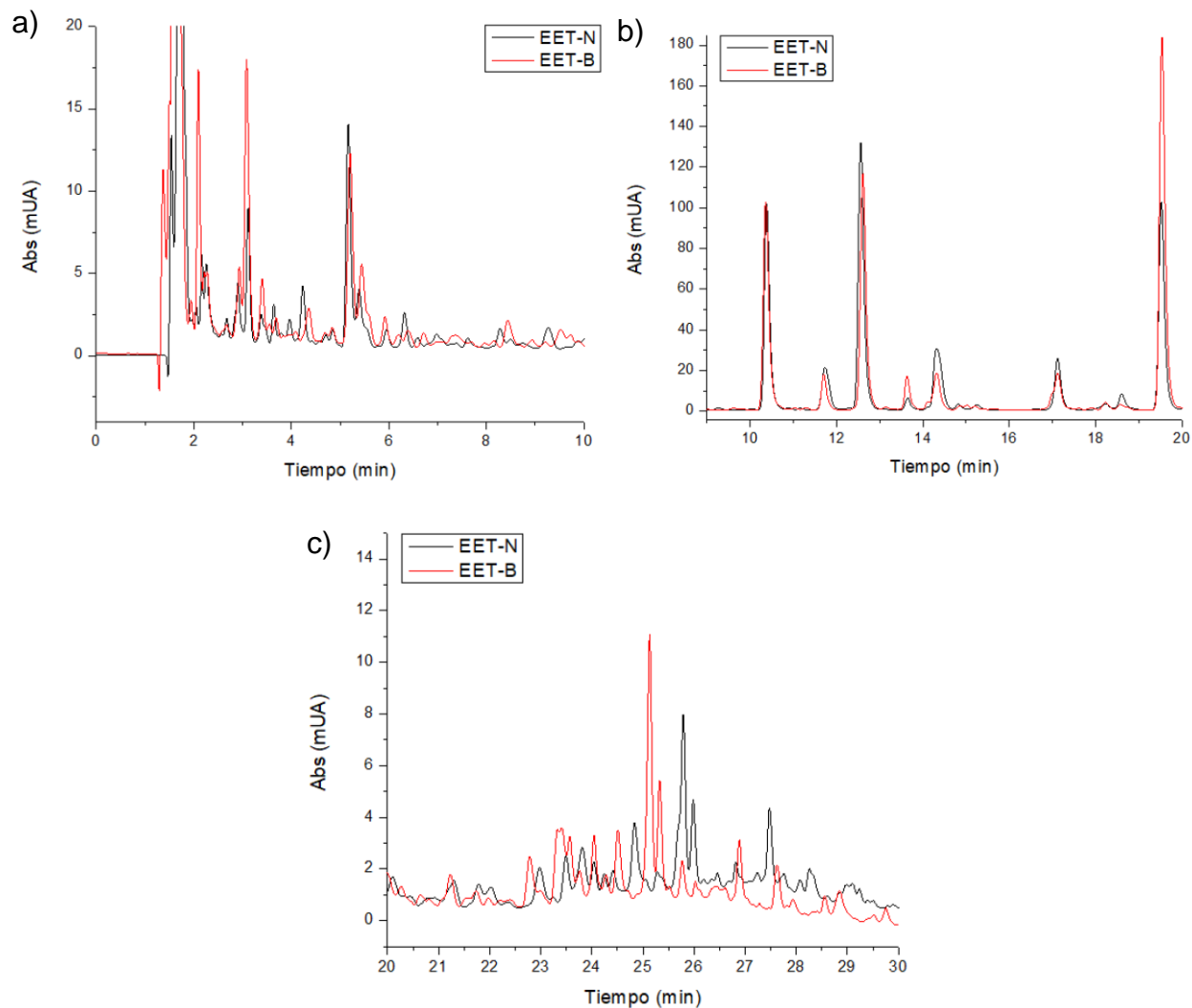


Figura 24. Comparación de los cromatogramas registrados a 278 nm para los EET de ambos fenotipos comerciales en estudio, donde a) zona (i); b) zona (ii) y c) zona (iii). EET-N: extracto etanólico del fenotipo negra; EET-B: extracto etanólico del fenotipo blanca.

Por otro lado, comparando los cromatogramas de los EET de ambos fenotipos, se puede observar que presentan perfiles fenólicos similares, principalmente en la zona (ii), la que presenta los mismos picos mayoritarios donde el último corresponde a ácido rosmarínico (AR). Las diferencias entre fenotipos en la zona (i) se encuentra mayoritariamente en los picos de menor área, cuyos espectros indican presencia de derivados de ácidos cinámicos. En la zona (iii) se encuentra la mayor variabilidad fenotípica, donde tanto el número como la intensidad de las señales es distinta.

Adicionalmente, a un mismo tiempo de retención, los espectros (y por ende la identidad) de los picos cromatográficos no coinciden (Figura 24).

Nuevamente para facilitar el análisis del perfil fenólico encontrado para los extractos secuenciales, la corrida cromatográfica se dividió en 3 zonas, al igual que para los extractos AWA.

5.2.6.1. Zona (i); contenido de ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido p-cumarico

Así como para los extractos AWA, en la zona (i) se logró identificar y cuantificar el contenido de 3 derivados de ácido cinámico: el ácido clorogénico (ACLO), ácido cafeico (AC) y ácido p-cumarico (APCUM). En esta zona también se presentan picos cromatográficos de menor intensidad cuyos espectros de absorbancia corresponden a derivados de ácido cinámico, cuya identidad no coincide con ninguno de los patrones utilizados.

En cuanto a la concentración de AC nuevamente se observa una disminución significativa conforme la polaridad del solvente disminuye, de forma que los EET de ambos fenotipos fueron los que presentaron un significativamente mayor CAC como se muestra en la Figura 25, con valores de $2,5 \pm 0,3$ mg AC/100 g e.s. para EET-B y $2,80 \pm 0,02$ mg AC/100 g e.s. para EET-N, concentraciones que expresadas en función de la masa de hoja utilizada para la extracción, resultan ser de $0,37 \pm 0,04$ mg AC/100 g h.s. y $0,317 \pm 0,002$ mg AC/100 g h.s. respectivamente, diferencia que resulta estadísticamente significativa entre fenotipos. Para el caso de los EDCM, si bien fue posible identificar el pico correspondiente al ácido cafeico, su área se encontró bajo el límite de cuantificación de la técnica para ambos fenotipos. Al comparar el CAC de los EAE y EHEX resumidos en la Figura 25 b, es posible observar que la concentración de AC es muy similar en ambos tipos de extractos. Es posible que parte del contenido de AC reportado en los extractos de hexano sea consecuencia de la presencia de este compuesto en la pared celular (Riaz et al., 2018), de forma que su concentración en los EHEX puede deberse en parte a un posible arrastre mecánico y no necesariamente a su afinidad por el solvente según polaridad.

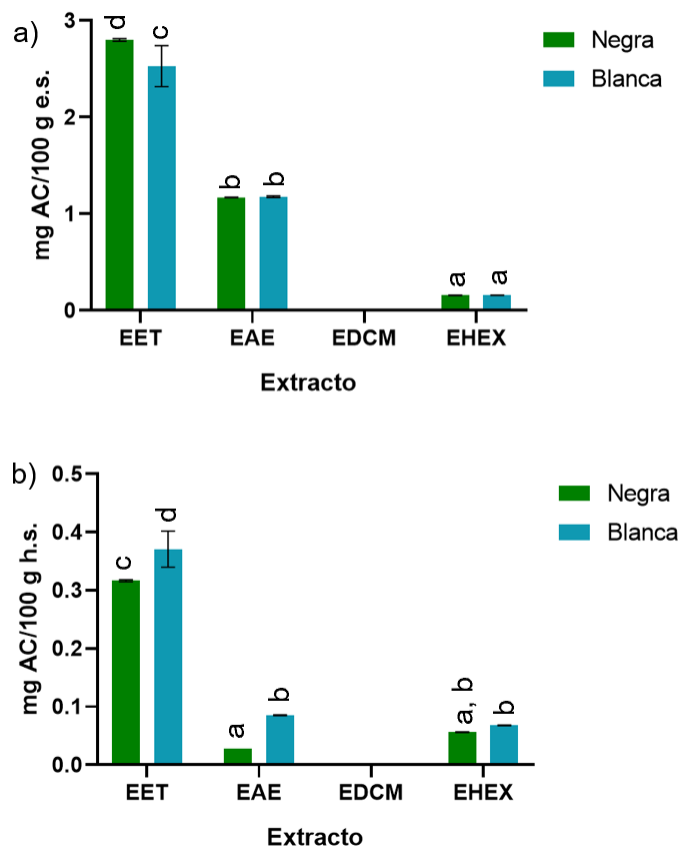


Figura 25. Contenido de ácido cafeico (CAC) para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CAC en función a la masa de extracto seco; b) CAC en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al igual que para el caso de los extractos AWA, se logró determinar la presencia de otros compuestos derivados de ácido cinámico como el ACLO, y el APCUM, cuyas concentraciones se resumen en las tablas 7 y 8. Así mismo, al igual que para el caso de los extractos AWA, no fue posible determinar la presencia de estos compuestos en todas las muestras analizadas, en especial el ACLO, que solo fue posible su determinación en los extractos del fenotipo negra, mientras que la presencia del APCUM solo se logró determinar en los extractos de carácter más polar (EET y EAE).

Tabla 7. Contenido de ACLO en los extractos secuenciales del fenotipo Negra.

Extracto	Negra	
	mg/100g e.s.	mg/100g h.s.
EET	0,334±0,006 ^b	0,038±0,001 ^b
EAE	0,157269±1x10 ⁻⁶ ^a	0,00376691±2x10 ⁻⁸ ^a
EDCM	n.d.	n.d.
EHEX	0,362±0,001 ^b	0,1200±0,0005 ^c

n.d.: no detectado.

^{a, b}: letras distintas en una misma columna indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Como se expuso anteriormente para los extractos AWA (sección 5.1.5.), la presencia de ACLO parece ser fuertemente dependiente de la especie, y no es habitualmente reportado en extractos de *Salvia* (Hanganu et al., 2019). Los resultados expuestos en esta tesis dan cuenta que la presencia de este compuesto podría depender también del fenotipo en estudio, aunque no es posible descartar que la concentración de este compuesto se encuentre bajo el límite de detección de la técnica utilizada en el caso de los extractos secuenciales del fenotipo blanca.

A diferencia de lo encontrado para el AC, la concentración de ACLO en el EHEX-N es importante y no presenta diferencias estadísticamente significativas con el contenido de este polifenol en el extracto etanólico (tabla 7). Considerando que este compuesto es un éster de los ácidos cafeico y quínico, sería esperable que su concentración fuera mayor en los extractos realizados con etanol y acetato de etilo que en el extracto de hexano, por lo que es posible que esta tendencia sea producto de la presencia de este compuesto en la pared celular (Clifford et al., 2017), sobre todo considerando que uno de los roles que los derivados de ácido cinámico cumplen en el metabolismo de las plantas, es actuar como precursores en la biosíntesis de lignina (Clifford et al., 2017; Riaz et al., 2018).

Tabla 8. Contenido de APCUM en los extractos secuenciales de los fenotipos Negra y Blanca.

Extracto	Negra		Blanca	
	mg/100g e.s.	mg/100g h.s.	mg/100g e.s.	mg/100g h.s.
EET	0,30±0,01 ^a	0,033±0,001 ^B	0,53±0,03 ^b	0,077±0,004 ^C
EAE	0,67±0,02 ^d	0,0161±5x10 ⁻⁴ ^A	0,41±0,01 ^c	0,030±0,001 ^B
EDCM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EHEX	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado.

^{a, b}: letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores expresados por 100 g de extracto seco (/100 g e.s.).

^{A, B}: letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores expresados por 100 g de hoja seca (/100 g h.s.).

En cuanto al contenido de ácido p-cumarico, se pudo determinar la presencia de este compuesto en los extractos de carácter más polar de los dos fenotipos comerciales, lo cual se encuentra de acuerdo con la mayor afinidad de este compuesto por solventes de características más polares. Siguiendo el razonamiento planteado anteriormente para el ACLO concerniente a su presencia en los EHEX de ambos fenotipos, se podría decir que el APCUM no se encuentra en concentraciones suficientes para su detección por la técnica empleada en la pared celular de las hojas de chía, lo que podría estar ligado a su importancia metabólica en la biosíntesis de flavonoides y otros derivados de ácidos cinámicos (D. Kundu et al., 2019; Winkel-Shirley, 2001), así como también a la posibilidad de que este compuesto se encuentre formando ésteres (ácido cumaroilquínico por ejemplo) al formar parte de la pared celular y que por esta razón no se logró identificar mediante HLPC-DAD.

La concentración de APCUM presenta diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de las comparaciones tanto entre fenotipos como entre solventes de extracción. Al expresar los resultados en función a la masa de extracto seco, es el EAE-N el que presenta el mayor contenido de este compuesto fenólico, mientras que, al expresar los datos en función de la masa de hoja utilizada para la extracción, se observa que el EET-B presenta un contenido de APCUM cercano al doble de lo encontrado para los extractos EET-N y EAE-B.

5.2.6.2. Zona (ii): contenido de ácido rosmarinico

Al igual que para los compuestos fenólicos anteriores, se logró identificar y cuantificar ácido rosmarinico (AR) en los 8 extractos secuenciales, y los resultados del contenido de AR (CAR) se resumen en la Figura 26. Al igual que para el AC los EET de ambos fenotipos presentaron los mayores CAR de la serie con valores de 2.486 ± 45 mg AR/ 100 g e.s. para el EET-B y de 2.073 ± 120 mg AR/ 100 g e.s. para el EET-N, lo que corresponde a 365 ± 7 mg AR/ 100 g h.s. y 234 ± 14 mg AR/ 100 g h.s. para EET-B respectivamente al expresar los resultados en función de la masa de hoja utilizada para la extracción. Por otro lado, los EDCM de ambos fenotipos presentan un CAR aproximadamente 200 veces menor a lo encontrado para los EET, siendo los extractos con menor CAR de la serie.

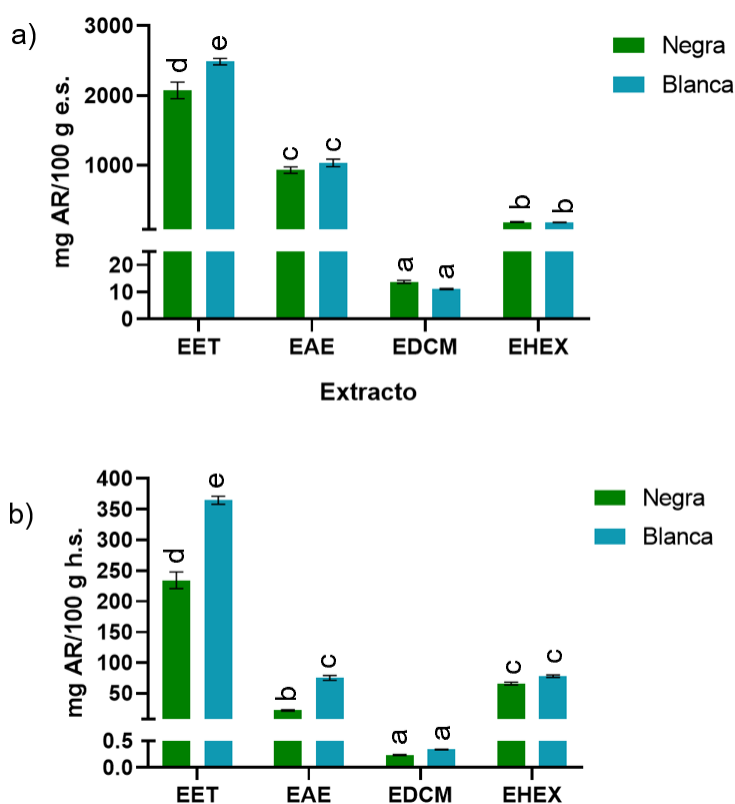


Figura 26. Contenido de ácido rosmarinico (CAR) para los 8 extractos secuenciales en estudio. EET: Extracto realizado con etanol; EAE: extracto realizado con acetato de etilo, EDCM: extracto realizado con diclorometano y EHEX: extracto realizado con hexano. a) CAR en función a la masa de extracto seco; b) CAR en función a la masa de hoja seca. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El ácido rosmarinico se reporta habitualmente en especies del género *Salvia*. En un estudio realizado por Koşar y colaboradores (Koşar et al., 2011), en el que los autores realizaron extracciones Soxhlet secuenciales con hexano, acetato de etilo, metanol y metanol:agua (50%) a partir de partes aéreas de *S. halophila*, los autores reportan que el contenido de AR es entre 10 y 30 veces mayor que el de AC dependiendo del solvente utilizado en todos los extractos y que el contenido de ambos polifenoles es mayor en los extractos realizados con acetato de etilo con concentraciones de $1,56 \pm 0,09$ mg/g para el AC y 49 ± 2 mg/g para el AR, concentraciones superiores a lo encontrado en los EAE analizados en este trabajo para ambos fenotipos. Estas diferencias en el contenido de AC y AR pueden guardar relación con la diferencia intrínseca entre las especies *S. halophila* y *S. hispanica*, pero, también es importante considerar que la concentración de los polifenoles está estrechamente relacionada a las condiciones climáticas de crecimiento de las plantas y los posibles factores de estrés que aumenten la producción de estos compuestos. Otro factor importante que considerar es que la concentración de estos compuestos también varía fuertemente a través del tiempo como muestran. Esto es importante sobre todo considerando que los extractos secuenciales analizados en este trabajo se realizaron con las hojas recolectadas en el tercer muestreo (3 de junio) en busca de orientar los resultados de la evaluación biológica a un posible doble propósito del cultivo de chíá.

5.2.6.3. Zona (iii): contenido de apigenina

En la zona (iii), se logró la identificación y cuantificación de apigenina (API) en los extractos secuenciales de características más polares (EET y EAE), mientras que no fue posible determinar su presencia en los extractos EDCM y EHEX para ambos fenotipos. A partir de los datos resumidos en la tabla 9, es posible observar que tanto los EET como los EAE de ambos fenotipos poseen un contenido de API similar que varía desde los $0,83 \pm 0,07$ mg API/100 g e.s. y los $0,89 \pm 0,03$ mg API/100 g e.s. Al expresar los resultados en función de la masa de hoja utilizada para la extracción, son los extractos del fenotipo blanca los que presentan un mayor contenido de este compuesto, diferencia que solo es significativa entre los EAE.

Tabla 9. Contenido de API en los extractos secuenciales de los fenotipos Negra y Blanca.

Extracto	Negra		Blanca	
	mg/100g e.s.	mg/100g h.s.	mg/100g e.s.	mg/100g h.s.
EET	0,89±0,03 ^a	0,101±0,003 ^C	0,83±0,07 ^a	0,122±0,010 ^C
EAE	0,877±0,008 ^a	0,0210±0,0002 ^A	0,874±0,007 ^a	0,0635±0,0005 ^B
EDCM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EHEX	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado.

^{a, b}: letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores expresados por 100 g de extracto seco (/100 g e.s.).

^{A, B}: letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores expresados por 100 g de hoja seca (/100 g h.s.).

El contenido de API en los extractos metanólicos de hojas 4 especies de *Salvia* estudiados por Farhart y colaboradores muestra una variación que depende tanto de la especie como del origen de las plantas. Los autores reportan concentraciones de este flavonoide que abarcan desde 7,8±0,4 mg API/100 g p.s. en extractos de *S. officinalis* y 0,56±0,07 mg API/100 g p.s. para *S. argentea* (Farhat et al., 2013), todos valores superiores a lo expuesto en la tabla 9 para los extractos secuenciales de hojas de chíá. La especie cuyo contenido de API es más susceptible a la localidad es *S. verbenaca*, con concentraciones que van desde los 0,645±0,007 mg API/100 g p.s. hasta los 1,60±0,03 mg API/100 g p.s. De esta forma, la presencia y concentración de esta flavona pareciera ser altamente dependiente de la especie en estudio, aunque no se pueden descartar los efectos de la metodología de extracción y el origen de las plantas en la síntesis de metabolitos secundarios.

5.2.6.4. Perfil fenólico determinado por espectrometría de masas

Adicionalmente, se realizó la caracterización de los extractos secuenciales mediante UHPLC-MS. La identificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante comparación tanto de la masa del ion molecular como del patrón isotópico del espectro de masas con bases de datos disponibles en el laboratorio del Dr. Óscar Núñez de la Universidad de Barcelona, España, gracias a lo cual se logró

identificar tentativamente hasta 18 compuestos fenólicos en los extractos secuenciales de hojas de chía (tabla 10).

Tabla 10. Identificación tentativa de compuestos bioactivos en los extractos secuenciales de hojas de chía de los fenotipos de semilla Negra y Blanca.

Compuesto	tr (min)	Fórmula	Delta m/z	Negra				Blanca			
				EET	EAE	EDCM	EHEX	EET	EAE	EDCM	EHEX
Ácido protocatecuico	4,44	C ₇ H ₆ O ₄	-0,78	+	+	+	n.d.	+	+	-	n.d.
Ácido clorogénico	5,78	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-0,2	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido p-cumarico	5,86	C ₉ H ₈ O ₃	-0,38	-	-	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.
Ácido cumarico-O-hexosa	5,87	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	-0,83	-	-	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.
Ácido cafeico	6,48	C ₉ H ₈ O ₄	-0,63	++	+	-	-	+	+	-	-
Ácido cumaroilquínico	6,63	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	-0,26	-	+	-	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Orientina	7,21	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-0,79	++	+	+	+	+	+	-	-
Vitexina	7,64	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-0,95	++	++	+	+	++	++	+	+
Acetil orientina	7,76	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	-0,87	+	-	-	-	-	-	n.d.	-
Luteolina-O-glucuronido	7,94	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	-0,62	+	+	+	+	+	+	-	+
Ácido sinápico	9,00	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	-0,47	nd	-	-	nd	nd	-	-	nd
Ácido rosmarinico	9,03	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	-0,68	++	++	+	-	++	++	+	+
Ácido ferúlico	9,50	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-1,19	+	+	-	+	+	+	-	+
Kampferol	10,45	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-0,51	-	+	nd	-	-	+	nd	-
Apigenina	11,56	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-0,75	-	+	nd	-	-	+	nd	-
Naringenina	11,66	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	-0,5	-	++	+	+	-	++	+	+
Ácido salvianólico isómero F	11,84	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	-0,14	-	-	+	-	nd	-	+	-
Dimetil quercetina (quercetina dimetil éter)	11,86	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	-0,37	+	++	++	+	+	++	++	+
Total				17	18	13	13	14	16	11	12

++ área > 10⁺⁷, + área > 10⁺⁶, - área > 10⁺⁵, n.d. no detectado

Como se puede observar en la tabla 10, los extractos más polares (EET y EAE) presentan un mayor número de compuestos identificados que los extractos más apolares (EDCM y EHEX), lo que se observa también en los resultados expuestos previamente concernientes a la cuantificación de AC, ACLO, APCUM, AR y API mediante HPLC-DAD, así como también se condice con el número e intensidad de las señales cromatográficas (Figura 23). De igual manera, al comparar los fenotipos en estudio, los extractos del fenotipo negra presentaron un mayor número de compuestos identificados y áreas de pico que los extractos del fenotipo blanca respectivo.

Al igual que lo reportado por Amato y colaboradores (Amato et al., 2015), los compuestos listados en la tabla 10, se pueden clasificar principalmente como derivados de ácidos cinámicos (9 compuestos; ácido clorogénico, ácido p-cumarico, ácido cumarico-O-hexosa, ácido cafeico, ácido cumaroilquínico, ácido sinápico, ácido rosmarinico, ácido ferúlico y ácido salvianólico isómero F) o como flavonas (5 compuestos; Orientina, Vitexina, acetil orientina, luteolina-O-glucurónido y Apigenina). Según lo descrito en bibliografía para otras especies de *Salvia*, los compuestos listados anteriormente corresponden a polifenoles identificados habitualmente en extractos de partes aéreas de diversas especies de este género (Adımcılar et al., 2019; Farhat et al., 2013, 2014; Hanganu et al., 2019; KIVRAK et al., 2019; Koşar et al., 2011).

Los compuestos con mayor área cromatográfica fueron los flavonoides vitexina, orientina y dimetil quercetina, los que junto con el ácido rosmarinico se identificaron en los 8 extractos analizados. Al realizar una comparación general, ambos fenotipos presentan perfiles similares, y la diferencia más notoria se encuentra en la presencia de los ácidos clorogénico y cumaroilquínico solamente en los extractos del fenotipo negra, lo que concuerda con lo expuesto en la tabla 7 para el ACLO. A diferencia del ACLO que es un éster formado entre los ácidos cafeico y quínico, el ácido cumaroilquínico resulta de la unión de ácido p-cumarico y quínico, de forma que sus estructuras difieren solamente en la presencia de un grupo hidroxilo extra en el anillo aromático del ACLO (Anexo 9).

Al comparar estos resultados con los cromatogramas expuestos en la Figura 23 y Anexo 7, y considerando que en los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD los picos mayoritarios de la zona (ii) corresponden a flavonoides por su espectro de absorbancia uv-visible, es posible que la identidad de dos de estos picos corresponda a vitexina y orientina, al ser dos de los compuestos de mayor intensidad en los cromatogramas obtenidos por espectrometría de masas.

5.2.7. Evaluación de la citotoxicidad en célula de mamífero

Previo a la evaluación biológica en ratones, se procedió a determinar la toxicidad de los extractos secuenciales utilizando la metodología MTT. En este ensayo, la respuesta instrumental está ligada a la actividad de reductasas capaces de reducir el MTT a su sal de formazán que presenta una coloración morada característica, de forma que a medida que la población celular decrece, menor será la absorbancia registrada. Una de las formas más comunes de evaluar la citotoxicidad de un compuesto puro o de un extracto, es mediante el cálculo de la concentración necesaria para obtener una mortalidad del 50% de la población celular, habitualmente conocido como IC₅₀.

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 27, no fue posible determinar un valor de IC₅₀ para ninguno de los extractos estudiados, lo que indica que ninguno de ellos resultó tóxico a las concentraciones utilizadas para el estudio. Además, para la mayoría de ellos se muestra una tendencia a aumentar la absorbancia a medida que la concentración del extracto aumenta, lo que es indicio de un mayor número de células vivas. Estos resultados están en concordancia con lo reportado por Kundishora y colaboradores para extractos foliares secuenciales de *Parinari curatellifolia* (Kundishora et al., 2020) que no presentaron efecto citotóxico. En este trabajo los autores realizaron extractos secuenciales con 7 solventes, siendo el último, agua. Los resultados de citotoxicidad del extracto acuoso muestran un aumento de la absorbancia con la concentración, lo que los autores atribuyen a un efecto proliferativo de los extractos. Adicionalmente, los autores indican que una reducción de la viabilidad sobre un 30% se considera un efecto tóxico (Kundishora

et al., 2020), umbral que no fue alcanzado por ninguno de los extractos secuenciales de hojas de chía en ninguna de las concentraciones testeadas.

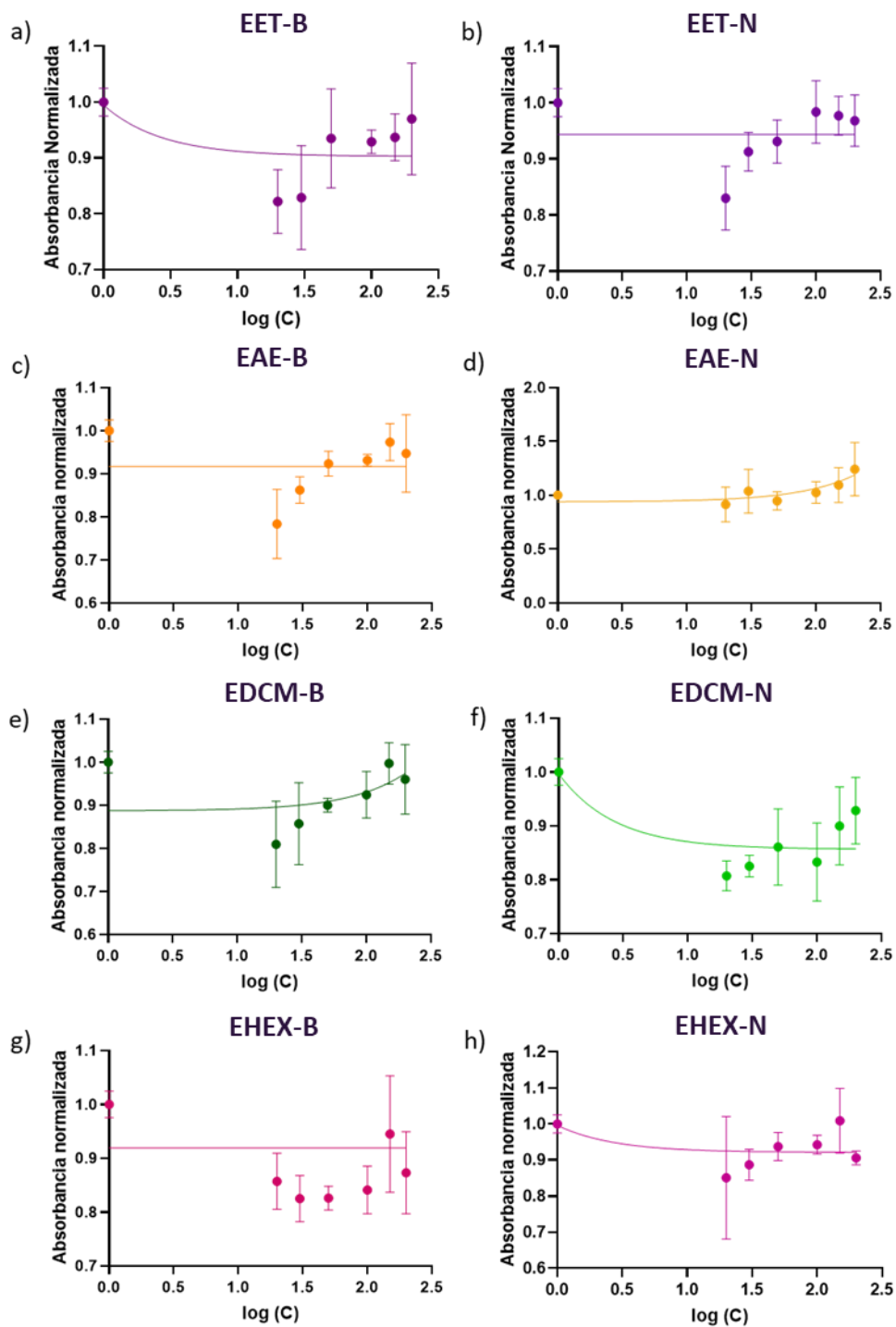


Figura 27. Citotoxicidad de los 8 extractos secuenciales determinada mediante la metodología MTT sobre células VERO: a) EET-B; b) EET-N; c) EAE-B; d) EAE-N; e) EDCM-B; f) EDCM-N; g) EHEX-B; h) EHEX-N.

5.3. Efecto sobre modelo de ratón obeso

La obesidad es una enfermedad causada por un desbalance entre la ingesta y gasto energético que conlleva un mayor almacenamiento de grasas y al desarrollo de un estado inflamatorio crónico cuyos efectos en tejido adiposo e hígado pueden generar comorbilidades como resistencia a la insulina y esteatosis. Durante el estado obeso, aumenta la concentración de citoquinas inflamatorias, que perturban la señalización de insulina produciendo un desbalance en la homeostasis de la glucosa afectando la función hepática y la disponibilidad de nutrientes (Gregor & Hotamisligil, 2011).

Con el fin de evaluar el posible efecto de reversión del daño hepático y sobre indicadores de resistencia a la insulina (RI), se administraron vía oral soluciones acuosas de los extractos etanólicos de ambos fenotipos a ratones *Mus musculus* sometidos a dieta alta en grasa (DAG) a una concentración de 50 mg/kg de ratón. Con el fin de asegurar la completa ingesta de los extractos, estos fueron administrados individualmente por medio de una jeringa una vez al día por un periodo de tres semanas.

5.3.1. Efecto sobre la masa corporal, hepática y grasa epididimal

Luego de transcurridas las semanas de tratamiento, se procedió a realizar las eutanasias, en las cuales se registró tanto el peso corporal de cada animal, como el peso de la grasa epididimal e hígado con el fin de analizar un posible efecto de los extractos sobre la reversión de la obesidad inducida por dieta alta en grasas (DAG). Un aumento en el tejido graso visceral se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes y/o síndrome metabólico (Garvey, 2019), por lo cual resulta importante estimar los efectos de la suplementación de los extractos etanólicos de hojas de chía.

Los resultados resumidos en la tabla 11, muestran en primer lugar un aumento significativo en la masa corporal de los individuos de los grupos alimentados con DAG de aproximadamente 1,7 veces con respecto al grupo control DN. En segundo

lugar, todos los animales alimentados con DAG presentaron una masa corporal similar durante todo el periodo del experimento.

Tabla 11. Masa corporal, del hígado y de la grasa epididimal de todos los grupos de estudio luego del periodo de suplementación.

Grupo	Masa corporal (g)	Masa del hígado (g)	Masa de la grasa epididimal (g)
DN	28±2	1,1±0,1	1,7±0,1
DAG	48±3 ****	2,0±0,3 *	1,9±0,5
DAG-EN	49±5 ****	2,2±0,8 **	1,8±0,5
DAG-EB	48±2 ****	1,8±0,4	2,1±0,2

Peso corporal: **** diferencia significativa entre grupos ($p < 0,0001$). Peso hígado: * diferencia significativa entre DN y DAG; ** diferencia significativa entre DN y DAG-EN ($p < 0,01$). DN: grupo control dieta normal; DAG: grupo alimentado con dieta alta en grasa sin suplementación; DAG-EN: grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).

Si bien no se encontraron diferencias significativas entre las masas de los grupos alimentados con DAG debidas a la suplementación de extractos de chía, es importante destacar que para observar cambios importantes en variables macroscópicas como la masa corporal o de la grasa epididimal, es necesario que primero ocurran mejorías sustanciales de reversión del daño a nivel de tejido (microscópico).

5.3.2. Efecto sobre indicadores de la homeostasis de la glucosa

La homeostasis de la glucosa hace referencia a todos los procesos metabólicos que regulan la concentración de azúcares (principalmente glucosa) en sangre. Como se mencionó anteriormente, la obesidad provoca un aumento en la concentración de citoquinas inflamatorias, lo que perturba la señalización de insulina en los tejidos, provocando eventualmente resistencia a la insulina (Gregor & Hotamisligil, 2011). La resistencia a la insulina se caracteriza por una menor sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina, lo que dificulta la disminución de la concentración de glucosa en sangre luego de la ingesta de alimentos, ante lo cual el páncreas responde aumentando la secreción de insulina hasta lograr disminuir la glicemia a rangos normales.

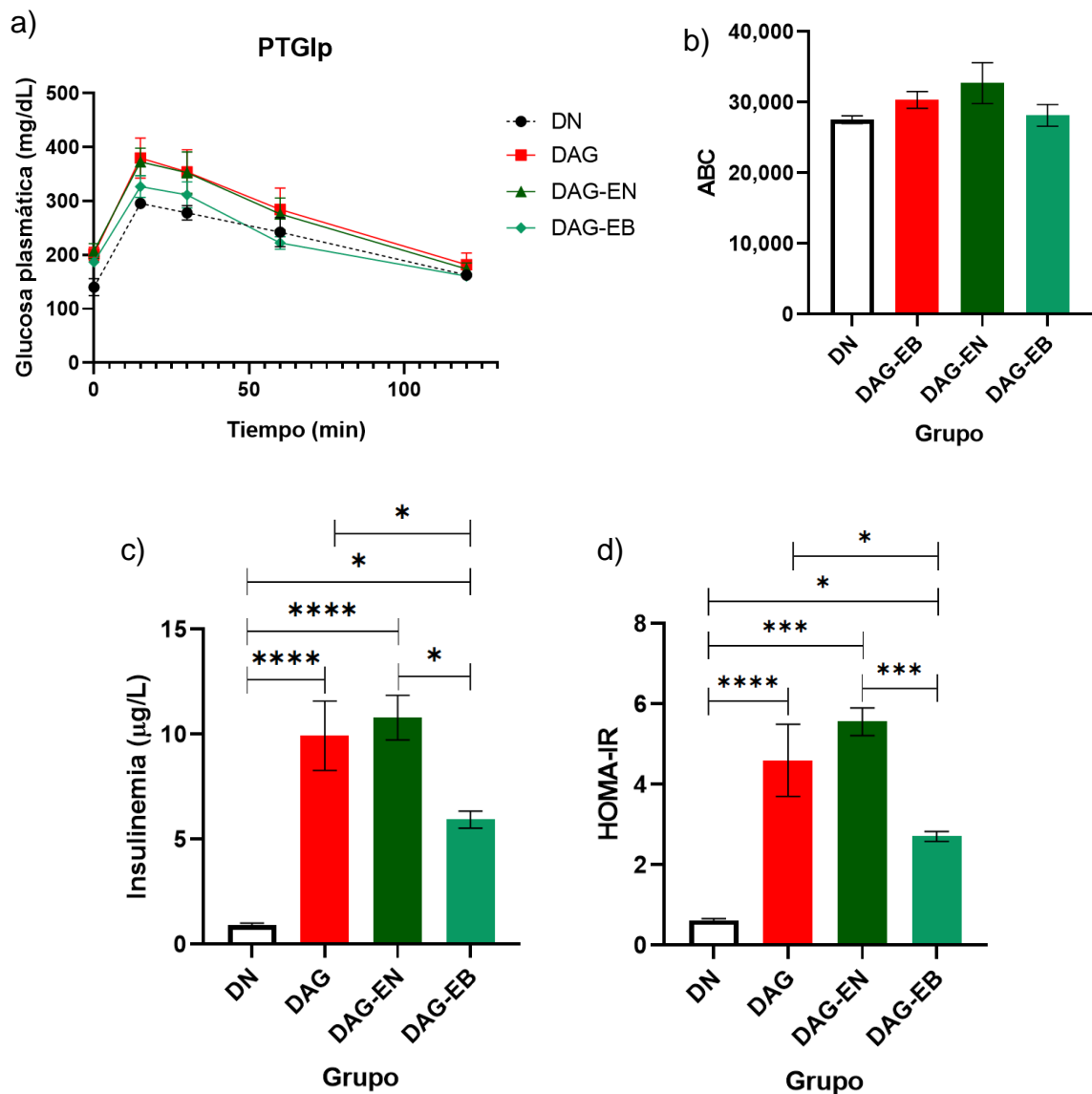


Figura 28. Parámetros asociados con la homeostasis de la glucosa, donde a) curvas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTGIp), b) áreas bajo la curva de tolerancia a la glucosa, c) insulina plasmática en ayunas y d) índice HOMA-IR calculado a partir de la ecuación (2). * diferencia significativa con $p < 0,05$. *** diferencia significativa con $p < 0,001$. **** diferencia significativa con $p < 0,0001$. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).

Las curvas de tolerancia a la glucosa (PTGIp) evalúan la respuesta metabólica de los animales ante la inyección peritoneal de glucosa, y según se muestra en la Figura 28a, los grupos alimentados con DAG evidencian desarrollo de resistencia a la insulina al comparar con el grupo DN. Adicionalmente, los resultados del grupo

DAG-EN son muy similares a los del grupo DAG, mientras que para el grupo DAG-EB se observa una leve mejoría, con niveles similares al grupo DN luego de transcurridos 60 min desde la administración de glucosa. Considerando que mientras mayor sea la sensibilidad a la insulina, más rápidamente disminuirá el valor registrado de la glicemia, el grupo suplementado con EET-B, presentó una mejor respuesta a la inyección de glucosa intraperitoneal que los grupos DAG y DAG-EN, a pesar de que esta diferencia entre tratamientos no fue significativa. Esto también se observa al analizar las áreas bajo la curva obtenidas al integrar las curvas de tolerancia a la glucosa (ABC) (Figura 28 b).

En cuanto a los resultados de insulinemia e índice HOMA-IR (Figuras 28 c y 28 d), se observa que la suplementación con EET-B logra disminuir significativamente ($p < 0,05$) ambos parámetros con respecto al grupo DAG, siendo superior al efecto de la suplementación con EET-N. Adicionalmente, se puede observar que la dispersión de los datos en el grupo DAG-EB es menor que en el grupo DAG-EN, lo que podría estar evidenciando un efecto más homogéneo en la reversión del daño causado por una dieta alta en grasas.

De acuerdo con la cuantificación de los 5 polifenoles que fue posible identificar en los EET de ambos fenotipos (ACLO, AC, APCUM, AR y API), se procedió a calcular el consumo diario de estos compuestos durante las semanas de suplementación. Los resultados se resumen en la tabla 12. Como se mencionó anteriormente, los EET de ambos fenotipos presentan composiciones fenólicas similares al comparar las zonas (i) y (ii) de los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD (Figura 24), lo que también se evidencia en la similitud del consumo diario de estos compuestos (tabla 12) donde las diferencias principales son: por un lado, sólo se logró determinar la presencia de ACLO en el EET-N y por el otro, solo el CAR resultó significativamente ($p < 0,0001$) mayor en el EET-B que en el EET-N. Aunque la concentración de APCUM en el EET-B fue aproximadamente el doble que en el EET-N, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Tabla 12. Consumo diario de polifenoles de los grupos DAG-EB y DAG-EN en función a la masa corporal promedio del grupo experimental.

	DAG-EN	DAG-EB
ACLO ($\mu\text{g/g}$ ratón al día)	8,24 \pm 0,10	n.d.
AC ($\mu\text{g/g}$ ratón al día)	69,1 \pm 0,3	60 \pm 5
APCUM ($\mu\text{g/g}$ ratón al día)	7,3 \pm 0,2	12,6 \pm 0,4
AR (mg/g ratón al día)	51 \pm 3 ****	59 \pm 1 ****
API ($\mu\text{g/g}$ ratón al día)	21,9 \pm 0,5	20 \pm 1

n.d. no detectado.

**** indica diferencia significativa entre grupos DAG-EN y DAG-EB ($p < 0,0001$).

Considerando que solo para el AR se encontró una concentración significativamente mayor para el fenotipo blanca, es posible que sea responsable, al menos en parte, de las diferencias entre fenotipos encontradas. Otra contribución a esta diferencia podría encontrarse en los compuestos no identificados que presentan mayor intensidad en su señal cromatográfica para el EET-B (Figura 24), al igual que la mayor concentración de APCUM en este extracto.

Estudios de los efectos del ácido rosmarinico, reportan que este compuesto actúa como inhibidor de la α -amilasa (KUSANO et al., 1998), enzima que hidroliza los enlaces α de polisacáridos como el almidón, generando maltosa como producto, de manera que, al inhibirla, disminuye la absorción de glucosa en el tracto digestivo, y, por consiguiente, su concentración sanguínea posprandial. En segundo lugar, este derivado de ácido cinámico inhibe la acción de la difenil peptidasa IV (DPP-IV), lo que reduce la hiperglicemia (Ngo et al., 2018). Otra acción inhibitoria del AR es sobre la proteína tirosina fosfatasa, lo que aumenta la sensibilidad a la acción de la insulina. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en experimentos con ratones, donde la suplementación oral de este compuesto (100 mg/kg) durante 30 días, logró restaurar los niveles de glucosa en sangre y regular los niveles de adipocinas en ratones diabéticos (Jayanthi & Subramanian, 2015).

De igual forma, se reporta que flavonoides como la quercetina, el caempferol y la nariginina, tienen efectos positivos en la regulación del metabolismo de la glucosa

por diversos mecanismos testeados *in vitro*. En particular, la nariginina promueve la absorción de glucosa por el músculo esquelético, pero la inhibe en células adiposas, lo que sugiere que el efecto varía dependiendo del tipo de célula (Russo et al., 2019). Por su parte, la suplementación de apigenina y luteolina a hepatocitos Hep-G2, con resistencia a la insulina (RI) inducida por D-glucosa y dexametasona, ayuda a recuperar la expresión GLUT-4, enzima que participa en la absorción de glucosa, además de aumentar la concentración de glicógeno intracelular en comparación con el control no suplementado con estos flavonoides (Miao et al., 2023). Estudios sobre inhibición de α -glucosidasa muestran que las agliconas apigenina y luteolina presentan un mayor efecto inhibitorio que sus C-glicósidos como la vitexina (H. Li et al., 2009), aunque estas agliconas resultarían menos estables que sus C-glicósidos al momento de la metabolización bacteriana en el intestino, y, por lo mismo, la absorción intestinal de C-glicósidos es menor que las agliconas (Xiao et al., 2016).

Es posible que los efectos de los extractos de hoja de chía estudiados en este trabajo se deban en parte a estos compuestos, considerando que se logró la identificación de 8 flavonoides tanto en EET-B como en EET-N (tabla 10), además de la presencia de ácido rosmarinico en altas concentraciones (aproximadamente 2 mg AR/100 g h.s.).

5.3.3. Reversión del daño hepático

5.3.3.1. Análisis macroscópico y parámetros séricos

La Figura 29 muestra fotografías representativas de hígados de cada grupo experimental, y, a partir de ella se puede mencionar en primer lugar que los tres grupos alimentados con DAG (Figuras 29 b-d) presentaron características macroscópicas propias de la esteatosis hepática (hígado graso), lo que incluye una coloración más pálida que un hígado sano (Figura 29a) y la aparición de gránulos grasos. A pesar de esto, se aprecian signos de mejoría en cuanto a la coloración, sobre todo para el grupo DAG-EB (Figura 29d), lo que sugiere que la suplementación con EET-B tiene un mayor efecto que EET-N en la reversión de la esteatosis hepática.

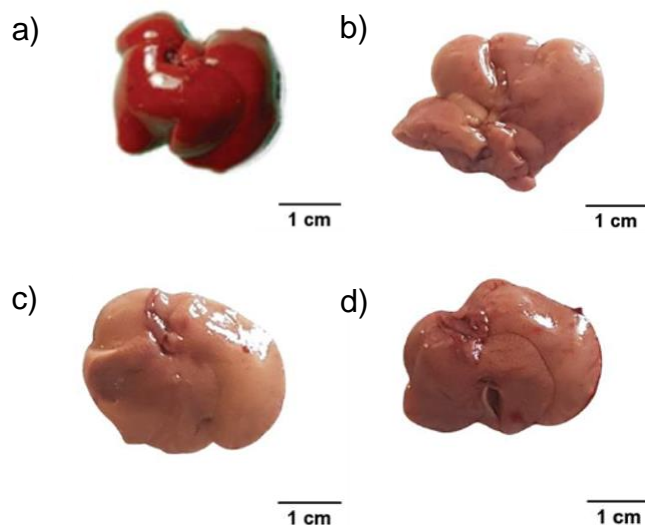


Figura 29. Fotografías de hígados representativos de a) grupo DN; b) grupo DAG; c) grupo DAG-EN y d) grupo DAG-EB. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).

Niveles elevados de las transaminasas glutámico pirúvica (GPT) y glutámico oxalacética (GOT) son indicadores de daño hepático, en especial la GPT (Wroblewski et al., 1956). En la Figura 30 a y b, se muestran los niveles de estas transaminasas en los tres grupos de estudio, y en ella se observa que, el grupo DAG presenta una mayor concentración en suero para ambas transaminasas que los grupos DN, DAG-EN y DAG-EB, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Para el caso de la GOT (Figura 3a), el grupo DAG-EN presenta resultados levemente mejores que el DAG-EB, mientras que para el caso de la GPT (Figura 30 b), se muestra una tendencia a la disminución de su concentración sérica con la suplementación de los extractos de hojas de chía, especialmente para el grupo DAG-EB cuya concentración sérica de GPT disminuye a niveles comparables con el grupo DN, con una menor dispersión de los datos al comparar con los grupos DAG y DAG-EN.

Otros marcadores de daño hepático incluyen la concentración sérica de fosfatasa alcalina (FA) (Figura 30c). Nuevamente se muestra una tendencia a la mejoría al suplementar con extractos de hoja de chía en los niveles de FA, con el EET-B

teniendo un mayor efecto que el EET-N, aunque, nuevamente, la diferencia entre grupos no es estadísticamente significativa.

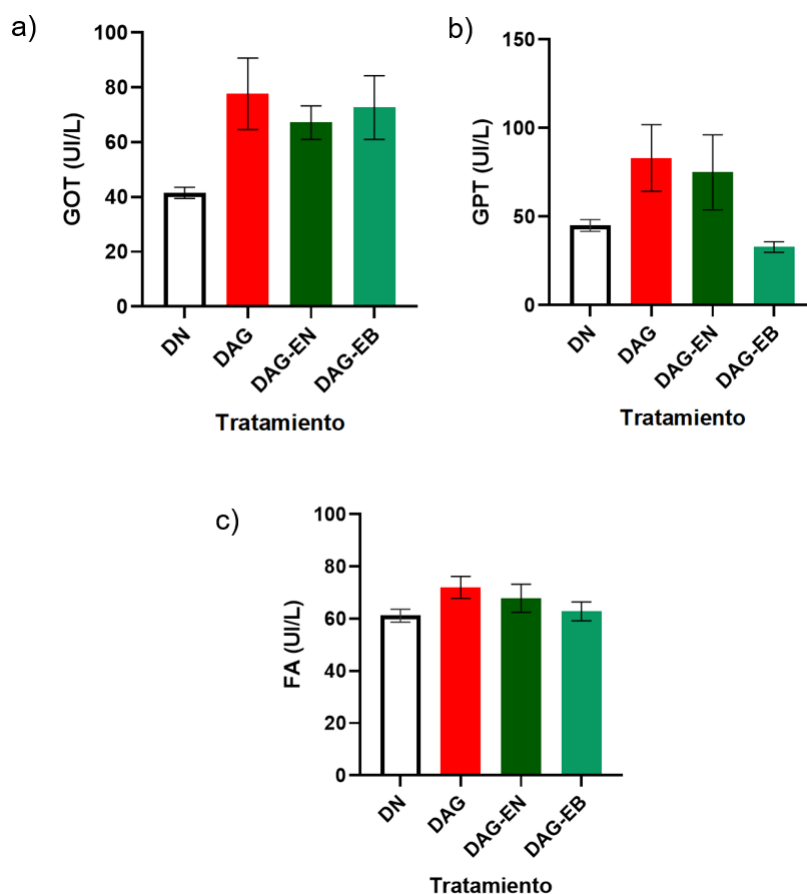


Figura 30. Perfil hepático. Concentración en suero de a) transaminasa glutámico-oxalacético (GOT), b) transaminasa glutámico-pirúvico (GPT) y c) fosfatasa alcalina (FA) para todos los grupos en estudio. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).

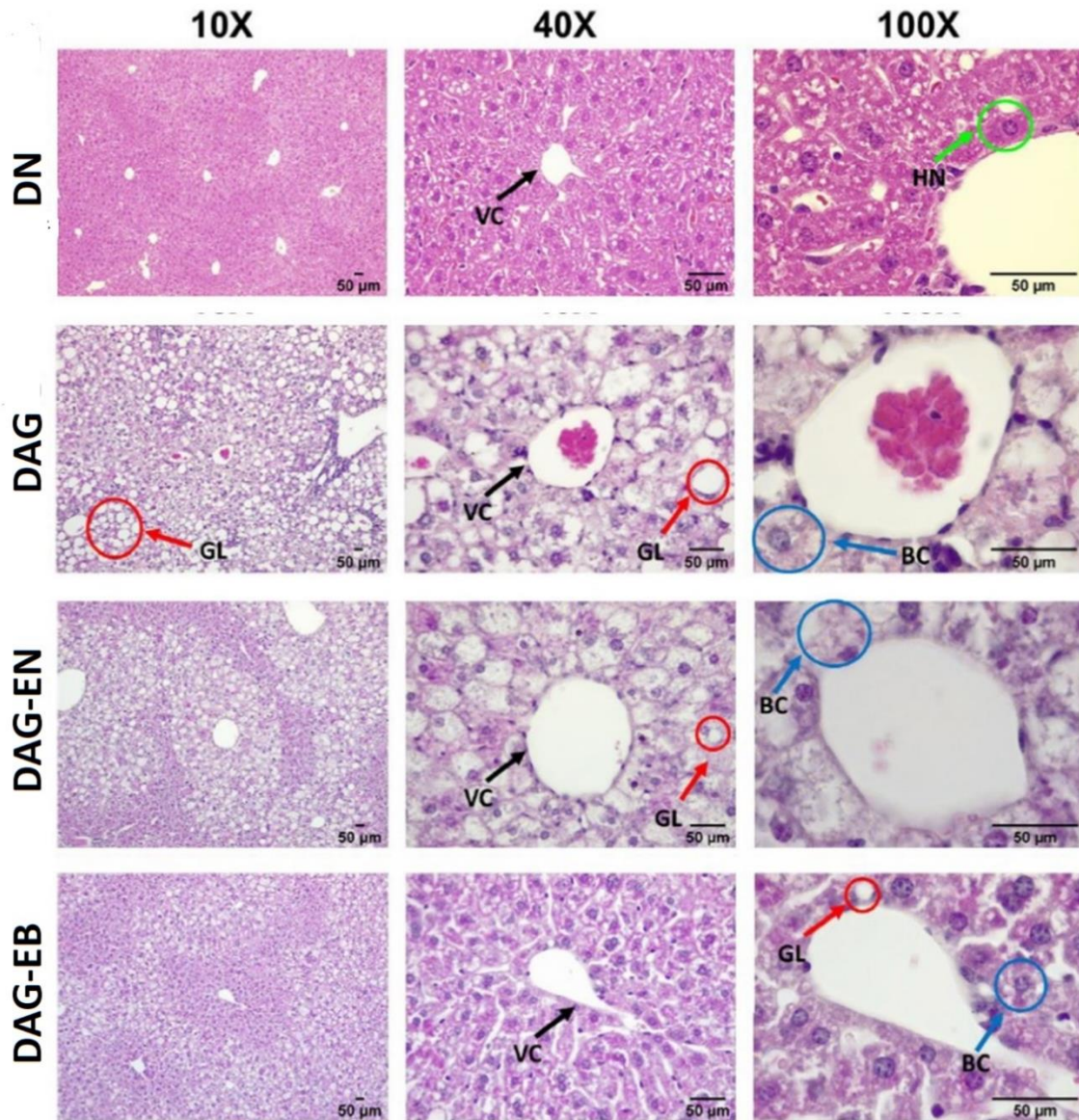
Un vasto número de estudios sugieren que los polifenoles ejercen un efecto positivo sobre daño hepático generado por diversas causas, y por mecanismos que incluyen su acción antioxidante (incluyendo la modulación de la actividad de enzimas antioxidantes), metabólica (disminución de la lipogénesis) y antiinflamatoria (regulación de expresión de factores pro-inflamatorios), entre otros (Elufioye & Habtemariam, 2019; Gupta et al., 2015; Van De Wier et al., 2017; Wu et al., 2010). Wu y colaboradores estudiaron el efecto de extractos acuosos de hojas de *Nelumbo*

nucifera sobre la prevención del daño hepático causado por una dieta alta en grasa (20% de aceite de manteca y 0,5% de colesterol). En su trabajo, los extractos acuosos, ricos en polifenoles, fueron administrados junto con la dieta alta en grasa, de forma que, a diferencia de lo realizado en este trabajo de tesis, se estudió la prevención del daño hepático y no su reversión. En este sentido, la suplementación con extractos de *N. nucifera* mostró un efecto protector significativo comparado con el grupo no suplementado, tanto en la concentración de GPT como en la de GOT en magnitudes dependientes de la concentración del extracto (Wu et al., 2010). Por otra parte, Hawas y colaboradores informaron la presencia de 13 flavonoides en extractos de partes aéreas de *Solanum elaeagnifolium*, dentro de los que se encuentra la vitexina. La administración de estos extractos a concentraciones de 25, 50 y 75 mg/kg ratón disminuyó significativamente la concentración sérica de FA, GPT y GOT causada por intoxicación aguda con paracetamol (500 mg/kg de ratón) comparado con el grupo que solo recibió paracetamol (Hawas et al., 2013).

De esta forma, es posible que al menos parte del efecto de los extractos de chía se deba a la presencia de estos compuestos.

5.3.3.2. Histología de hepatocitos aislados

En la Figura 31 se muestran las microscopías de tejido hepático representativo para cada grupo en estudio. Al comparar las microscopías del grupo DN con las de los grupos alimentados con DAG, es posible notar que estas últimas presentan un mayor número de gotas lipídicas (GL) además de balonamiento celular, siendo ambos indicadores de esteatosis, sin embargo, es posible notar que las microscopías de los grupos DAG-EN y DAG-EB muestran una tendencia a la disminución tanto del número como el tamaño de las GL. El balonamiento celular hace referencia al proceso que sufren los hepatocitos al acumular grasa durante la esteatosis, lo que provoca un aumento en el tamaño celular además de cambios en la distribución de los organelos y núcleos (Caldwell et al., 2010).



Abreviaturas:

VC: Vena central →

BC: Balonamiento celular →

HN: Hepatocito normal →

GL: Gota lipídica →

Figura 31. Imágenes microscópicas de la histología de hígados representativos de cada grupo en estudio. De izquierda a derecha aumentos de 10x, 40x y 100x. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).

Para establecer el grado de reparación sobre la esteatosis, se calcularon los porcentajes de micro y macro esteatosis de acuerdo con el criterio establecido por Liang y colaboradores para enfermedades hepáticas no asociadas con consumo de

alcohol en modelos roedores (Liang et al., 2014). Este criterio establece puntajes entre 0 y 3 para daños hepáticos asociados a esteatosis macro vesicular, esteatosis micro vesicular, hipertrofia hepatocelular y focos de inflamación, en base al porcentaje del área total de la muestra hepática afectada, de forma que 0 corresponde a un 5% del área afectada, 1 corresponde a entre un 5 y un 33%, 2 corresponde a entre un 34 y un 66% y 3 a un porcentaje superior al 66%. La diferencia entre macro y micro esteatosis se definió dependiendo de si hubo (macro) o no (micro) desplazamiento de los núcleos de los hepatocitos, mientras que la hipertrofia celular solo consideró si las células se encontraban o no con un tamaño anormal. Por último, la inflamación se evaluó contando el número de focos de inflamación, definidos como un cúmulo de 5 o más células con signos de inflamación, y posteriormente se adjudicó el puntaje de acuerdo con las categorías: normal (<0,5 focos), leve (0,5-1 focos), moderado (1-2 focos) y severo (más de 2 focos) con puntajes de 0, 1, 2 y 3 respectivamente. Los resultados se resumen en la Figura 32.

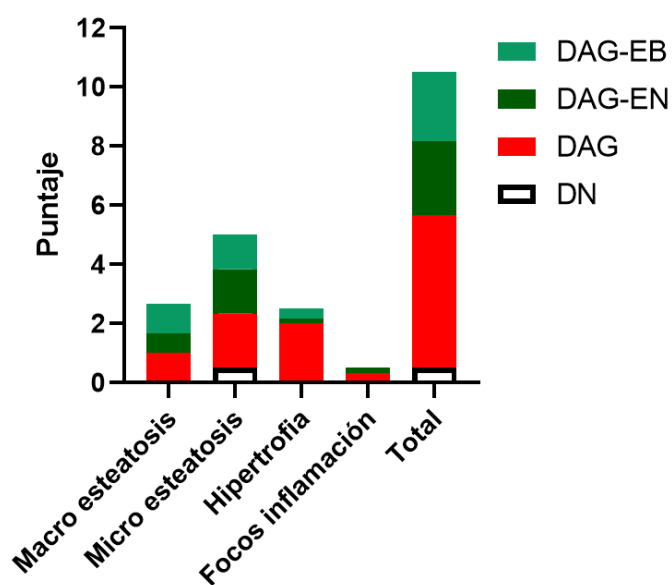


Figura 32. Puntaje calculado para estimar el daño hepático según la escala de Liang y col. DN: Dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).

Al calcular el puntaje total promedio, es decir, considerando la totalidad de factores (micro esteatosis, macro esteatosis, hipertrofia y focos de inflamación), para el grupo DAG, este ronda los 5,17 puntos, mientras que para los grupos DAG-EN y DAG-EB este valor disminuye aproximadamente a la mitad, lo que muestra una reversión del daño hepático gracias a la suplementación de los EET de hojas de chía, la que resulta independiente del fenotipo en estudio. Si bien estos valores no muestran una diferencia entre fenotipos, el grupo DAG-EB presentó menor cantidad de focos de micro esteatosis y de inflamación, mientras que el grupo DAG-EN presentó menor promedio en macro esteatosis e hipertrofia. Preliminarmente, esto podría sugerir un mecanismo de reversión del daño hepático diferente para cada fenotipo que dependerá de su composición química, que tenga efectos prioritarios en algunas rutas metabólicas por sobre otras, pero que resulta en un promedio global similar, sin embargo, es necesario mayor indagación para corroborar esta hipótesis.

Por otro lado, al analizar la contribución individual de cada factor, es posible notar que el mayor efecto de la suplementación de los EET se encuentra en la hipertrofia, disminuyendo de un promedio de 2 puntos en el grupo DAG a 0,167 puntos para el grupo DAG-EN y 0,333 puntos para el grupo DAG-EB. Al comparar el efecto de la suplementación de EET sobre la macro y micro esteatosis, se observa un efecto más importante sobre la última, con una disminución de un 18,2% y un 36,4% para los grupos DAG-EN y DAG-EB respectivamente. Así mismo, el número de focos de inflamación disminuyó aproximadamente a la mitad para el grupo DAG-EN comparado con el grupo DAG, mientras que estos desaparecieron completamente para el grupo DAG-EB.

5.3.3.3. Análisis del estado de peroxidación lipídica

Otro aspecto importante por evaluar es el grado de peroxidación lipídica (PL), que brinda información sobre el estado redox celular producto de la esteatosis generada por obesidad. La PL hace referencia a la formación de radicales lipídicos a partir de la reacción de ácidos grasos insaturados con radicales hidroxilo, los que luego generan hidroperóxidos como producto final de la reacción. Este proceso se asocia

frecuentemente con una función deteriorada de membranas y lipoproteínas (Kühn & Borchert, 2002). Para evaluar el grado de PL se utiliza frecuentemente la sonda fluorescente BODIPY, que presenta una emisión característica a 595 nm, pero al reaccionar con los RL, la banda de emisión se corre a 520 nm, de manera que es posible su determinación selectiva. De esta forma, a mayor grado de PL, mayor será la intensidad de la emisión a 520 nm.

En la Figura 33 se muestran las imágenes registradas con microscopio confocal que ilustran el grado de peroxidación de las gotas lipídicas (GL) en hepatocitos aislados de los tres grupos alimentados con DAG. Al realizar el registro del grupo DN, este no presentó un grado de PL importante, forma que se mantendrá al margen del análisis de este factor.

Dada la polaridad de la sonda utilizada, ésta se situó preferencialmente dentro de las GL presentes en los hepatocitos, donde se observó una menor intensidad de la emisión a 520 nm (color verde) en los grupos suplementados con EET al comparar con el grupo DAG sin suplementación. En individuos sanos, uno de los mecanismos de control sobre la PL es la acción de la glutatión peroxidasa (GPx), cuya función es reducir hidroperóxidos a sus correspondientes hidróxidos utilizando principalmente glutatión como agente reductor (Kühn & Borchert, 2002). Sin embargo, en sujetos obesos, la actividad de esta y otras enzimas antioxidantes disminuye junto con la concentración de glutatión en su estado reducido (Hsu et al., 2009) con lo cual aumenta el grado de PL. Esta disminución puede ser revertida por ácidos cinámicos y flavonoides con eficiencias dependientes de su estructura (Hsu et al., 2009).

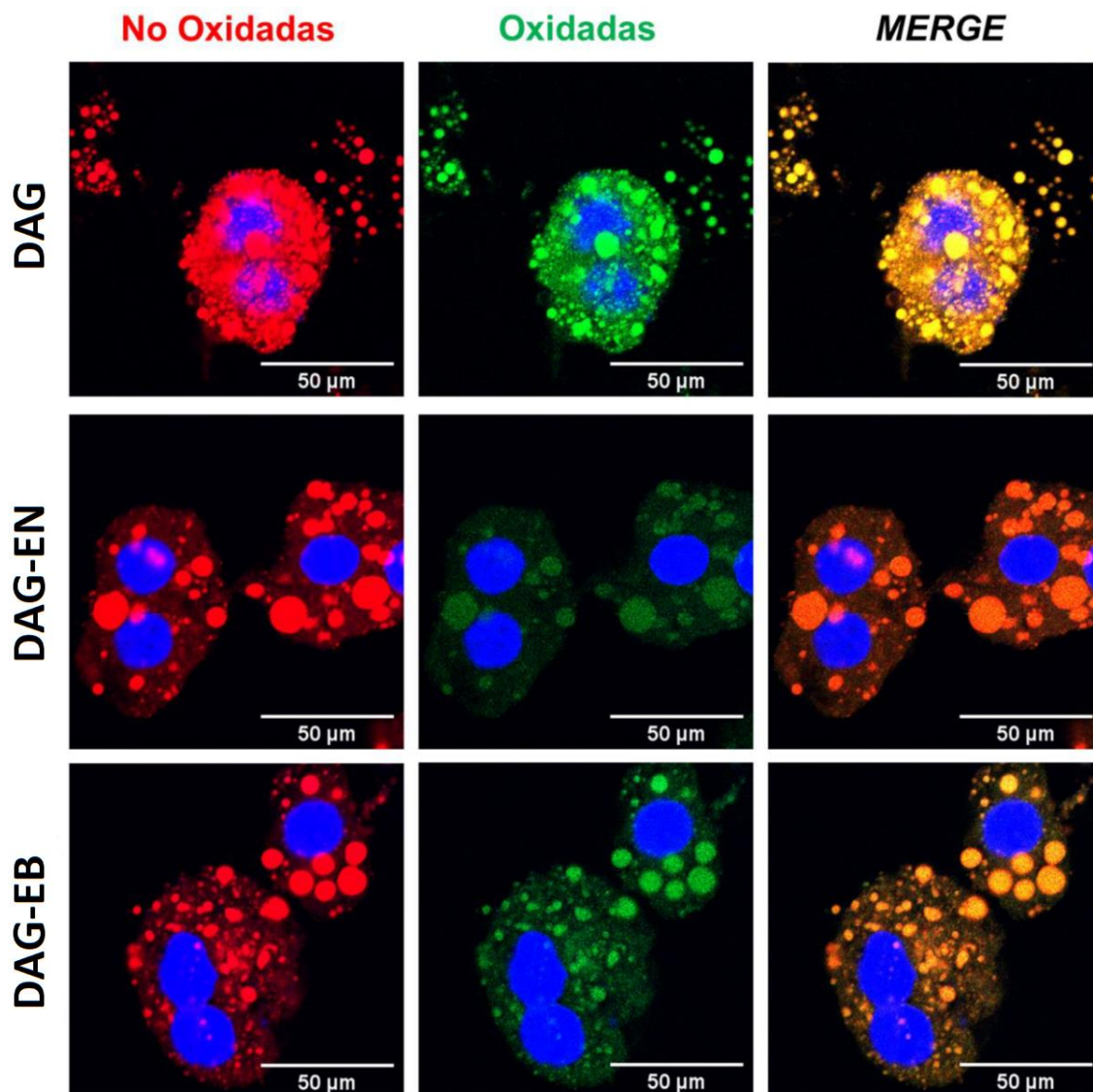


Figura 33. Imágenes representativas registradas con microscopio confocal que ilustran los niveles de PL en GL de hepatocitos aislados de cada grupo alimentado con DAG. Azul: núcleos de los hepatocitos, marcados con DAPI; rojo: BODIPY no oxidado; verde: BODIPY oxidado. DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).

Los resultados expuestos en la Figura 33, están en concordancia con lo reportado por Cazzola y colaboradores, quienes estudiaron el efecto de los polifenoles de una muestra de vino rojo sobre la peroxidación de plasma humano siguiendo el cambio en la concentración de algunos ácidos grasos. Estos autores encontraron que al incubar la muestra con una concentración de 1,25 µg/L de la muestra aumentó el tiempo de latencia (etapa de iniciación) y disminuyó la velocidad de reacción de

forma dependiente de la posición y número de insaturaciones en la estructura del ácido graso (Cazzola & Cestaro, 2011). Por otro lado, se ha estudiado el efecto hepatoprotector ante daño oxidativo causado por hidroperóxido de *terc*-butilo (*t*-BHP) de extractos acuosos de *Perilla frutescens* en paralelo con los ácidos rosmarinico y cafeico y su combinación (Yang et al., 2013). En este trabajo, los autores reportan que la administración vía sonda estomacal tanto del extracto de *P. frutescens* como de los compuestos por separado y su combinación, presentaron efectos protectores a nivel de la concentración de glutatión (GSH) así como de la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa. Al comparar el efecto de los tratamientos previos a la exposición ante *t*-BHP, tanto el extracto como la combinación de ambos ácidos cinámicos presentó un efecto significativamente mayor sobre la concentración de GSH, y la actividad de las enzimas antioxidantes (Yang et al., 2013).

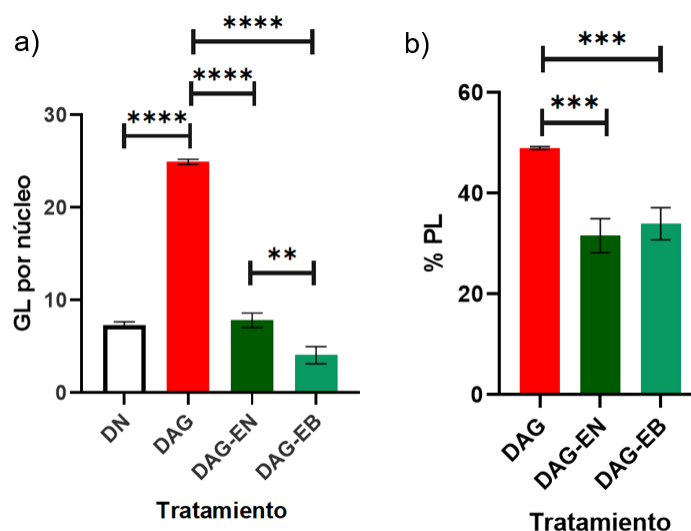


Figura 34. a) Número de gotas lipídicas por núcleo para cada grupo y b) porcentaje de PL para cada grupo alimentado con DAG. ** diferencia significativa con $p < 0,01$. *** diferencia significativa con $p < 0,001$. **** diferencia significativa con $p < 0,0001$. DN: dieta normal; DAG: Grupo alimentado con DAG sin suplementación; DAG-EN: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-N; DAG-EB: Grupo alimentado con DAG y suplementado con EET-B. (n=6 para cada grupo).

La Figura 34 resume los resultados obtenidos del conteo de gotas lipídicas (GL) (Figura 34 a) por núcleo y porcentaje de peroxidación lipídica (Figura 34 b) para cada grupo en estudio. Nuevamente el grupo DN no se consideró para el análisis de %PL por su bajo nivel de peroxidación lipídica. En cuanto al número de GL por núcleo, es posible observar que este aumentó significativamente ($p < 0,0001$) al comparar el grupo DAG con el grupo DN, y que así mismo, al comparar ambos grupos suplementados con EET de hojas de chíá, se observó una disminución significativa al comparar con el grupo no suplementado. Es importante destacar que la disminución del número de GL en hepatocitos de los grupos suplementados alcanzó los niveles del grupo DN, siendo estadísticamente iguales ($p > 0,05$). Otro aspecto por destacar recae en la diferencia encontrada entre los grupos DAG-EN y DAG-EB, que resultó estadísticamente significativa ($p < 0,01$), con el grupo suplementado con EET-B presentando el menor conteo de GL de todos los grupos en estudio. De igual forma, el %PL de los grupos suplementados disminuyó significativamente ($p < 0,001$) con respecto al grupo DAG, sin encontrarse diferencias significativas entre DAG-EN y DAG-EB. De esta forma, si bien la suplementación de EET-B resulta en un menor número de gotas lipídicas que la suplementación de EET-N, el efecto de ellos sobre el % de PL resulta similar.

5.4. Observaciones finales

De acuerdo con los datos expuestos anteriormente, es importante recalcar que la elección del método de extracción dependerá del objetivo de la preparación del extracto. Si bien los extractos AWA permiten la evaluación rápida del contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante con una mínima cantidad de muestra, aun es necesario determinar la citotoxicidad de ellos para evaluar su posible uso en medios biológicos. Mientras que comparativamente, los extractos secuenciales, requieren una mayor cantidad de solvente y tiempo para su preparación, demostraron no ser tóxicos y la suplementación con EET fue efectiva en la reversión del número de gotas lipídicas, peroxidación lipídica y marcadores de daño hepático (Figuras 32, 33 y 34), en una magnitud dependiente del fenotipo.

Todos los fenotipos en estudio presentan similitudes en su perfil fenólico (Figura 13 y Anexo 7) con 4 compuestos mayoritarios en la zona (ii) de los cromatogramas registrados, de los cuales 3 presentan espectros típicos de flavonoides y el último fue identificado como ácido rosmarinico. La mayor variabilidad fenotípica se encuentra principalmente en la zona (iii), y en menor medida en los compuestos minoritarios de las zonas (i) y (ii), donde la presencia de ácido clorogénico presentó la mayor dependencia fenotípica. De igual forma, la variabilidad entre muestreos también se concentra principalmente en la zona (iii) y en los compuestos minoritarios de la zona (i). La figura 35 muestra un resumen de los principales resultados obtenidos en relación con los extractos AWA analizados en este trabajo.

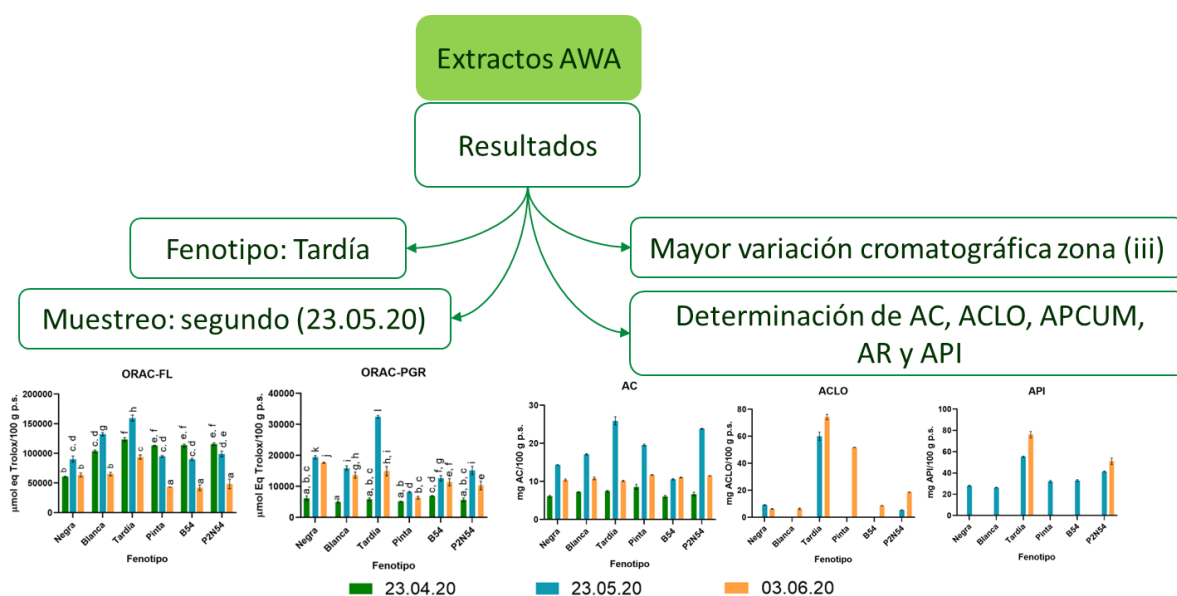


Figura 35. Resumen de los principales resultados referentes a la variación fenotípica y temporal de la CA y el contenido de polifenoles.

Adicionalmente, al realizar los extractos secuenciales con hojas del tercer muestreo con el fin estudiar el doble propósito del cultivo de chía, fue posible estimar la calidad de estas hojas en términos de su CA y contenido polifenólico (Figura 36), donde los extractos etanólicos de ambos fenotipos comerciales mostraron resultados alentadores para su posible aplicación en el tratamiento de padecimientos derivados de una dieta alta en grasas (Figura 37).

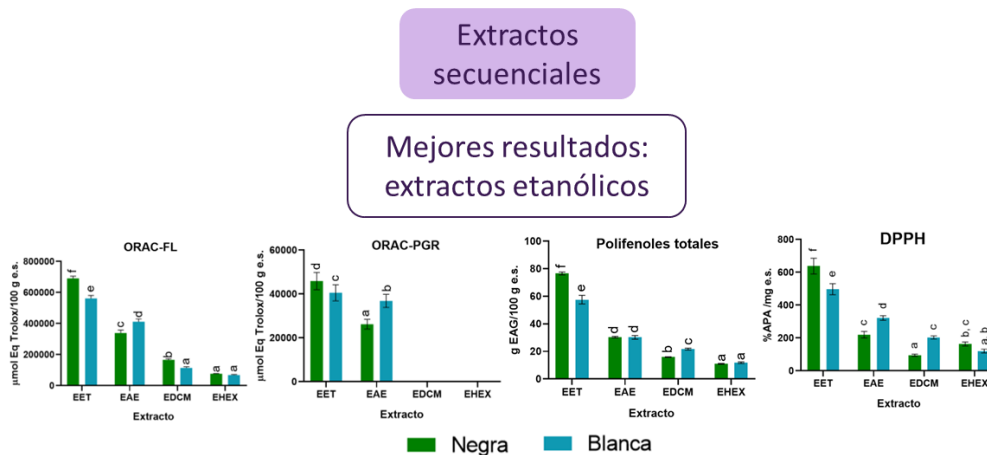


Figura 36. Resumen de los principales resultados referentes a la CA y el contenido de polifenoles de los extractos secuenciales realizados con los fenotipos negra y blanca.

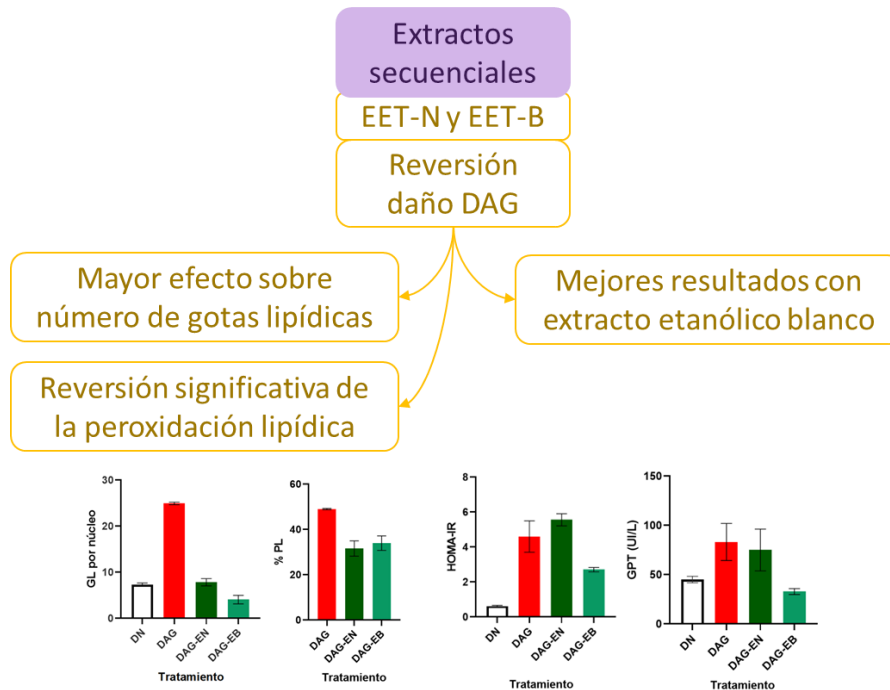


Figura 37. Resumen de los principales resultados referentes la reversión del daño casado por una dieta alta en grasas (DAG) debida a la suplementación de los extractos etanólicos de ambos fenotipos comerciales.

A partir de los datos expuestos anteriormente, es posible afirmar que los extractos de hojas de chía analizados en esta tesis demuestran que esta matriz representa un nicho comercial no explorado como fuente de compuestos bioactivos con posibles aplicaciones en el tratamiento de enfermedades hepáticas no alcohólicas.

6. Conclusiones

Fue posible desarrollar una metodología optimizada mediante superficie de respuesta para la extracción de compuestos antioxidantes, que permite la evaluación rápida de la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles en matrices vegetales. Con esta metodología, se logró determinar que: (i) el fenotipo Tardía presenta la mayor capacidad antioxidante, contenido fenólico total y concentración de los compuestos fenólicos identificados en el segundo muestreo realizado; (ii) en la mayoría de los casos, se presentó una tendencia común con un máximo en la segunda fecha de muestreo para todos los fenotipos; y (iii) fue posible determinar tanto compuestos comunes como no comunes entre fenotipos y muestreos.

En cuanto a los extractos secuenciales, se logró obtener 8 extractos secuenciales de hojas de chía de los dos fenotipos comerciales utilizando hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol como solventes de extracción. Una vez obtenidos todos los extractos secuenciales, se logró evaluar el contenido fenólico total (Folin-C), el perfil fenólico (HPLC-DAD y UPLC-MS) y la capacidad antioxidante de ellos (ORAC-FL, ORAC-PGR, DPPH, ORAC-EPR y CAA), logrando determinar que los extractos etanólicos de ambos fenotipos comerciales presentaron los mejores resultados de la serie. Adicionalmente, ninguno de los extractos preparados resultó ser tóxico para células de mamífero en las concentraciones testeadas.

Fue posible determinar los efectos sobre la reversión de los daños causados por una dieta alta en grasas en un modelo de ratón obeso, donde el extracto etanólico realizado con hojas del fenotipo blanca logró mejores resultados que el extracto etanólico del fenotipo negra. La suplementación de este extracto logró disminuir significativamente tanto el número como el tamaño de las gotas lipídicas en hepatocitos aislados en tan solo 3 semanas de suplementación.

Finalmente, con los resultados expuestos en este trabajo, es posible establecer que las hojas de chía representan un nicho comercial no explotado como fuente de compuestos bioactivos con posibles aplicaciones en medicina.

7. Referencias

- Abdal Dayem, A., Hossain, M., Lee, S., Kim, K., Saha, S., Yang, G.-M., Choi, H., & Cho, S.-G. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 120. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>
- Adımcılar, V., Kalaycıoğlu, Z., Aydoğdu, N., Dirmenci, T., Kahraman, A., & Erim, F. B. (2019). Rosmarinic and carnosic acid contents and correlated antioxidant and antidiabetic activities of 14 *Salvia* species from Anatolia. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 175. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.07.011>
- Amato, M., Caruso, M. C., Guzzo, F., Galgano, F., Commisso, M., Bochicchio, R., Labella, R., & Favati, F. (2015). Nutritional quality of seeds and leaf metabolites of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Southern Italy. *European Food Research and Technology*, 241(5), 615–625. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2488-9>
- Arikan, B., Ozfidan-Konakci, C., Alp, F. N., Zengin, G., & Yildiztugay, E. (2022). Rosmarinic acid and hesperidin regulate gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant system and the fatty acid biosynthesis-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Phytochemistry*, 198. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113157>
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., & Shreiner, B. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. In *Diabetes Spectrum* (Vol. 17, Issue 3).
- Basaranoglu, M., & Neuschwander-Tetri, B. A. (2006). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Clinical Features and Pathogenesis. In *Gastroenterology & Hepatology* (Vol. 2, Issue 4).
- CAHILL Cahil, J. P. (2003). ETHNOBOTANY OF CHIA, SALVIA HISPANICA. In *Economic Botany* (Vol. 57, Issue 4). [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0604:EOCSHL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0604:EOCSHL]2.0.CO;2)

- Cahill, J. P. (2004). *Genetic diversity among varieties of Chia (Salvia hispanica L.)*. <https://doi.org/10.1023/B:GRES.0000034583.20407.80>
- Caldwell, S., Ikura, Y., Dias, D., Isomoto, K., Yabu, A., Moskaluk, C., Pramoonjago, P., Simmons, W., Scruggs, H., Rosenbaum, N., Wilkinson, T., Toms, P., Argo, C. K., Al-Osaimi, A. M. S., & Redick, J. A. (2010). Hepatocellular ballooning in NASH. *Journal of Hepatology*, *53*(4), 719–723. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.04.031>
- Cazzola, R., & Cestaro, B. (2011). Red wine polyphenols protect n-3 more than n-6 polyunsaturated fatty acid from lipid peroxidation. *Food Research International*, *44*(9), 3065–3071. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.029>
- Chen, Y., Luo, J., Zhang, N., Yu, W., Jiang, J., & Dai, G. (2021). Insecticidal activities of *Salvia hispanica* L. essential oil and combinations of their main compounds against the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Industrial Crops and Products*, *162*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113271>
- Clifford, M. N., Jaganath, I. B., Ludwig, I. A., & Crozier, A. (2017). Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*, *34*(12), 1391–1421. <https://doi.org/10.1039/C7NP00030H>
- de Falco, B., Amato, M., & Lanzotti, V. (2017). Chia seeds products: an overview. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 16, Issue 4, pp. 745–760). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9511-7>
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., & Tattini, M. (2014). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environmental and Experimental Botany*, *103*, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.012>
- Di Sapio O., Bueno M., Busilacchi H., Quiroga M., & Severin C. (2012). Morphological characterization of *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) leaf, stem, fruit and seed. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *11*(3), 249–268. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622739007>

- Doane-Weideman, T., & Liescheski, P. B. (2019). Analytical Supercritical Fluid Extraction for Food Applications. In D. L. Luthria (Ed.), *Oil Extraction and Analysis* (1st ed., Vol. 1, pp. 69–99). AOCS Publishing. <https://doi.org/10.1201/9780429104527>
- Dorta, E., Fuentes-Lemus, E., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2018). *Evaluation of the antioxidant capacity of food samples: a chemical examination of the oxygen radical absorbance capacity assay.*
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Elshafie, H. S., Aliberti, L., Amato, M., De Feo, V., & Camele, I. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of chia (*Salvia hispanica* L.) essential oil. *European Food Research and Technology*, *244*(9), 1675–1682. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3080-x>
- Elufioye, T. O., & Habtemariam, S. (2019). Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 112). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108600>
- Farhat, M. Ben, Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., Landoulsi, A., & Jordán, M. J. (2014). Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industrial Crops and Products*, *54*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.001>
- Farhat, M. Ben, Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, *49*, 904–914. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.047>

- Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 501, Issue 1, pp. 23–30). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.005>
- Garvey, W. T. (2019). Clinical Definition of Overweight and Obesity. In *Bariatric Endocrinology* (pp. 121–143). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95655-8_7
- Gayoso-Diz, P., Otero-González, A., Rodríguez-Alvarez, M. X., Gude, F., García, F., De Francisco, A., & Quintela, A. G. (2013). Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: Effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocrine Disorders*, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-13-47>
- Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., & Nindo, C. (2013). Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1316–1323. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.020>
- Grancieri, M., Martino, H. S. D., & Gonzalez de Mejia, E. (2021). Protein Digests and Pure Peptides from Chia Seed Prevented Adipogenesis and Inflammation by Inhibiting PPAR γ and NF- κ B Pathways in 3T3L-1 Adipocytes. *Nutrients*, 13(1), 176. <https://doi.org/10.3390/nu13010176>
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology*, 29, 415–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>
- Gupta, A., Sheth, N. R., Pandey, S., Yadav, J. S., & Joshi, S. V. (2015). Screening of flavonoids rich fractions of three Indian medicinal plants used for the management of liver diseases. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(5), 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.06.010>
- Habtemariam, S. (2018). Molecular pharmacology of rosmarinic and salvianolic acids: Potential seeds for alzheimer's and vascular dementia drugs. In

International Journal of Molecular Sciences (Vol. 19, Issue 2). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms19020458>

- Habtemariam, S. (2019). Introduction to plant secondary metabolites—From biosynthesis to chemistry and antidiabetic action. In *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases* (pp. 109–132). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102922-0.00006-7>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine* (Oxford University Press, Ed.; 3rd ed., Vol. 1). Oxford science publications.
- Hanganu, D., Olah, N. K., Pop, C. E., Vlase, L., Oniga, I., Ciocarlan, N., Matei, A., Pușcaș, C., Silaghi-Dumitrescu, R., & Benedec, D. (2019). Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity for some salvia species. *Farmacia*, 67(5), 801–805. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2019.5.8>
- Hawas, U. W., Soliman, G. M., El-Kassem, L. T. A., Farrag, A. R. H., Mahmoud, K., & León, F. (2013). A New Flavonoid C-Glycoside from *Solanum elaeagnifolium* with Hepatoprotective and Curative Activities against Paracetamol- Induced Liver Injury in Mice. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 68(1–2), 19–28. <https://doi.org/10.1515/znc-2013-1-204>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*.
- Herman, S., Marco, G., Cecilia, B., Alfonso, V., Luis, M., Cristián, V., Sebastián, P., & Sebastián, A. (2016). Effect of water availability on growth, water use efficiency and omega 3 (ALA) content in two phenotypes of chia (*Salvia hispanica* L.) established in the arid Mediterranean zone of Chile. *Agricultural Water Management*, 173, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.04.028>
- Hsu, C.-L., Wu, C.-H., Huang, S.-L., & Yen, G.-C. (2009). Phenolic Compounds Rutin and o-Coumaric Acid Ameliorate Obesity Induced by High-Fat Diet in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 425–431. <https://doi.org/10.1021/jf802715t>

- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 53, Issue 6, pp. 1841–1856). <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- INTA. (2021, September). *Base de Datos de Actividad Antioxidante (ORAC) y de Contenido de Polifenoles Totales (PFT) en Hortalizas*.
- 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 ω 3 source. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(2), 171–178. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9673-x>
- Janicsák, G., Zupkó, I., Nikolova, M. T., Forgo, P., Vasas, A., Máthé, I., Blunden, G., & Hohmann, J. (2011). Bioactivity-guided Study of Antiproliferative Activities of *Salvia* Extracts. In *NPC Natural Product Communications* (Vol. 6, Issue 5).
- Jayanthi, G., & Subramanian, S. (2015). RA abrogates hepatic gluconeogenesis and insulin resistance by enhancing IRS-1 and AMPK signalling in experimental type 2 diabetes. *RSC Advances*, 5(55), 44053–44067. <https://doi.org/10.1039/C5RA04605J>
- Jones, S. A. (2016). *Exogenous caffeic acid alters molecular responses in Salvia hispanica* L. <http://etd.uwc.ac.za>
- Kiani, M., Rabiee, N., Bagherzadeh, M., Ghadiri, A. M., Fatahi, Y., Dinarvand, R., & Webster, T. J. (2020). High-gravity-assisted green synthesis of palladium nanoparticles: the flowering of nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102297>
- KIVRAK, Ş., GÖKTÜRK, T., KIVRAK, İ., KAYA, E., & KARABABA, E. (2019). Investigation of phenolic profiles and antioxidant activities of some *Salvia* species commonly grown in Southwest Anatolia using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Science and Technology*, 39(2), 423–431. <https://doi.org/10.1590/fst.32017>

- Koşar, M., Göger, F., & Hüsnü Can Baer, K. (2011). In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey. *Food Chemistry*, 129(2), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.086>
- Kühn, H., & Borchert, A. (2002). Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 154–172. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00855-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00855-9)
- Kulczyński, B., Kobus-Cisowska, J., Taczanowski, M., Kmiecik, D., & Gramza-Michałowska, A. (2019). The chemical composition and nutritional value of chia seeds—current state of knowledge. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11061242>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2013). ScientificWorld Ltd. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kundishora, A., Sithole, S., & Mukanganyama, S. (2020). Determination of the Cytotoxic Effect of Different Leaf Extracts from *Parinari curatellifolia* (Chrysobalanaceae). *Journal of Toxicology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8831545>
- Kundu, A., & Vadassery, J. (2019). Chlorogenic acid-mediated chemical defence of plants against insect herbivores. *Plant Biology*, 21(2), 185–189. <https://doi.org/10.1111/plb.12947>
- Kundu, D., Talukder, P., & Sen Raychaudhuri, S. (2019). *In Vitro Biosynthesis of Polyphenols in the Presence of Elicitors and Upregulation of Genes of the Phenylpropanoid Pathway in Plantago ovata* (pp. 299–344). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00008-5>
- KUSANO, G., TAKAHIRA, M., SHIBANO, M., KUSANO, A., OKAMOTO, Y., TSUJIBO, H., NUMATA, A., & INAMORI, Y. (1998). Studies on Inhibitory Activities of Fukiic Acid Esters on Germination, .ALPHA.-Amylase and Carboxypeptidase A. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(9), 997–999. <https://doi.org/10.1248/bpb.21.997>

- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal and pathogens and insects. In F. Imperato (Ed.), *Phytochemistry: Advances in Research* (1st ed., Vol. 661, pp. 23–67). Research Singpost.
- Li, H., Song, F., Xing, J., Tsao, R., Liu, Z., & Liu, S. (2009). Screening and structural characterization of α -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MSⁿ and SORI-CID FTICR MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(8), 1496–1503. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.04.003>
- Li, Y., Peng, Q., Selimi, D., Wang, Q., Charkowski, A. O., Chen, X., & Yang, C. H. (2009). The plant phenolic compound p-coumaric acid represses gene expression in the *dickeya dadantii* type III secretion system. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1223–1228. <https://doi.org/10.1128/AEM.02015-08>
- Liang, W., Menke, A. L., Driessen, A., Koek, G. H., Lindeman, J. H., Stoop, R., Havekes, L. M., Kleemann, R., & van den Hoek, A. M. (2014). Establishment of a General NAFLD Scoring System for Rodent Models and Comparison to Human Liver Pathology. *PLoS ONE*, 9(12), e115922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115922>
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 763, pp. 1–10). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- López-Alarcón, C., & Lissi, E. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. *Free Radical Research*, 40(9), 979–985. <https://doi.org/10.1080/10715760500481233>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.007>

- Maturana, G. (2019). *Evaluación de la capacidad antioxidante y perfil fenólico en extractos foliares de seis fenotipos de Salvia hispanica L. en distintas etapas de crecimiento a dos niveles de riego*. Universidad de Chile.
- Melo, D., Machado, T. B., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Chia seeds: an ancient grain trending in modern human diets. *Food & Function*, *10*(6), 3068–3089. <https://doi.org/10.1039/C9FO00239A>
- Miao, L., Zhang, H., Cheong, M. S., Zhong, R., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., Cheng, K.-W., Wang, M., Cao, H., Nie, S., Simal-Gandara, J., Cheang, W. S., & Xiao, J. (2023). Anti-diabetic potential of apigenin, luteolin, and baicalein via partially activating PI3K/Akt/Glut-4 signaling pathways in insulin-resistant HepG2 cells. *Food Science and Human Wellness*, *12*(6), 1991–2000. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.03.021>
- Motyka, S., Skąła, E., Ekiert, H., & Szopa, A. (2023). Health-promoting approaches of the use of chia seeds. *Journal of Functional Foods*, *103*, 105480. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105480>
- Mu, H. N., Zhou, Q., Yang, R. Y., Tang, W. Q., Li, H. X., Wang, S. M., Li, J., Chen, W. X., & Dong, J. (2021). Caffeic acid prevents non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet through gut microbiota modulation in mice. *Food Research International*, *143*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110240>
- Ngo, Y. L., Lau, C. H., & Chua, L. S. (2018). Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food and Chemical Toxicology*, *121*, 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.064>
- Nkomo, M., Gokul, A., Keyster, M., & Klein, A. (2019). Exogenous p-coumaric acid improves salvia hispanica L. Seedling shoot growth. *Plants*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/plants8120546>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>

- Pastor-Villaescusa, B., Rodriguez, E. S., & Rangel-Huerta, O. D. (2018). Polyphenols in obesity and metabolic syndrome. In *Obesity: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (pp. 213–239). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812504-5.00011-8>
- Patterson, D. T. (1981). Effects of Allelopathic Chemicals on Growth and Physiological Responses of Soybean (*Glycine max*). *Weed Science*, 29(1), 53–59. <https://doi.org/10.1017/S0043174500025820>
- Pietrzak, W., Nowak, R., & Olech, M. (2014). Effect of extraction method on phenolic content and antioxidant activity of mistletoe extracts from *Viscum album* subsp. *abietis*. *Chemical Papers*, 68(7), 976–982. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0524-4>
- Poblete, A., López-Alarcón, C., Lissi, E., & Campos, A. M. (2009). Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) Values of Herbal Teas Obtained Employing Different Methodologies can Provide Complementary Data. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(2). <https://doi.org/10.4067/S0717-97072009000200013>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 53, Issue 10, pp. 4290–4302). <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Ran, A. K., Sunamoto, J., & Dast, N. P. (1988). INTERACTION OF FLAVONOIDS WITH 1 ,I-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZYL FREE RADICAL, LIPOSOMAL MEMBRANES AND SOYBEAN LIPOXYGENASE-1. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 37, Issue 6).
- Reine Judesse Soviguidi, D., Pan, R., Liu, Y., Rao, L., Zhang, W., & Yang, X. (2022). Chlorogenic Acid Metabolism: The Evolution and Roles in Plant Response to Abiotic Stress. *Phyton*, 91(2), 239–255. <https://doi.org/10.32604/phyton.2022.018284>

- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.062>
- Riaz, U., Kharal, M. A., Murtaza, G., Zaman, Q. uz, Javaid, S., Malik, H. A., Aziz, H., & Abbas, Z. (2018). Prospective Roles and Mechanisms of Caffeic Acid in Counter Plant Stress: A Mini Review. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 32(1). <https://doi.org/10.17582/journal.pjar/2019/32.1.8.19>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS. In *Free Radical Biology & Medicine* (Vol. 20, Issue 7).
- Rizzi, A. (1998). Retention and Selectivity. In D. Corradini, E. Eksteen (Katz), P. Schoenmakers, & N. Miller (Eds.), *Handbook of HPLC* (1st ed., pp. 1–54). CRC Press.
- Russo, B., Picconi, F., Malandrucchio, I., & Frontoni, S. (2019). Flavonoids and insulin-resistance: from molecular evidences to clinical trials. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20092061>
- Schramm, D. D., Collins, H. E., & German, J. B. (1999). *Flavonoid transport by mammalian endothelial cells*.
- Siuzdak, G. (2004). An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, 9(2), 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2004.01.004>
- Soto, C. (2015). *Determinación de la capacidad antioxidante de las espigas de la planta de chíá*. Universidad de Chile.

- Tanase, C., Bujor, O.-C., & Popa, V. I. (2019). Phenolic Natural Compounds and Their Influence on Physiological Processes in Plants. In *Polyphenols in Plants* (pp. 45–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00003-7>
- Taylor, L. P., & Grotewold, E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 8, Issue 3 SPEC. ISS., pp. 317–323). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.005>
- Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Classification of Phenolic Compounds in Plants. In *Polyphenols in Plants* (pp. 263–284). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00026-8>
- Van De Wier, B., Koek, G. H., Bast, A., & Haenen, G. R. M. M. (2017). The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 834–855. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.952399>
- Vergara-Salinas, J. R., Cuevas-Valenzuela, J., & Pérez-Correa, J. R. (2016). Extraction of Polyphenols by Pressurized Liquids. In J. R. Vergara-Salinas, J. Cuevas-Valenzuela, & J. R. Pérez-Correa (Eds.), *Advances in Technologies for Producing Food-relevant Polyphenols* (1 st, Vol. 1, pp. 83–123). CRC Press.
- Wan, L., & Jiang, J.-G. (2018). Protective effects of plant-derived flavonoids on hepatic injury. *Journal of Functional Foods*, 44, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.015>
- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I. S., & Shen, C. L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. In *Journal of Nutritional Biochemistry* (Vol. 25, Issue 1, pp. 1–18). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.001>
- Wang, S. Y., & Lin, H.-S. (2000). Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140–146. <https://doi.org/10.1021/jf9908345>

- Winkel-Shirley, B. (2001). *Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology*. www.plantphysiol.org
- Wolfe, K. L., & Rui, H. L. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(22), 8896–8907. <https://doi.org/10.1021/jf0715166>
- Wroblewski, F., York, N., Jervis, G., & Ladue, J. S. (1956). *The Diagnostic, Prognostic and Epidemiologic Significance of Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGO-T) Alterations in Acute Hepatitis*. <http://annals.org/>
- Wu, C.-H., Yang, M.-Y., Chan, K.-C., Chung, P.-J., Ou, T.-T., & Wang, C.-J. (2010). Improvement in High-Fat Diet-Induced Obesity and Body Fat Accumulation by a *Nelumbo nucifera* Leaf Flavonoid-Rich Extract in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(11), 7075–7081. <https://doi.org/10.1021/jf101415v>
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., & Miron, A. (2016). Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(sup1), S29–S45. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067595>
- Yang, S.-Y., Hong, C.-O., Lee, G. P., Kim, C.-T., & Lee, K.-W. (2013). The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of *Perilla frutescens*, against t-BHP-induced oxidative liver damage. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.042>
- Zanardo, D. I. L., Lima, R. B., Ferrarese, M. de L. L., Bubna, G. A., & Ferrarese-Filho, O. (2009). Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany*, *66*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.014>
- Zúñiga-López, M. C., Maturana, G., Campmajó, G., Saurina, J., & Núñez, O. (2021). Determination of bioactive compounds in sequential extracts of chia leaf (*Salvia hispanica* L.) using uhplc-hrms (q-orbitrap) and a global evaluation of antioxidant in vitro capacity. *Antioxidants*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/antiox10071151>

8. Anexos

8.1. Anexo 1.

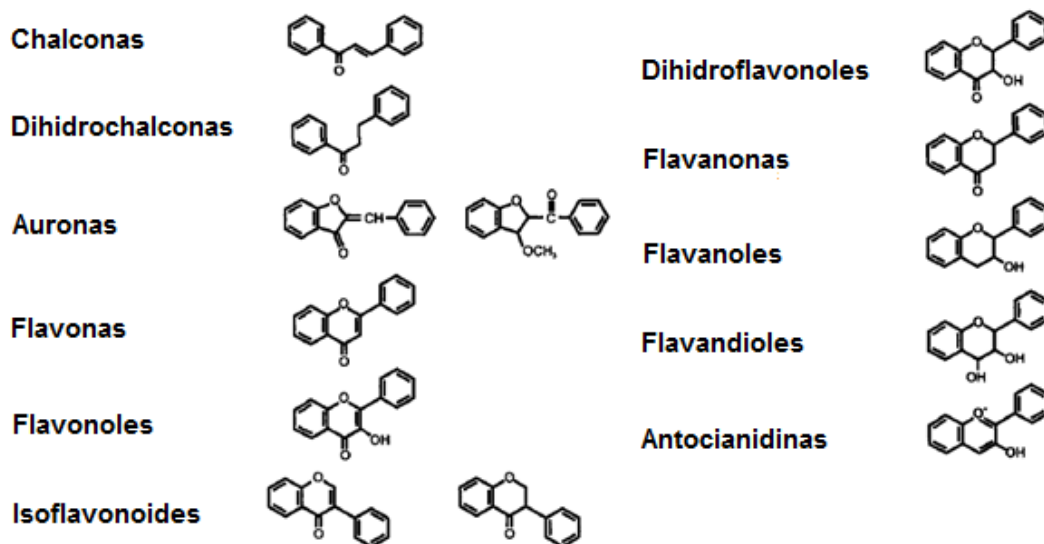


Figura I. Esqueletos básicos de los flavonoides

8.2. Anexo 2.

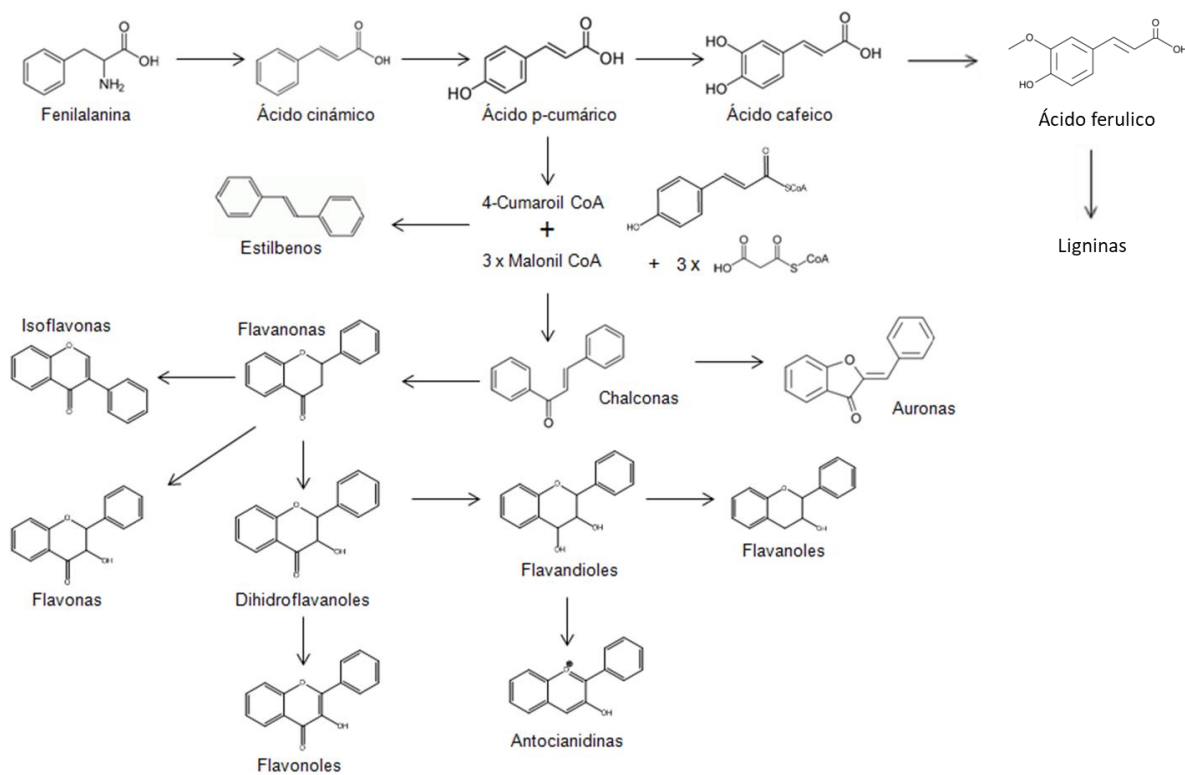


Figura II. Ruta simplificada de biosíntesis de polifenoles

8.3. Anexo 3.

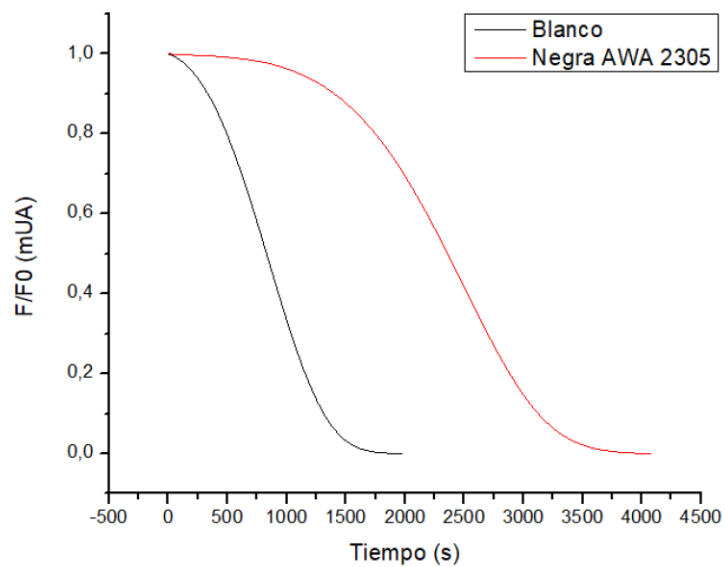


Figura III. Curva normalizada de decaimiento de la fluorescencia para el extracto AWA del fenotipo negro en el segundo muestreo

8.4. Anexo 4.

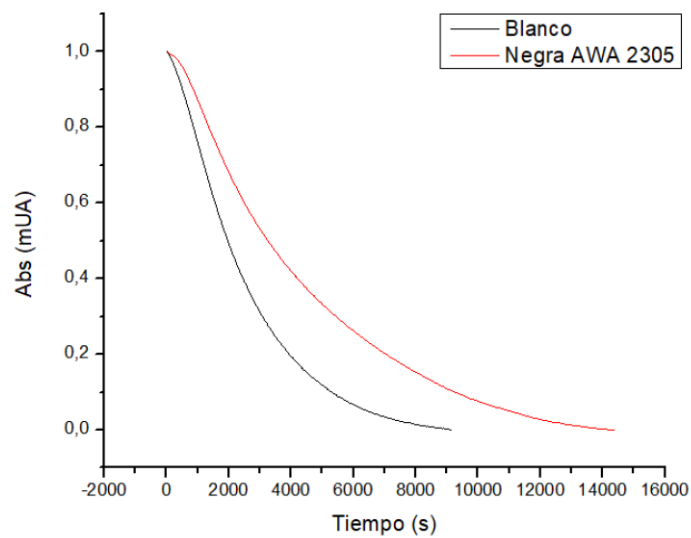


Figura IV. Curva normalizada de decaimiento de la absorbancia para el extracto AWA del fenotipo negro en el segundo muestreo

8.5. Anexo 5.

Tabla I. Gradiente de fase móvil utilizado para la determinación del perfil fenólico mediante HPLC-DAD-FLD.

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

8.6. Anexo 6.

Tabla II. Gradiente de fase móvil utilizado para la determinación del perfil fenólico mediante UHPLC-MS.

Tiempo (min)	%A	%B
0	90	10
1	90	10
20	5	95
23	5	95
24	90	10
30	90	10
37	70	30
38	8	92

8.7. Anexo 7.

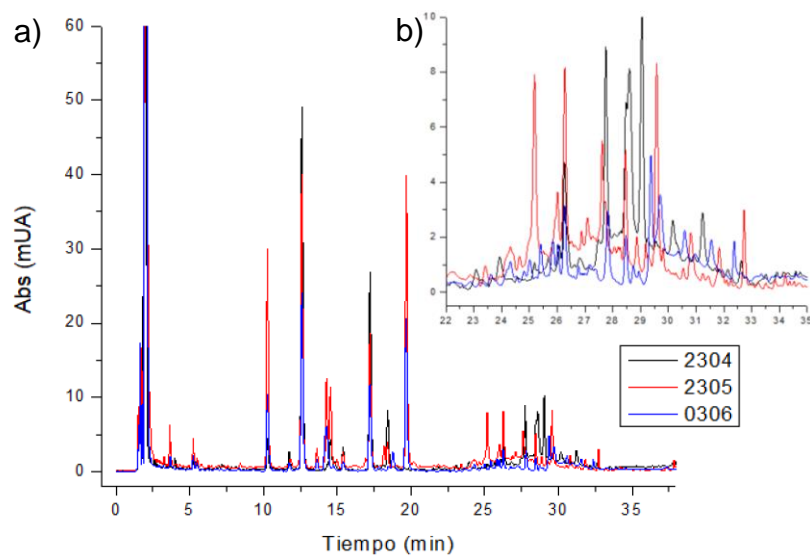


Figura V. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo Blanca a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).

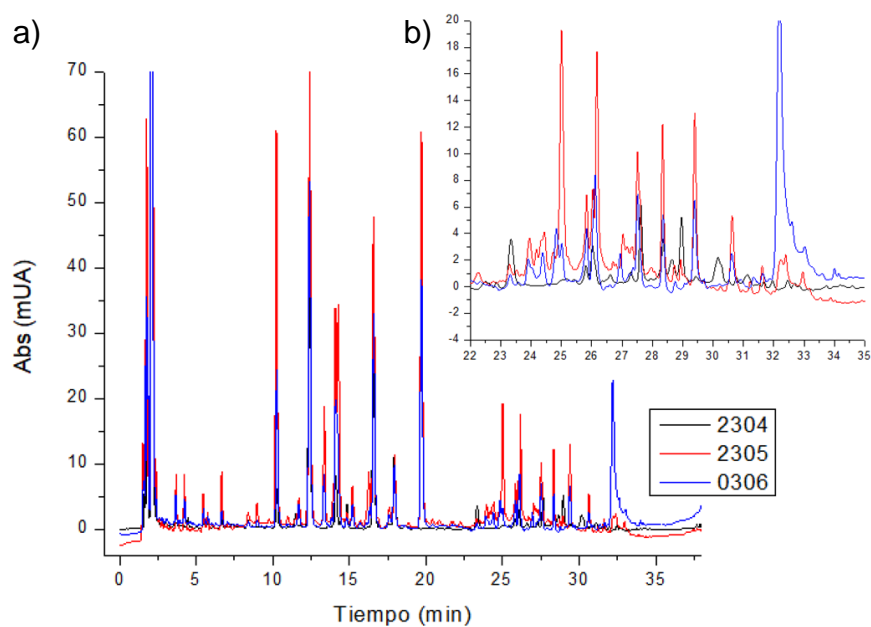


Figura VI. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo Tardía a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).

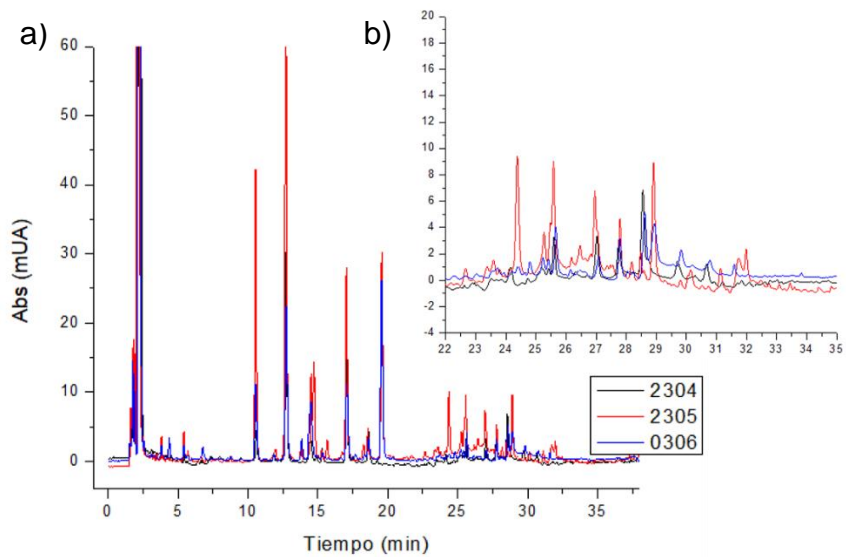


Figura VII. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo Pinta a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).

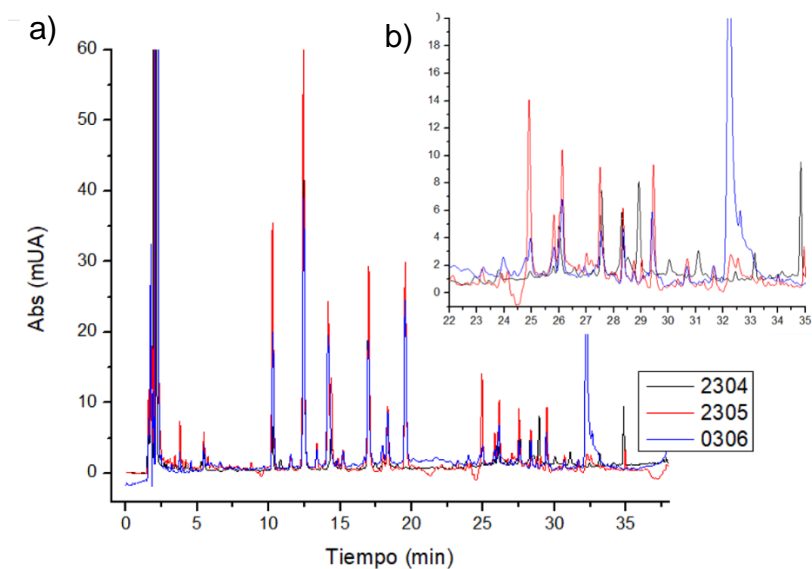


Figura VIII. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo P2N54 a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).

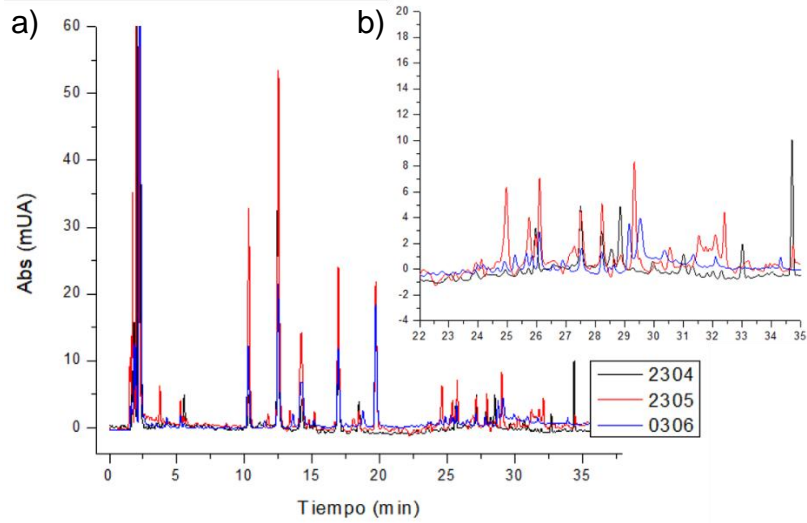


Figura IX. Cromatogramas obtenidos para los extractos AWA del fenotipo B54 a 278 nm para cada uno de los muestreos realizados. a) cromatograma completo; b) ampliación de la zona (iii).

8.8. Anexo 8.

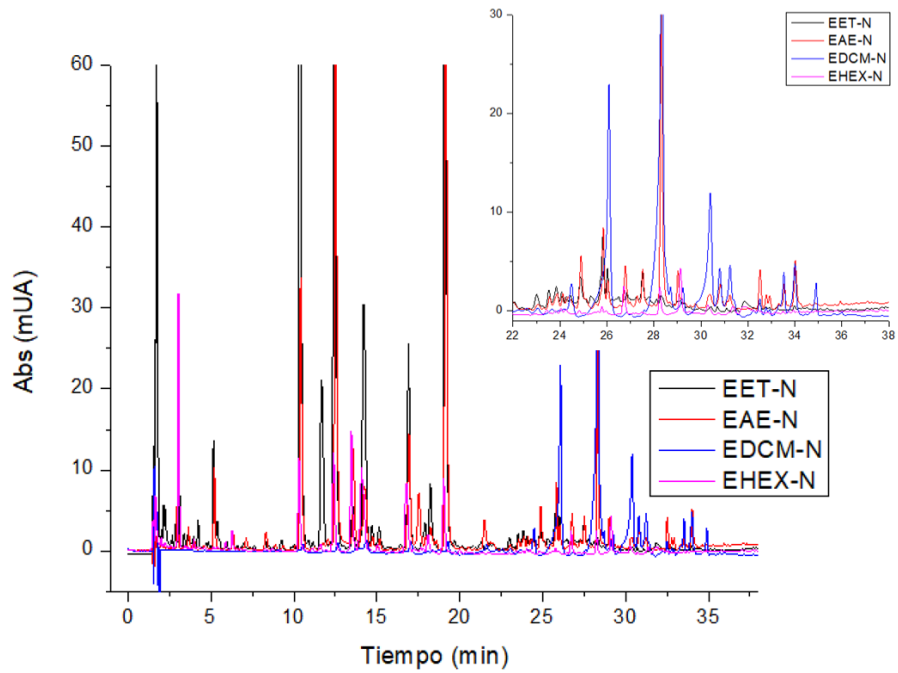


Figura X. Cromatogramas registrados a 278 nm para los 4 extractos secuenciales (EET, EAE, EDCM y EHEX) para el fenotipo negra donde a) cromatograma completo y b) ampliación de la zona (iii) (22 a 36 min).

8.9. Anexo 9.

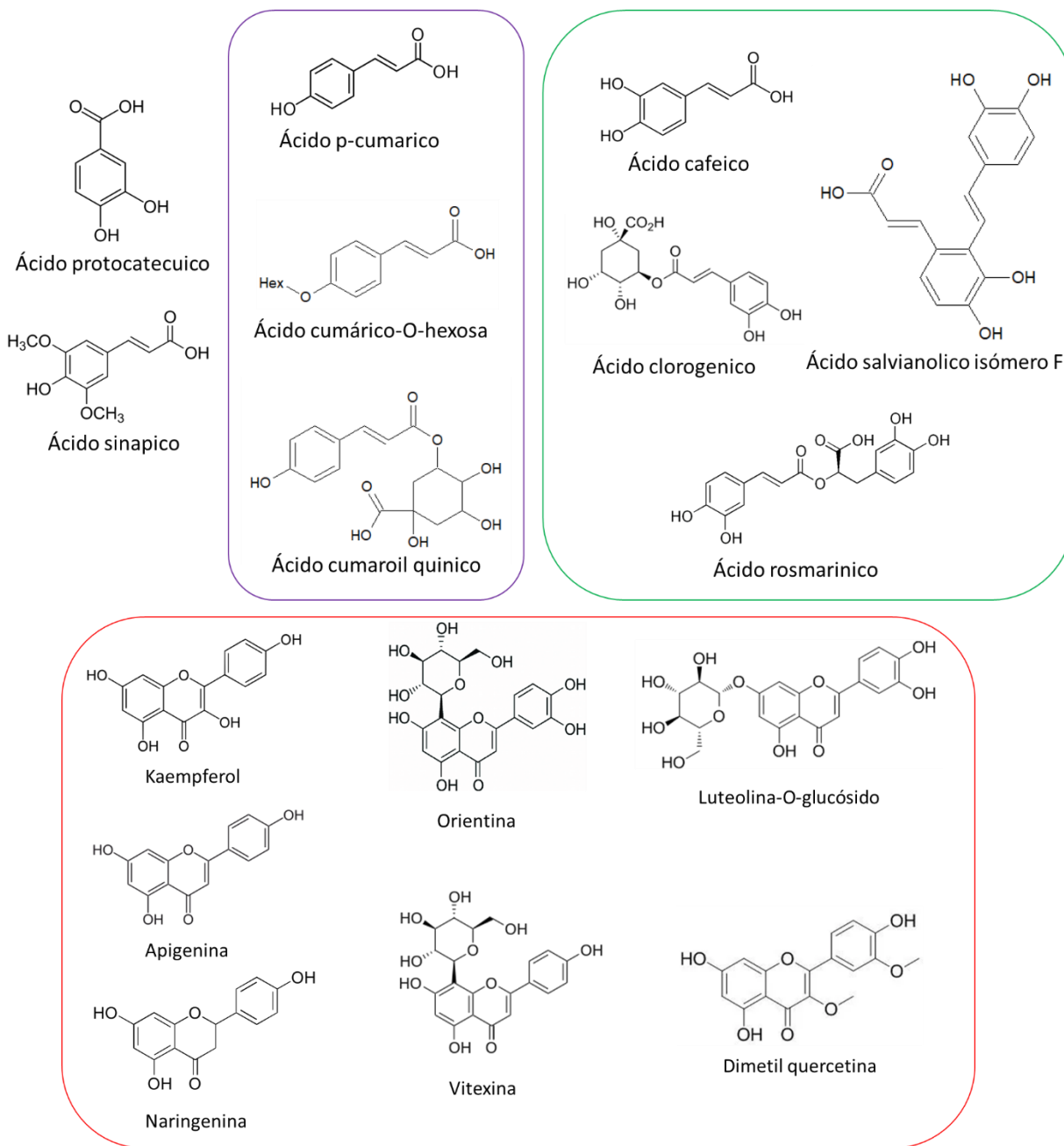


Figura XI. Estructuras químicas de los compuestos identificados mediante espectrometría de masas en los extractos secuenciales de hojas de chía.