

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE LA CHÍA: EFECTO DEL
MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y TEMPERATURA SOBRE LA
ESTABILIDAD ANTIOXIDANTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

NAYELY CRUZ PÉREZ

MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. María de los Ángeles Valdivia López
Vocal	Prof. Hermilo Leal Lara
Secretario	Prof. Alberto Tecante Coronel
1 ^{er} Suplente	Prof. Karla Mercedes Díaz Gutierrez
2 ^{do} Suplente	Prof. Armando Conca Torres

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 322-323 Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria,
UNAM

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López
ASESOR

Nayely Cruz Pérez
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la DGAZA por haberme apoyado económicamente durante la realización experimental de este proyecto.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme muchos años de enseñanza dentro y fuera del aula para mi desarrollo profesional y personal.

Gracias a mis padres por apoyarme incondicionalmente durante toda mi vida, yo se que tanto su apoyo como su amor nunca se terminarán.

Gracias a Marlene y Ricardo por haberme salvado muchas veces en mis tantas horas de angustia enfrente de esa máquina de quién todos somos esclavos.

Gracias a Jesús Héctor por todo lo que me ha dado desde que nos conocemos, y todo lo que nos falta por descubrir juntos en este mundo lleno de maravillas. (Hey, siempre me acuerdo y pienso lo mismo).

Gracias a todos mis familiares y conocidos que se han preocupado por mí, espero poder corresponderles.

Gracias a todas esas personas que conocí en las aulas desde primer semestre y que espero que no nos perdamos la pista.

*Gracias al Lab. 322-323, tanto la instalación como los que en él habitan, cómo olvidar las horas de comida y de chisme, eso sí no sin terminar primero nuestros deberes del día.
Ja, ja, ja.*

Sobretudo gracias a Dios porque sin él nada de esto sería posible ni hoy ni nunca.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos específicos.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Chía (<i>Salvia hispánica</i>).....	6
4.1.1 Generalidades.....	6
4.1.2 Propiedades funcionales.....	7
4.2 Plifenoles.....	8
4.2.1 Clasificación.....	9
4.2.2 Solubilidad.....	14
4.2.3 Estabilidad.....	15
4.2.4 Presencia en alimentos y consumo.....	15
4.2.5 Polifenoles encontrados en la chía.....	16
4.2.6 Funciones.....	18
4.3 Antioxidantes y compuestos polifenólicos.....	19
4.3.1 Oxidación lipídica (autooxidación).....	22
4.3.2 Actividad Antioxidante.....	24
4.3.2.1 Ácidos fenólicos.....	26
4.3.2.2 Flavonoides.....	27
4.4 Extracción.....	29
4.4.1 Extracción de compuestos polifenólicos.....	30
4.5 Cuantificación de compuestos polifenólicos.....	31
4.5.1 Identificación espectrofotométrica.....	31
4.5.2 Cromatografía HPLC.....	32
4.5.2.1 Identificación y cuantificación por cromatografía HPLC.....	33
4.6 Determinación de actividad antioxidante.....	34
4.6.1 Ensayo de DPPH•.....	35
4.6.2 Ensayo de ABTS• ⁺	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
Diagrama de trabajo.....	40

Primera etapa: <u>Efecto del uso de diferentes muestras de chía en el rendimiento y actividad durante la extracción de polifenoles</u>	
Pretratamiento (Molienda y desengrasado)	42
5.1 Análisis proximal.....	43
5.2 Extracción cruda.....	43
5.3 Cuantificación.....	44
5.3.1 Polifenoles totales (Folin-Ciocalteu).....	44
5.3.2 Flavonoides.....	45
5.3.3 Flavonoles.....	46
5.3.4 HPLC.....	46
5.4 Determinación de Capacidad Secuestrante.....	47
5.4.1 Radical DPPH•.....	47
5.4.2 Radical catiónico ABTS• ⁺	48
Segunda etapa: <u>Efecto de la temperatura de hidrólisis en el rendimiento de los polifenoles presentes en la chía</u>	
5.5 Extracción ácida.....	49
5.6 Análisis estadístico.....	51
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	52
Primera etapa: <u>Efecto del uso de diferentes muestras de chía en el rendimiento y actividad durante la extracción de polifenoles</u>	
6.1 Análisis de las muestras.....	52
6.1.1 Análisis composicional.....	52
6.2 Extracción cruda de los compuestos polifenólicos.....	54
6.3 Cuantificación.....	55
6.3.1 Polifenoles totales.....	55
6.3.2 Cuantificación de flavonoides.....	55
6.3.3 Cuantificación de flavonoles.....	56
6.3.4 HPLC.....	57
6.4 Determinación de Capacidad Secuestrante.....	59
6.4.1 Radical DPPH•.....	59
6.4.2 Radical catiónico ABTS• ⁺	62
6.5 Ensayo de HPLC.....	64
Segunda etapa: <u>Efecto de la temperatura de hidrólisis en el rendimiento de los polifenoles presentes en la chía</u>	
6.6 Extracción termoácida (Hidrolizado).....	71
6.7 Cuantificación.....	72
6.7.1 Cuantificación total, flavonoides y flavonoles.....	72
6.8 Determinación de capacidad secuestrante (DPPH•, ABTS• ⁺).....	74
6.9 Cuantificación de polifenoles totales, flavonoides y flavonoles.....	77

6.10 Perfil HPLC.....	78
6.11 Determinación de Capacidad Secuestrante (DPPH•, ABTS• ⁺).....	81
Tercera etapa: <u>Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad de los polifenoles obtenidos de la chía</u>	
6.12 Extracto Crudo.....	84
6.12.1 Cuantificación total.....	84
6.12.2 Determinación de Capacidad Secuestrante.....	85
6.13 Extracto hidrolizado a 60 °C.....	86
6.13.1 Cuantificación total.....	86
6.13.2 Determinación de Capacidad Secuestrante.....	87
6.13.3 Perfil HPLC.....	89
7. CONCLUSIONES.....	94
8. BIBLIOGRAFÍA.....	96
9. ANEXO.....	101
9.1 Metodologías realizadas para la determinación del análisis proximal de las muestras.....	101
9.2 Curvas patrón utilizadas para los métodos espectrofotométricos.....	104
9.3 Gradientes utilizados en el ensayo de HPLC.....	107
9.4 Resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los extractos crudo e hidrolizado	108
9.5 Análisis de varianza (ANOVA) realizadas.....	110
9.6 Figuras de la capacidad secuestrante (DPPH•, ABTS• ⁺) en extractos.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Planta de la chía.....	7
2. a) Formación del ión fenóxido y deslocalización b) Formación de especies radicales.....	8
3. Clasificación de las estructuras polifenólicas.....	10
4. Ruta biosintética de los fenilpropanoides en plantas.....	11
5. Estructura básica de los flavonoides.....	12
6. Diferencia estructural entre glucósido y aglucón.....	12
7. Antioxidantes sintéticos.....	21
8. ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-carboxílico.....	35
9. Reacción con DPPH•.....	36
10. Reacción con ABTS•+.....	37
11. Cromatogramas de los extractos crudos Central (a) y Sinaloa (b).....	58
12. Determinación de Capacidad Secuestrante con DPPH• en extractos crudos.....	60
13. Determinación de capacidad secuestrante con ABTS•+ en extractos crudos.....	63
14. Cromatogramas de los diferentes gradientes de los estándares.....	67
15. Estructuras de la mezcla estándar de acuerdo con su tiempo de retención.....	71
16. Determinación de capacidad secuestrante con DPPH• en extractos hidrolizados 92 °C.....	75
17. Determinación de la capacidad secuestrante con ABTS•+ en extractos hidrolizados 92 °C.....	75
18. Cromatograma del extracto hidrolizado Central 92 °C (a)..... Cromatograma del extracto hidrolizado Central 60 °C (b).....	79 80
19. Determinación de la capacidad secuestrante con DPPH• en extracto hidrolizado a diferente temperatura.....	81
20. Determinación de la capacidad secuestrante con ABTS•+ en extracto hidrolizado a diferente temperatura.....	81
21. Efecto de la temperatura de almacenamiento del extracto crudo sobre la concentración de polifenoles.....	85
22. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la capacidad secuestrante del extracto crudo.....	86
23. Efecto de la temperatura de almacenamiento del extracto hidrolizado a 60 °C sobre la concentración de polifenoles.....	87
24. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la capacidad secuestrante del extracto hidrolizado a 60 °C.....	88
25. Cromatograma de cinética para el extracto hidrolizado a) tiempo cero..... b) temperatura ambiente (20-25 °C)..... c) refrigeración (4 °C)..... d) congelación (-18 °C).....	90 91 92 93

ÍNDICE DE TABLAS

1. Gradiente utilizado en la determinación por HPLC.....	47
2. Concentraciones de los estándares.....	47
3. Composición de cinco muestras de chía y otras fuentes.....	53
4. Contenido de polifenoles en los extractos crudos (glucosilados).....	56
5. Capacidad secuestrante entre el ensayo de DPPH• y ABTS ⁺ para los extractos crudos.....	62
6. Gradientes utilizados para obtener la mejor respuesta.....	64
7. Factor de respuesta de los estándares analizados.....	66
8. Contenido de polifenoles totales, flavonoides y flavonoles en los extractos hidrolizados.....	73
9. Capacidad secuestrante para los ensayos de DPPH• y ABTS ⁺ en los extractos hidrolizados 92 °C.....	76
10. Contenido de polifenoles en los extractos hidrolizados obtenidos utilizando dos temperaturas de extracción.....	78
11. Capacidad secuestrante para los ensayos de DPPH• y ABTS ⁺ en los extractos hidrolizados a dos temperaturas de la semilla de chía Central.....	83
12. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la concentración de los polifenoles identificados por HPLC.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS DE LOS ANEXOS

A1. Curva patrón en cuantificación total por Folin.....	104
A2. Determinación de flavonoides.....	105
A3. Determinación de flavonoles.....	106
A4. Cinética de la capacidad secuestrante de DPPH• en extractos crudos.....	122
A5. Cinética de la capacidad secuestrante de ABTS•+ en extractos crudos.....	123
A6. Cinética de la capacidad secuestrante de DPPH• en extractos hidrolizados a 92 °C...	124
A7. Cinética de la capacidad secuestrante de ABTS•+ en extractos hidrolizados a 92 °C.	125
A8. Cinética de la capacidad secuestrante de DPPH• en extractos hidrolizados a diferentes temperaturas.....	126
A9. Cinética de la capacidad secuestrante de ABTS•+ en extractos hidrolizados a diferentes temperaturas.....	127

ÍNDICE DE TABLAS DE LOS ANEXOS

A1. Absorbancias para la curva patrón de Folin.....	104
A2. Absorbancias para la curva patrón de flavonoides.....	105
A3. Absorbancias para la curva patrón de flavonoles.....	106
A4. Gradiente 1: tiempo de corrida 76 minutos.....	107
A5. Gradiente 2: tiempo de corrida 56 minutos.....	107
A6. Gradiente 3: tiempo de corrida 81 minutos.....	107
A7. Gradiente 4: tiempo de corrida 96 minutos.....	107
A8. Cuantificación total de polifenoles en el extracto crudo Central.....	108
A9. Determinación de la capacidad secuestrante en el extracto crudo Central.....	108
A10. Cuantificación total de polifenoles en el extracto hidrolizado a 60 °C de la semilla Central.....	109
A11. Determinación de la capacidad secuestrante en el extracto hidrolizado a 60 °C de la semilla de chía Central.....	109
A12. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la figura A4.....	122
A13. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la figura A5.....	123
A14. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la figura A6.....	124
A15. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la figura A7.....	125
A16. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la figura A8.....	126
A17. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la figura A9.....	127

1. RESUMEN

La chía (*Salvia hispánica*) es una semilla que perdió importancia durante la época de la conquista, actualmente no es muy conocida por la población. Sin embargo, se ha encontrado que posee características que hacen de esta semilla un producto muy interesante ya que posee buena fuente de proteínas con propiedades funcionales, ácidos grasos insaturados como el linolénico, carbohidratos que tienen capacidad de retención de agua y aceite, además de poseer antioxidantes.

Este trabajo se enfocó a los antioxidantes de la semilla de chía presentes en forma de polifenoles. Estos fueron extraídos de la semilla desengrasada para poder cuantificarlos y determinar su actividad. Se trabajó con cuatro semillas de chía y una en forma de harina, a estas se les realizó dos procesos de extracción (crudo e hidrolizado) en el que el extracto hidrolizado presentó una mayor concentración de antioxidantes. También se les determinó su capacidad antioxidante con dos técnicas diferentes en donde ambos extractos presentaron buenas actividades para todas las muestras trabajadas. La extracción hidrolizada se realizó con dos temperaturas diferentes (92 °C y 60 °C) en donde la menor temperatura presentó mejor actividad antioxidante.

Se realizó un ensayo por HPLC en donde se identificó ácido caféico, quercetina y kaempferol como polifenoles presentes en la semilla de chía.

Se monitoreo la estabilidad durante el almacenamiento a diferentes temperaturas (-18 °C, 4 °C, 20-25 °C) en donde se encontró que el extracto hidrolizado (60 °C, 3h) fue muy estable durante 100 días siendo su estabilidad independiente de la temperatura de almacenamiento.

Por lo tanto, un extracto hidrolizado a 60 °C, 3 h, y almacenado en condiciones de refrigeración puede durar 100 días antes de perder su actividad antioxidante. En estudios posteriores se puede investigar la utilidad de estos antioxidantes al ser aplicados en alimentos determinando el deterioro por oxidación.

2. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de productos industrializados ha ido en aumento los últimos años. Actualmente se está haciendo un importante esfuerzo por rescatar los productos naturales indicando a la gente los beneficios que puede representarles el consumirlos. Uno de estos productos es la semilla de la chía.

La chía (*Salvia hispanica*) es una planta anual de la familia Lamiaceae que se produce principalmente en el Estado de Jalisco y algunas regiones de Sinaloa. Comenzó a usarse como alimento hace unos 5500 años, se convirtió en un cultivo básico en el centro de México y era consumido por los Aztecas debido a su aporte energético (Beltrán Orozco y Romero, 2002). En la época virreinal los españoles la relegaron junto con el amaranto hasta casi su extinción y la fueron sustituyendo por el trigo. Sin embargo, el cultivo de la chía ha sobrevivido hasta nuestros días aunque no es tan popular como el maíz o el frijol, por ejemplo.

La semilla de la chía posee características funcionales de gran importancia que han sido estudiadas recientemente. Olivos Lugo (2005) encontró que contiene alrededor de 20% de proteína, con especial presencia de glutelina. Esta proteína tiene una gran estabilidad térmica y capacidad de retención de agua y aceite, por lo que se propone su uso en panadería. Álvarez Chávez (2004) afirmó que la chía contiene 30% de aceite, por lo que puede ser considerada como oleaginosa, en este aspecto destacan fitoesteroles que pueden estar relacionados con actividad nutracéutica, además de la presencia de ácidos grasos esenciales insaturados como el ácido

linolénico. Reyes Caudillo (2006) concluyó que tiene un alto contenido de fibra dietética con la capacidad de retener agua y de estabilizar emulsiones; esta fibra es importante por que se sabe que tiene efectos hipocolesterolémicos, además de poseer una alta concentración de antioxidantes naturales que se presentan en forma de estructuras polifenólicas (sistemas de anillos bencénicos fusionados) que tienen la capacidad de retardar el efecto de la oxidación lipídica.

La adición de antioxidantes es un método para aumentar la vida de anaquel, especialmente en grasas, aceites y alimentos con una cantidad de grasa importante. Los antioxidantes como BHA y BHT han sido restringidos en alimentos ya que tienen efectos toxicológicos en varias especies, en consecuencia en los últimos años ha ido creciendo el uso de antioxidantes procedentes de plantas. Una opción para obtener estos antioxidantes naturales puede ser la semilla de la chía, pero es importante conocer más su comportamiento al ser extraídos y almacenados.

Este trabajo tuvo por objetivo conocer el efecto de las condiciones de extracción y almacenamiento sobre la estabilidad de los polifenoles presentes en cuatro muestras de semilla de chía y una harina de chía. Se determinaron las condiciones óptimas de extracción en las cuales se obtuvo una mayor concentración de polifenoles y actividad antioxidante. Asimismo, se usó la técnica de HPLC para determinar algunos compuestos polifenólicos presentes en los extractos, en especial ácido caféico, quercetina y kaempferol.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de extracción y almacenamiento que producen mayor estabilidad en el extracto polifenólico obtenido en la semilla de chía (*Salvia hispanica*) para determinar si el extracto es adecuado para ser utilizado como antioxidante natural.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer el efecto de utilizar semillas de chía diferentes sobre el rendimiento en la extracción de polifenoles así como su actividad para ver el efecto entre semillas.
- Identificar por medio de HPLC algunas especies polifenólicas presentes en la semilla de chía para poder ser comparadas con otras especies de salvia.
- Evaluar el efecto que tiene la temperatura de almacenamiento sobre la concentración y actividad antioxidante de los polifenoles de la semilla de chía.

4. ANTECEDENTES

4.1 Chia (*Salvia hispanica*)

4.1.1 Generalidades

La chía (Figura 1) es una planta anual de verano, originaria de las regiones montañosas que van desde el Oeste central de México hasta el norte de Guatemala, cuyo clima es cálido y semicálido con lluvias escasas (de tropical a subtropical) en esta temporada. Hay un grupo amplio de variedades de chía, entre las más comunes se encuentran *Salvia polystachya*, *Salvia hispanica*, *Hyptis suaveolens* (INIFAP, 1996). La chía crece en bosques de juníperos, encinos, pinos, pino-encinos a una altitud aproximada de 1900 metros sobre el nivel del mar. Se reproduce por semilla desde finales de la primavera hasta principios del verano. Se cultiva en los municipios de Cuautitlán, Ahualulco de Mercado, Tolimán, Jalisco; y Tzintzuntzán, Uruapan, Zacapu, Erongarícuaro, Huaniqueo, Morelia, Pátzcuaro y La Piedad, Michoacán; además, en pequeña escala, en Morelos, Puebla y Guerrero. Las formas silvestres se dispersan a través de la Sierra Madre Occidental de Sonora y de Chihuahua. (<http://www.saludvida.com>).

La producción de chía en el periodo del imperio azteca llegó hasta 15,000 toneladas anuales (Beltrán Orozco y Romero, 2002). Actualmente el consumo y la producción ha disminuido muy significativamente, como nos lo indica el que en el municipio de Acatic, Lagos de Moreno, Jalisco, la superficie cosechada en 2004 fue de 250 ha, con una producción de 600 ton de semilla (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>), mientras que en 2006 se cosecharon 15 ha, con una producción de 37.5 ton.

Clasificación taxonómica (<http://www.itis.gov/index.html>) de la chía:

Reino	<i>Plantae</i> : plantas
Subreino	<i>Tracheobionta</i> : planta vascular
División	<i>Magnoliophyta</i> : angiospermas
Clase	<i>Magnoliópsida</i> : dicotiledones
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Salvia</i> L
Especie	<i>Salvia hispanica</i> L



Figura 1. Planta de la chía

4.1.2 Propiedades funcionales

La semilla de chía posee gran riqueza composicional (Bushway et al., 1981) ya que contiene:

Humedad	4.31 ± 0.16%
Grasa	29.80 ± 0.87%
Fibra	18.00 ± 0.64%
Cenizas	4.61 ± 0.03%
Proteína	23.60%
Carbohidratos	18.70%

Otros autores, como Ayerza y Coates, (1995), reportan ácido linoléico; Bushway et al. (1981), ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) y linolénico (18:3), y las sales minerales de Ca, K, Mg, P, Al, B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn. Reyes Caudillo (2006) concluyó que tiene un alto contenido de fibra dietética (66%) e indica propiedades de capacidad de retener agua y estabilizar emulsiones, además de que su fibra dietética insoluble es importante ya que puede tener efectos hipocolesterolémicos. Posee también elementos naturales que al extraerlos de la semilla desengrasada presentan actividad antioxidante, es decir, estructuras polifenólicas (sistemas de anillos bencénicos fusionados) que tienen la capacidad de

retardar el efecto de la oxidación de las grasas. Ayerza y Coates (1995) encontraron ácido clorogénico, ácido caféico, myricetina, quercetina y kaempferol.

4.2 Polifenoles

El término “fenólico” deriva de fenol, se aplica a sustancias que poseen uno o más grupos hidroxilo (OH) como sustituyentes alrededor de un anillo aromático. Los compuestos que tienen muchos sustituyentes fenólicos se conocen como polifenoles.

Una propiedad de los grupos hidroxilo fenólico es su acidez, que está dada por el enlace entre el oxígeno y la liberación de hidrógeno para formar el correspondiente ion fenóxido cargado negativamente, esto se muestra en la figura 2 (Waterman y Mole, 1994).

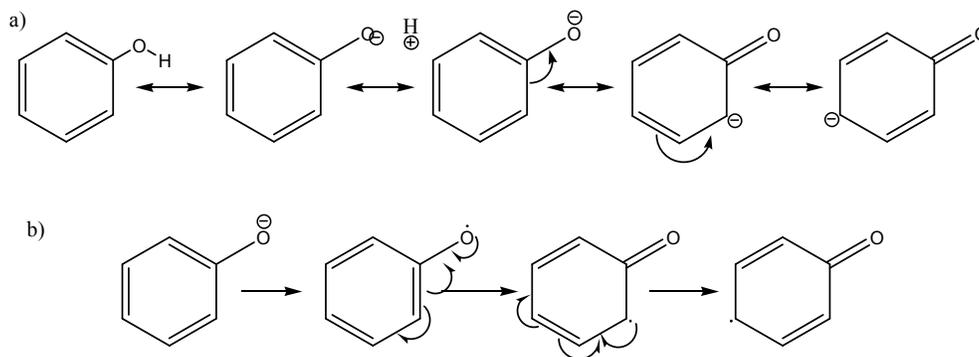


Figura 2. a) Formación del ion fenóxido y deslocalización. b) Formación de especies radicales

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y pueden encontrarse en forma soluble en el interior de las vacuolas o formando parte de las paredes celulares como el caso de la lignina. Biogénicamente proceden de dos rutas metabólicas: la ruta del ácido quínico, en la que se forman principalmente fenilpropanoides y la ruta del ácido acético, cuyos principales productos son los fenoles sencillos (Sánchez, 2002).

4.2.1 Clasificación

Sánchez (2002) divide los compuestos fenólicos en cuatro grupos: compuestos polifenólicos de bajo peso molecular (ácidos fenólicos), flavonoides, ligninas y taninos (Figura 3). Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluye ácidos hidroxibenzóicos y ácidos hidroxicinámicos que se encuentran como ésteres con glucosa y ácido quínico, mismos que se encuentran unidos covalentemente a proteínas o a la pared celular polisacárida.

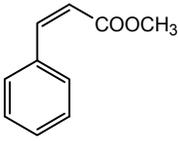
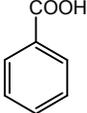
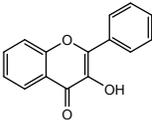
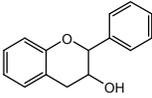
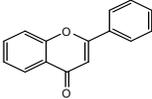
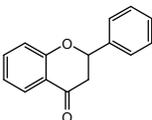
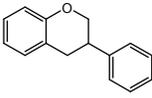
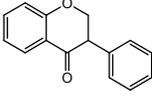
Clase	Subclase	Ejemplos	Estructura general
Fenoles y ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	<ul style="list-style-type: none"> Ácido caféico Ácido ferúlico Ácido rosmarínico Ácido carnósico Gingerol Hydroxitirosol 	
	Ácidos hidroxibenzóicos	<ul style="list-style-type: none"> Ácido ellágico Ácido gálico 	
Ligninas	Polímeros de catequina y epicatequina		
Taninos			
Flavonoides	Flavonoles	<ul style="list-style-type: none"> Quercetina Kaemferol Myricetina 	
	Flavanoles	<ul style="list-style-type: none"> Catequina Epicatequina 	
	Flavonas	<ul style="list-style-type: none"> Apigenina Luteolina 	
	Flavanonas (dihidroflavonas)	<ul style="list-style-type: none"> Hesperitina Naringenina Naringina 	
	Isoflavanas	Glabridina	
	Isoflavonas	<ul style="list-style-type: none"> Genisteina Daidzeina 	

Figura 3. Clasificación de las estructuras polifenólicas

Los ácidos hidroxicinámicos son los fenilpropanoides más distribuidos en tejidos de plantas y se producen a partir de la L-fenilalanina o L-tirosina (Figura 4).

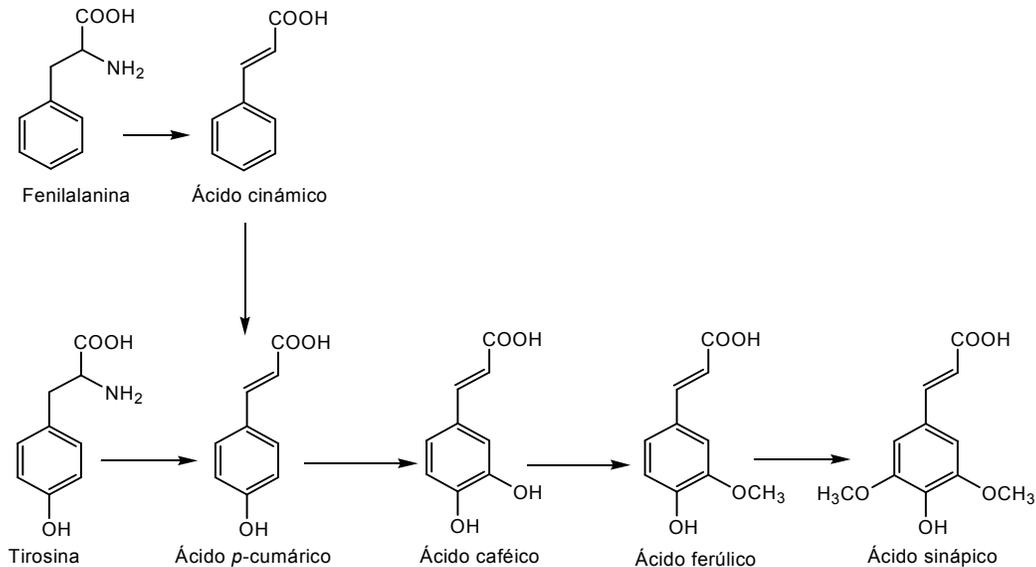


Figura 4. Ruta biosintética de los fenilpropanoides en plantas (Rice-Evans et al., 1997)

El ácido caféico es el ácido fenólico más predominante en las semillas y afecta la solubilidad de la proteína en la planta; junto con el ácido clorogénico, son los responsables del oscurecimiento enzimático en algunos alimentos como la papa. El ácido rosmarínico es el antioxidante principal en el romero y la salvia.

Los flavonoides son el grupo más estudiado de los fenoles por ser el más abundante e importante en la naturaleza; su estructura molecular consiste en un anillo aromático A, condensado a un anillo heterocíclico C unido a un segundo anillo aromático B como se muestra en la Figura 5.

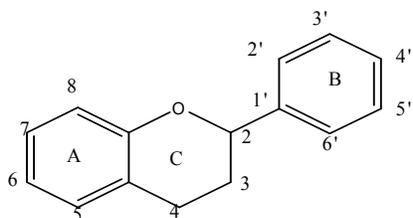


Figura 5. Estructura básica de los flavonoides

El anillo A procede de una molécula de resorcinol o floroglucinol, sintetizada en la vía del acetato, y el anillo B es un derivado de la vía del siquimato.

Estos compuestos son fenólicos secundarios y poseen una actividad antioxidante significativa, se encuentran generalmente en las plantas en forma de 3-O-glucósidos (complejos de azúcares como la glucosa, glucoramina, galactosa, arabinosa y ramnosa (gluconas) con compuestos polifenólicos (aglucones) unidos por un enlace eter-glucósido) y están agrupados en antocianinas y antoxantinas (Rakic et al., 2006). Las antocianinas son glucósidos de antocianidina y forman el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles en las plantas. Las antoxantinas son incoloras o blancas a amarillas e incluyen flavonoles, flavanoles, flavanas, flavanos, flavanonas e isoflavonas. Un ejemplo estructural de la diferencia entre glucósido y aglucón se muestra en la Figura 6.

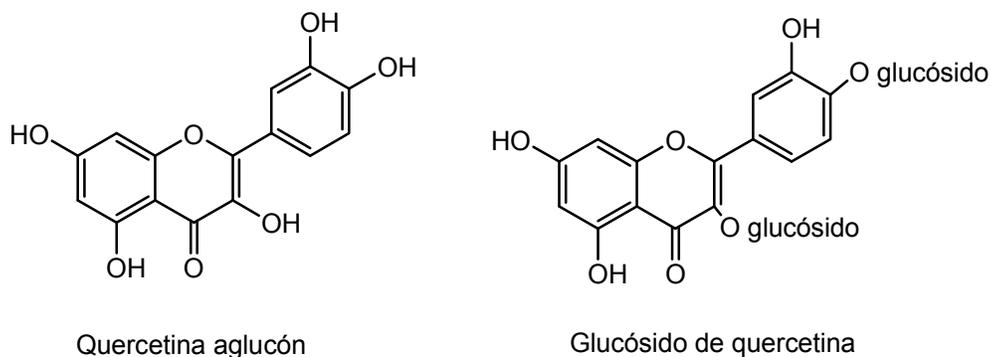


Figura 6. Diferencia estructural entre glucósido y aglucón (ejemplo de quercetina)

Las flavonas y los flavonoles son los grupos de flavonoides más comunes. Los flavonoles aparecen comúnmente en forma de O-glucósidos, mientras que las flavonas son más comunes como O-glucósidos y C-glucósidos caracterizándose los últimos por poseer un enlace C-C entre el carbono anomérico de una molécula de azúcar y el C-6 o C-8 del núcleo de la flavona, además de que no son separados por hidrólisis ácida, lo que sí ocurre con los O-glucósidos. Los flavonoles más comunes son quercetina, kaempferol y miricetina. Las flavonas más comunes son apigenina, luteolina y crisina.

Los flavanoles más comunes como catequina, galocatequina y epicatequina son los constituyentes monoméricos de los taninos condensados y se encuentran combinados con ácido gálico como galato de catequina o galato de epicatequina.

Los flavanos principales son hesperitina, hesperidina, naringenina y naringina (Cadenas, 2002).

Las ligninas comprenden un elevado número de compuestos lo que las hace complejas y heterogéneas, mantienen la rigidez de la célula y la protegen frente a la degradación bacteriana.

Los taninos son polímeros polifenólicos de intermedio a elevado peso molecular. Se caracterizan por su elevado contenido en grupos hidroxilos, lo que les confiere una gran capacidad para formar complejos insolubles con carbohidratos y proteínas. Pueden dividirse en tres grupos: taninos hidrolizables, taninos condensados y taninos complejos.

Los taninos hidrolizables pueden condensarse oxidativamente con otras moléculas de ácido gálico por enlaces éter o C-C formando polímeros de alto peso molecular, no obstante, son fácilmente hidrolizables en medio ácido o alcalino, con agua caliente o enzimas; el tanino mejor conocido es el ácido tánico. Los taninos condensados o proantocianidinas son insolubles en solventes acuosos y orgánicos. Los taninos complejos son la combinación de un tanino hidrolizable con un flavonoide unidos por enlaces C-C.

4.2.2 Solubilidad

La localización de los compuestos polifenólicos (libres en la fracción soluble de la célula o unidos a componentes de la pared celular) en la planta, junto con su estructura química, permite diferenciar entre polifenoles solubles e insolubles.

Los polifenoles solubles son compuestos de bajo e intermedio peso molecular extraíbles con diferentes solventes. Este grupo engloba a los compuestos polifenólicos de bajo y medio peso molecular no unidos a componentes de membrana, tales como fenoles sencillos, flavonoides y taninos que cumplan estas condiciones.

Los polifenoles insolubles o taninos condensados son polifenoles de alto peso molecular, superior a 5000 Daltons, o compuestos unidos a fibra y proteína que no se disuelven en los solventes utilizados habitualmente. Este grupo está constituido por taninos condensados, ácidos fenólicos y otros polifenoles de bajo peso molecular unidos a polisacáridos de la pared celular y a proteínas formando complejos estables insolubles (Sánchez, 2002).

4.2.3 Estabilidad

Los compuestos fenólicos como ácido caféico, gálico, clorogénico, y flavonoides muestran gran estabilidad a pH bajo; las catequinas por ejemplo, son muy inestables en solución alcalina (pH > 8) y altamente estables en soluciones ácidas (pH < 4).

La temperatura durante la extracción afecta la estabilidad de los compuestos, puede existir descomposición térmica (rompimiento de la estructura flavonoide), o reacción con otros componentes de las plantas impidiendo la extracción y por lo tanto su actividad antioxidante. Utilizando temperaturas de 100 °C o mayores existe una disminución en la actividad antioxidante, mientras que a 60 °C no se presenta diferencia significativa (Moure et al., 2001).

La temperatura de almacenamiento puede ser a partir de 23 °C, aunque preferiblemente a 4 °C (Chang et al., 2006).

4.2.4 Presencia en alimentos y consumo

El nivel de polifenoles en los alimentos está determinado no sólo por factores genéticos (tipo de planta, variedad, edad del vegetal) y condiciones medioambientales (estrés medioambiental, tipo de cultivo, época del año de recolección), sino también por el estado de germinación, grado de madurez, procesado y almacenamiento al que hayan sido sometidos. Así, el contenido de polifenoles puede variar entre cultivos de la misma especie, por ejemplo, la formación de flavonas y de glucósidos de flavonoles varía mucho dependiendo de la luz que reciba el vegetal; de este modo, las hojas y las

partes externas de la planta son las que tienen concentraciones más altas, mientras que las partes subterráneas presentan sólo cantidades traza.

Los compuestos fenólicos se encuentran en frutas, verduras, especias, hierbas, té, aceites, semillas, cereales, cáscara de cocoa y granos.

La presencia de polifenoles en los alimentos varía de acuerdo con su tipo, por ejemplo, en legumbres y cereales los principales son flavonoides, ácidos fenólicos y taninos; los frutos secos son ricos en taninos; las frutas tipo baya se caracterizan por su alto contenido en antocianidas; las manzanas y cítricos son ricas en ácidos fenólicos y flavonoides respectivamente.

Una vez ingeridos, los polifenoles glucósidos son absorbidos parcialmente en el intestino delgado, en mayor proporción que los aglicones. Los aglicones y compuestos fenólicos simples, flavonoides y ácidos fenólicos pueden ser absorbidos directamente a través de la mucosa intestinal. Los glucósidos son hidrolizados a sus correspondientes aglicones por glucosidasas bacterianas. Una vez absorbidos se desconocen las rutas metabólicas para su transformación y eliminación.

4.2.5 Polifenoles encontrados en la chía

En el género *Salvia* (Lu y Foo, 2002) se han identificado alrededor de 160 estructuras polifenólicas distribuidas de la siguiente manera:

- › Ácidos fenólicos: Constituyen la mayor parte de los componentes hidrosolubles. La mayoría de los ácidos fenólicos en *Salvia* son derivados del ácido caféico.

- Metabolitos de ácido caféico: El ácido caféico es la unidad fundamental de una variedad de metabolitos en plantas, desde monómeros hasta oligómeros.
 - ... Monómeros de ácido caféico: Se encuentran comúnmente en forma esterificada con azúcares y pueden ser: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido clorogénico.
 - ... Dímeros de ácido caféico: El ácido rosmarínico es el más abundante y responsable de la mayor actividad antioxidante en muestras de *Salvia*.
 - ... Trímeros de ácido caféico: Es el grupo más abundante, destacan los ácidos salvianólicos.
 - ... Tetrámeros de ácido caféico: En *S. mitiorrhiza* se encuentra el ácido litospérmico B en forma de sales de potasio, amonio y magnesio.
 - ... Oligómeros de ácido caféico.
- Glucósidos fenólicos
- › Flavonoides: se encuentran ampliamente distribuidos, dentro de ellos están los flavones, flavonoles y sus glucósidos.
 - Aglucones y glucósidos de flavonas y flavonoles como luteolina, 6-hidroxi flavones, kaempferol, quercetina, apigenina.
 - Antocianinas: Presente en flores rojas, azules y moradas.
 - Proantocianinas.

4.2.6 Funciones

El consumo de alimentos ricos en polifenoles, como las frutas y verduras, se asocia con una buena salud, disminución del riesgo de sufrir enfermedades del corazón, de cáncer y otras enfermedades crónicas; diversos estudios han revelado éstos beneficios al consumir dietas altas en frutas y verduras (Lotito y Frei, 2006). Otras propiedades favorables que han sido reportadas por Harborne y Williams, (2000) son:

- Vasodilatador
- Anticarcinogénico
- Antiinflamatorio
- Antibacterial
- Antioxidante
- Inmuno estimulador
- Antialérgico
- Antiviral
- Efectos estrogénicos
- Inhibidores de enzimas como: fosfolipasa A₂, ciclooxigenasa y lipooxigenasa, glutathione reductase, xanthine oxidase, NADH-oxidase.

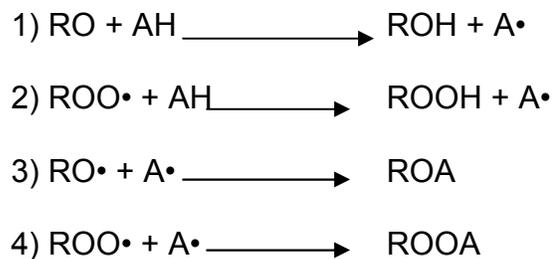
Los polifenoles protegen a la planta de invasiones microbianas, y se les ha propuesto como antifúngicos. La mayoría de los flavonoides reconocidos como agentes antifúngicos son los isoflavonoides, flavanos o flavanonas, ejemplo de estos es la luteolina.

Los compuestos polifenólicos alteran los valores funcionales y nutritivos de las proteínas en los vegetales, y las propiedades organolépticas de frutas y vegetales. Algunos polifenoles tienen efectos indeseables en sistemas alimentarios como la formación de fuertes complejos con las proteínas salivares o enzimas digestivas (Harborne y Wiliams, 2000).

4.3 Antioxidantes y compuestos polifenólicos

Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables actuando como secuestradores de radicales o reduciendo parte de los hidroperóxidos formados a compuestos hidroxilados, para evitar la destrucción de vitaminas, y el perfil sensorial de los alimentos propiciando una mayor vida útil. Un antioxidante debe ser inocuo, muy activo a concentraciones bajas (0.01-0.02%), y con cierto carácter lipofílico para acumularse en la fase lipídica. (Fennema, 1993; Belitz, 1997). La adición de antioxidantes es un método que se utiliza comúnmente para aumentar la vida de anaquel, especialmente en grasas, aceites y alimentos con una cantidad de grasa importante.

Con los antioxidantes (AH) se secuestran los radicales oxo y peroxi que se forman durante las etapas de iniciación, propagación y multiplicación en cadena:



La eficiencia de un antioxidante está relacionada con muchos factores como la energía de activación, las constantes de velocidad, el potencial de oxido-reducción, la facilidad con la que se puede destruir o perder el antioxidante y su solubilidad. La eficiencia aumenta al disminuir la fuerza de enlace.

De acuerdo con el mecanismo de actividad antioxidante, Gramza y Korczak (2005) dividen los antioxidantes en dos grupos:

- a) Antioxidantes primarios o donadores: su acción depende de la inactivación de los peróxidos parando la formación de radicales libres de ácidos grasos debido al hidrógeno antioxidante, simultáneamente el antioxidante pierde su actividad.
- b) Antioxidantes secundarios o aceptores: protegen los lípidos por la captura de oxígeno en el medio o retardan la oxidación lipídica a través de alguno o varios de los siguientes procesos:
 - a. el secuestro de iones metálicos que catalizan la reacción autooxidación-quelante (ácido ascórbico);
 - b. la creación de una barrera protectora entre el aceite y la superficie aérea (fosfolípidos);
 - c. la regeneración parcial del antioxidante primario (ácido ascórbico y tioles regenerando la vitamina E);
 - d. el secuestro del oxígeno (ácido ascórbico);
 - e. la descomposición de peróxidos y productos no radicales (productos de la reacción de Maillard)
 - f. la absorción de radiación UV;
 - g. la captura de oxígeno singulete (β -caroteno).

En la actualidad se utilizan antioxidantes sintéticos, los de mayor demanda son BHA, BHT y TBHQ (Figura 7). El hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT) son lipófilos, se utilizan en emulsiones o/w ya que son muy solubles en aceite y tienen una débil actividad antioxidante en aceites vegetales.

La terbutilhidroquinona (TBHQ) es fuertemente polar, se acumula en la interfase grasa/aire, es moderadamente soluble en aceite y ligeramente soluble en agua, es más eficiente que otros antioxidantes comunes a la hora de la estabilización frente a la oxidación en los aceites poliinsaturados crudos y refinados. (Fennema, 1993; Belitz, 1997).

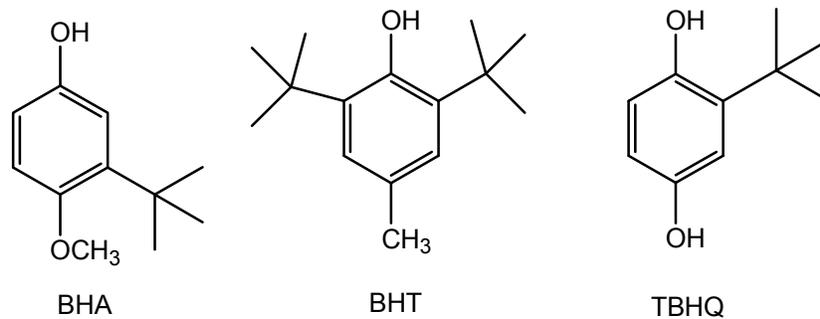


Figura 7. Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes BHA y BHT han sido restringidos en alimentos ya que, al parecer, tienen efectos toxicológicos; ésta es una de las razones por las que ha ido creciendo en los últimos años el uso de antioxidantes procedentes de plantas (Spigno et al., 2006). La importancia de esta práctica ha sido comprobada en estudios que demuestran que el consumo de alimentos y bebidas ricas en fitoquímicos polifenólicos aporta beneficios a la salud humana (Koşar et al., 2005).

Muchos estudios (Harborne y Williams, 2000; Spencer et al., 2004) muestran que los compuestos fenólicos reducen la oxidación *in vitro* de lipoproteínas de baja densidad, en particular aquellos con múltiples grupos hidroxilo que dan mayor eficiencia. También son capaces de proteger a la célula de daños por radicales libres, así como por su carácter antimicrobiano y antifúngico.

Para que un polifenol sea definido como antioxidante debe cumplir dos condiciones: primero, debe retardar o prevenir la autooxidación mediada por radicales libres, cuando esté presente en baja concentración respecto al sustrato oxidable; segundo, los productos obtenidos después del secuestro de radicales deben ser estables (Rice-Evans et al., 1996).

Los antioxidantes fenólicos (PPH) inhiben la peroxidación lipídica por una rápida donación de átomos de hidrógeno al radical peroxilo (ROO•) resultando en la formación de un alquil (aril) hidroperóxido (ROOH) como se muestra en la siguiente reacción (Sánchez, 2002):

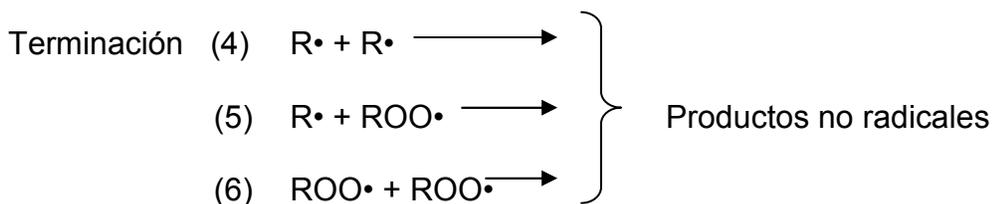
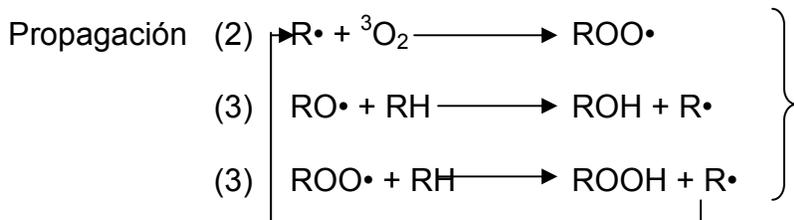
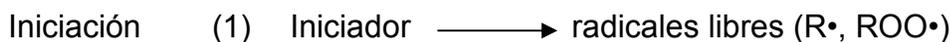


4.3.1 Oxidación lipídica (autooxidación)

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de deterioro en los alimentos generando sabores y olores desagradables conocido como enranciamiento (Belitz, 1997). Esta reacción se caracteriza por:

- a) Utilizar generalmente oxígeno molecular
- b) Marcada inhibición por especies químicas que interfieren con otras reacciones de radicales libres
- c) Estar catalizadas por la luz y por sustancias capaces de producir radicales libres
- d) Alta producción de hidroperóxido ROOH
- e) Rendimientos cuánticos superiores a la unidad cuando las reacciones de oxidación se inician por la luz
- f) Un periodo de inducción relativamente largo cuando se inician con un sustrato puro.

El mecanismo general de la autooxidación está inducido por radicales libres y se da en tres etapas: Iniciación, propagación y terminación.



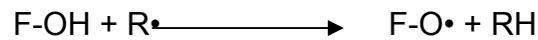
La ecuación 1 es una reacción endotérmica que demanda una gran energía de activación y es facilitada por iniciadores de la oxidación como metales de transición, oxidantes, enzimas, o iones de transición como yodo y cobre.

Cuando los radicales libres son importantes, la reacción en cadena se propaga al captar átomos de hidrógeno en las posiciones α de los dobles enlaces ($R\cdot$). En estas posiciones se produce después la adición de oxígeno, dando lugar a la producción de radicales peróxidos ($ROO\cdot$), que a su vez captan hidrógeno de los grupos α -metilénicos RH de otras moléculas para dar hidroperóxidos $ROOH$ y grupos $R\cdot$; estos a su vez reaccionan con el oxígeno repitiéndose nuevamente la secuencia de reacción descrita. Los productos secundarios son alcanos, alcoholes, aldehídos y ácidos que pudieran contribuir a procesos *in vivo* como cáncer, aterosclerosis, enfermedades alérgicas; y descomposición (oxidación) de alimentos, principalmente las grasas. Los productos de oxidación de los lípidos pueden interactuar con proteínas afectando la textura de alimentos líquidos o sólidos.

4.3.2 Actividad antioxidante

Por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de un componente o compuesto para inhibir la degradación oxidativa, por ejemplo la peroxidación lipídica. La capacidad antioxidante proporciona información acerca de la duración de la acción antioxidativa, la reactividad caracteriza el comienzo dinámico de la antioxidación a cierta concentración de un antioxidante o mezcla antioxidante.

La capacidad secuestrante se atribuye primero al número de sustituyentes hidroxilo que participan en la reacción:



La actividad antioxidante (inhibición de oxidación) de los polifenoles está dada por:

1. Propiedades redox, que pueden actuar como agentes reductores como en el caso del α -tocoferol que reduce su radical;
2. Donadores de hidrógeno y capturadores de oxígeno singulete;
3. Potentes quelantes de metales como el cobre;
4. Secuestro de radicales alcoxi y peroxi por acción de antioxidantes que rompen la reacción en cadena;
5. Su estructura;
6. Tipo y polaridad del solvente utilizado en la extracción;
7. Proceso de aislamiento;
8. Pureza de compuestos activos;
9. Sistema y sustrato utilizado en la determinación.

El factor determinante de la actividad antioxidante es la naturaleza lipofílica de las moléculas, para ello, existe un fenómeno conocido como la “Paradoja Polar” en donde los antioxidantes hidrofílicos son más efectivos que los antioxidantes lipofílicos en aceite, mientras que los antioxidantes lipofílicos presentan mejor actividad en emulsiones (Moure et al., 2001).

4.3.2.1 Ácidos fenólicos

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos y sus ésteres depende del número de grupos hidroxilo en la molécula. Los compuestos fenólicos que tienen fenoles poliméricos poseen mayor capacidad antioxidante que los fenoles simples.

La glicosilación de un grupo carboxilato del ácido caféico (ácido clorogénico) no tiene influencia en la actividad. Los difenoles como el ácido clorogénico y el ácido caféico, aparentemente tienen una gran habilidad para el secuestro de radicales, mayor que la de los monofenólicos.

Las sustancias fenólicas son los antioxidantes más efectivos de fuentes naturales. La presencia de grupos $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ en ácidos cinámicos, da una gran habilidad como donadores de hidrógeno junto con una estabilización radical respecto a los grupos carboxilos e hidroxibenzóicos, por lo que los derivados de ácidos cinámicos son antioxidantes más activos que los derivados de ácidos benzóicos.

El enlace $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{H}$ unido a anillos fenilos, toma un papel importante en la estabilización del radical por resonancia, por lo que el orden de efectividad en algunos compuestos de este tipo es ácido caféico > ácido ferúlico > ácido *p*-cumárico (Rice-Evans et al., 1996).

Los ácidos monohidroxibenzóicos no muestran gran actividad antioxidante en las posiciones *orto*- y *para*- en términos de capacidad donadora de hidrógeno al radical generado, pero los ácidos *m*-hidroxil, muestran buena actividad antioxidante.

Los derivados de ácidos dihidroxibenzóicos muestran una actividad antioxidante que depende de sus posiciones relativas de los grupos hidroxilo en el anillo. La dihidroxilación en las posiciones *orto- meta-* al grupo carboxílico tiene una actividad ligeramente mayor comparada con la disustitución en *meta- para-*, es decir, en los ácidos 3,4-dihidroxi benzóicos.

4.3.2.2 Flavonoides

Los tres criterios principales propuestos por Rice-Evans (1996) para un secuestro efectivo de radicales por parte de las estructuras flavonoide son:

1. La estructura *o*-dihidroxi en el anillo B (3,4-dihidroxi), que confiere una alta estabilidad al radical formado y una buena resonancia (deslocalización del electrón).
2. El doble enlace 2,3 en el anillo B, junto con un 4-oxo en el anillo C, es responsable de la deslocalización del electrón que permite la conjugación entre los anillos A y C; la potencia antioxidante está relacionada con la estructura en términos de la deslocalización del electrón de núcleos aromáticos. Mientras que estos compuestos reaccionan con radicales libres, los radicales fenoxil producidos son estabilizados por efecto de la resonancia en los núcleos aromáticos.
3. Los grupos 3-OH en el anillo C y 5-OH en el anillo A con un 4-oxo son requeridos para tener un máximo potencial de secuestro radical.

La actividad antioxidante de los flavonoides depende de sus grupos funcionales. La glicosilación de los flavonoides reduce su actividad comparada con su correspondiente aglucón, además de la posición y grado de hidroxilación que es fundamental. El grupo *o*-dihidroxi y el grupo *p*-dihidroxi, son antioxidantes muy potentes, mientras que la 5,7 hidroxilación en el anillo A tiene poca influencia. El doble enlace entre C₂-C₃ no es relevante cuando el anillo B en vez de tener un *o*-dihidroxi, tiene un solo sustituyente hidroxilo, ya que no es un donador efectivo. Las sustancias con un anillo heterocíclico saturado son fácilmente atacadas por el *o*-dihidroxi del anillo B y las semiquinonas formadas son totalmente estables.

Los heterociclos flavonoides contribuyen a la actividad antioxidante por a) La presencia de 3-OH libres, b) Permitiendo la conjugación entre anillos aromáticos. Un hidroxilo en el anillo A puede contribuir a la actividad, pero un hidroxilo en el anillo B es la determinación más significativa, ya que donan un hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrilo estabilizándolo y manteniendo al flavonoide estable. Las flavonas y flavanonas aumentan la actividad de acuerdo al número de grupos OH. El anillo C no es crítico en la misma.

Los flavonoles y flavanoles con un 3-OH son planares mientras que las flavonas y flavanonas son ligeramente torcidas. La configuración planar permite la conjugación, deslocalización del electrón y un aumento en el radical fenoxilo. Los aglucones son antioxidantes más potentes que su glucósido (Heim et al., 2002). Las isoflavonas son más activas que las flavonas debido a los efectos de estabilización entre el 4-carbonil y el 5-OH.

4.4 Extracción

Para realizar la separación de algún componente es necesario introducir en el sistema una nueva fase, dejando luego que los componentes de la materia de partida se distribuyan entre las distintas fases. A este proceso de contacto, redistribución y separación, se le da el nombre de “separación por contacto de equilibrio”.

Las características más comunes a todos los procesos de contacto de equilibrio son: la aproximación al equilibrio y las etapas de contacto obtenidas. Algunos ejemplos de procesos de separación por contacto en equilibrio son:

Absorción gaseosa

Extracción y lavado

Destilación

Cristalización

Separaciones mediante membrana

Para este trabajo es importante conocer acerca de la “extracción y lavado”. Este proceso necesita de un líquido para poder realizar la separación. Para ello se mezcla este líquido con los sólidos de los que se desea extraer el componente, una vez extraído se procede a la separación de ambas fases, lo cual puede hacerse por decantación, filtración o centrifugación.

Los factores que controlan la operación son: el área de contacto entre las corrientes, el tipo de contacto y las propiedades de las sustancias. En la extracción de sólidos la matriz del producto sólido puede dificultar la difusión y por tanto controlar la

velocidad de extracción. Cuando más fino es el sólido, mayor es el área interfacial; una agitación adecuada asegura que las concentraciones en cualquier punto son iguales a la concentración media total. Un aumento en la temperatura del sistema hace que en general aumente la velocidad de disolución ya que aumenta la difusión y la solubilidad del soluto.

El lavado es una operación casi idéntica a la extracción, la diferencia radica en que el extracto se convierte en el producto buscado, mientras que el disolvente es el agua.

En los procesos de extracción el primer paso consiste generalmente en una trituración mecánica durante la cual la materia prima se tritura, se sedimenta o se prensa hasta trozos de tamaño conveniente para proporcionar un área de contacto grande para la extracción (Earle, 1998).

4.4.1 Extracción de compuestos polifenólicos

La extracción por solventes es la forma más utilizada para aislar antioxidantes, el rendimiento de la extracción y la actividad antioxidante de extractos dependen del tipo de solvente utilizado. Es importante mencionar que durante este proceso sólo se obtienen polifenoles solubles. Los solventes no polares se utilizan para remover polifenoles del agua. El acetato de etilo y el éter etílico se usan para la extracción de fenoles de bajo peso molecular y los polifenoles extraídos con acetato de etilo de materiales naturales se ha reportado (Spigno y De Faveri, 2006) que tiene una fuerte

actividad antioxidante. El etanol y el agua son los solventes más usados por razones higiénicas y abundancia respectivamente.

El pH también afecta, ya que a pH alcalino las proteínas y los ácidos grasos se disuelven, por lo que la actividad antioxidante es mayor no por el efecto de los polifenoles sino por el de proteínas y ácidos grasos (Moure et al., 2001).

Los glucósidos de los flavonoides pueden ser fácilmente hidrolizados y convertirse en sus aglucones por medio de calentamiento y condiciones ácidas o por enzimas, aunque este último es un método más caro.

4.5 Cuantificación de compuestos polifenólicos

4.5.1 Identificación espectrofotométrica

El método más común para hacer una cuantificación total es la determinación por Folin-Ciocalteu. Este sistema es la mezcla de tungstanato y molibdato en un medio altamente alcalino (utilizando Na_2CO_3 en agua). Los compuestos fenólicos son enérgicamente oxidados en el medio alcalino resultando en la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, que reacciona con molibdato formando óxido de molibdeno (MoO^{4+}) cuya máxima absorbancia se da en 750 nm. Estos resultados se expresan comúnmente en equivalentes de ácido gálico.

Este ensayo no es selectivo, pero parece ser uno de los mejores en la estimación burda de concentración en muestras que no tienen cantidades significativas de proteína (Roginsky et al., 2005).

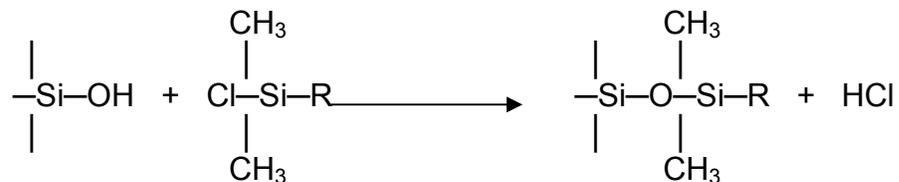
4.5.2 Cromatografía HPLC

Un sistema de HPLC muestra criterios como:

1. Alto poder de resolución
2. Separación rápida
3. Monitoreo continuo del efluente de la columna
4. Mediciones cuantitativas exactas y precisas
5. Repetitividad y reproducibilidad en los análisis usando la misma columna
6. Automatización de los procesos analíticos y manejo de datos.

La cromatografía líquido-sólido comúnmente conocida como cromatografía de adsorción, está basada en interacciones entre el soluto y los sitios activos sólidos presentes en una fase estacionaria; estos sólidos activos se caracterizan por tener una gran área superficial como la alúmina, o la sílica gel, esta última más utilizada.

La sílica gel es ligeramente ácida y retiene compuestos básicos. Las reacciones de sililación han sido ampliamente utilizadas al empacar columnas. Los grupos silanol a la superficie de la sílica gel son reactivos con clorosilanos sustituidos:



En HPLC el enlace más importante es el tipo no polar C-18 en el que el grupo R es un hidrocarburo de 18 carbonos. Los enlaces formados son atacados sólo en condiciones muy ácidas (pH < 2) o alcalinas (pH > 9). Las columnas tienen un tamaño

de partícula que va de 3-10 μm , su longitud es de 5-25 cm de largo por 4-6 mm de diámetro interno.

La fase móvil se refiere al solvente; éste es determinado por su polaridad, la polaridad de la fase estacionaria y la naturaleza de los componentes de la muestra. Casi todos los solventes son usados como fase móvil, pero se deben tratar con cuidado debido a que las columnas se descomponen fácilmente con las impurezas de algunos iones metálicos. Necesitan de una bomba para pasar a través de la columna por medio de presión y deben ser degasificados cada vez que se utiliza el equipo. Cuando el sistema necesita de una mezcla de solventes en proporción fija, se dice que es isocrático; por el contrario, si el sistema necesita de un gradiente hecho por dos o más solventes en el que uno de ellos va del 100% al 0%, se dice que es un sistema de fase reversa. La velocidad de flujo de la fase móvil va entre 1 y 2 mL/min (Vogels et al., 2000).

En este proceso se deben distinguir el tiempo de retención y el área bajo la curva para poder determinar las concentraciones de las muestras problema.

4.5.2.1 Identificación y cuantificación por cromatografía HPLC

Se sabe que la mayoría de las flavonas y flavonoles tienen dos longitudes de onda en donde presentan mayor absorción. La banda I es entre 320 – 385 nm representando la absorción del anillo B, y la banda II entre 250 – 285 nm que representa la absorción del anillo A. Mientras que los flavanones tienen su banda II

como máximo entre 270 – 295 nm (Rice-Evans, 1996). Por esto los compuestos polifenólicos son detectados por espectro UV generalmente a 280 nm.

Las columnas empacadas más comunes para el análisis de compuestos fenólicos son la fase reversa de silica utilizando generalmente un C₁₈ (octadecil silica, ODS) o una C₈-ODS como fase estacionaria. Estas columnas eluyen compuestos polares más rápido que compuestos no polares (Waterman y Mole, 1994).

4.6 Determinación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante puede ser evaluada con diferentes ensayos por diversos mecanismos. Los métodos más usados para la medición de niveles de daño en humanos son:

- 1) por daño total de DNA oxidado,
- 2) por niveles de enzimas antioxidantes, niveles de antioxidantes de bajo peso molecular (catalasa, superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa, ácido úrico, glutathion, flavonoides, catequinas, antocianinas) y vitaminas (E, C y β-caroteno),
- 3) por daño de oxidación en lípidos (isoprostanos, TBARS (Ácido tiobarbitúrico)),
- 4) por daño en proteínas (número de carbonilos en proteínas y residuos de tirosina modificada)

Muchos métodos están basados en la capacidad de secuestrar diversos radicales libres, pero también la absorción UV y capacidad de quelar son responsables de la actividad antioxidante en sistemas no acuosos. Los ensayos de actividad secuestradora se pueden realizar con diferentes especies como radical superóxido (O_2^{\bullet}), hidroxilo ($\bullet OH$), óxido nítrico ($\bullet NO$), radicales alquilperoxilo, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$), 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) (Moure et al., 2001).

Para medir la actividad antioxidante existen métodos directos que se basan en cinéticas de peroxidación lipídica, como el blanqueamiento de β -caroteno; y métodos indirectos, como el ensayo de $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$ (Djeridane et al., 2006; Roginsky et al., 2005). Los ensayos indirectos se comparan con una sustancia llamada Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), que es un análogo hidrosoluble del α -tocoferol cuya estructura se muestra en la Figura 8.

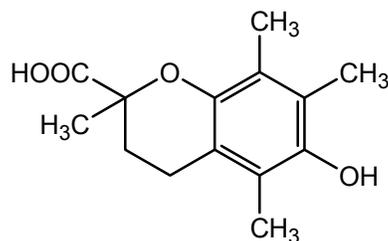


Figura 8. ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-carboxílico

4.6.1 Ensayo de $DPPH^{\bullet}$ (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

Este ensayo se basa en la capacidad del radical $DPPH^{\bullet}$ de reaccionar con donadores de hidrógeno como los polifenoles.

de absorción en 414, 645, 734 y 815 nm, que aplica en antioxidantes hidrofílicos, flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y antioxidantes del plasma. Cabe destacar que los ácidos fenólicos tienen un menor valor que los flavonoides, y los hidroxicinamatos son generalmente más activos que los hidroxibenzoatos.

Inicialmente, esta técnica se realizaba con mioglobina, en donde los antioxidantes eran adicionados antes de que se formara el radical, pero se dejó de utilizar ya que el antioxidante (como la quercetina) interactuaba en algunas ocasiones con los reactivos y la actividad era sobreestimada. Razón suficiente para que se generara primero el radical seguido de la adición del antioxidante.

El monocátion del cromóforo azul/verde es generado por oxidación de ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato)] con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y es reducido por la presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno (grupos OH).

Al ser generado el radical, reacciona estequiométricamente 1:0.5 el ABTS con el $K_2S_2O_8$ (Re et al., 1999). La reacción que se lleva a cabo se muestra en la Figura 10.

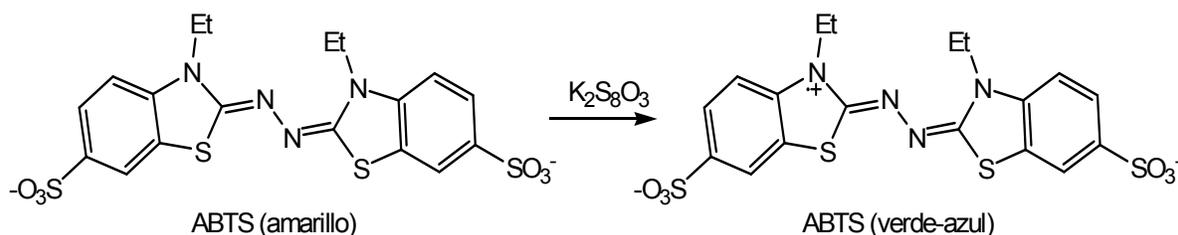


Figura 10. Reacción con $ABTS^{\bullet+}$

Reacción con el antioxidante:



La gran ventaja de utilizar este método es su relativa facilidad, ya que es muy eficiente para determinaciones rutinarias, además de que sirve para compuestos lipofílicos e hidrofílicos. La desventaja es que con muchos polifenoles y muestras de productos naturales la reacción se da en forma lenta. La pobre selectividad de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ con átomos donadores de hidrógeno es otra limitante, además de que reacciona con cualquier compuesto aromático independientemente de su potencial antioxidante real (Roginsky et al., 2005).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En un estudio reciente realizado por Reyes Caudillo (2006) se encontró la existencia de polifenoles que retardan la oxidación lipídica en matrices alimentarias tipo aderezo. Sin embargo, no se han realizado estudios acerca de su estabilidad en función de la extracción, así como de la temperatura de almacenamiento. Para contestar esta pregunta, se propuso la siguiente metodología.

Se partió de cuatro muestras de semilla de chía y una de harina de chía, todas desengrasadas con hexano. El ensayo se dividió en tres etapas.

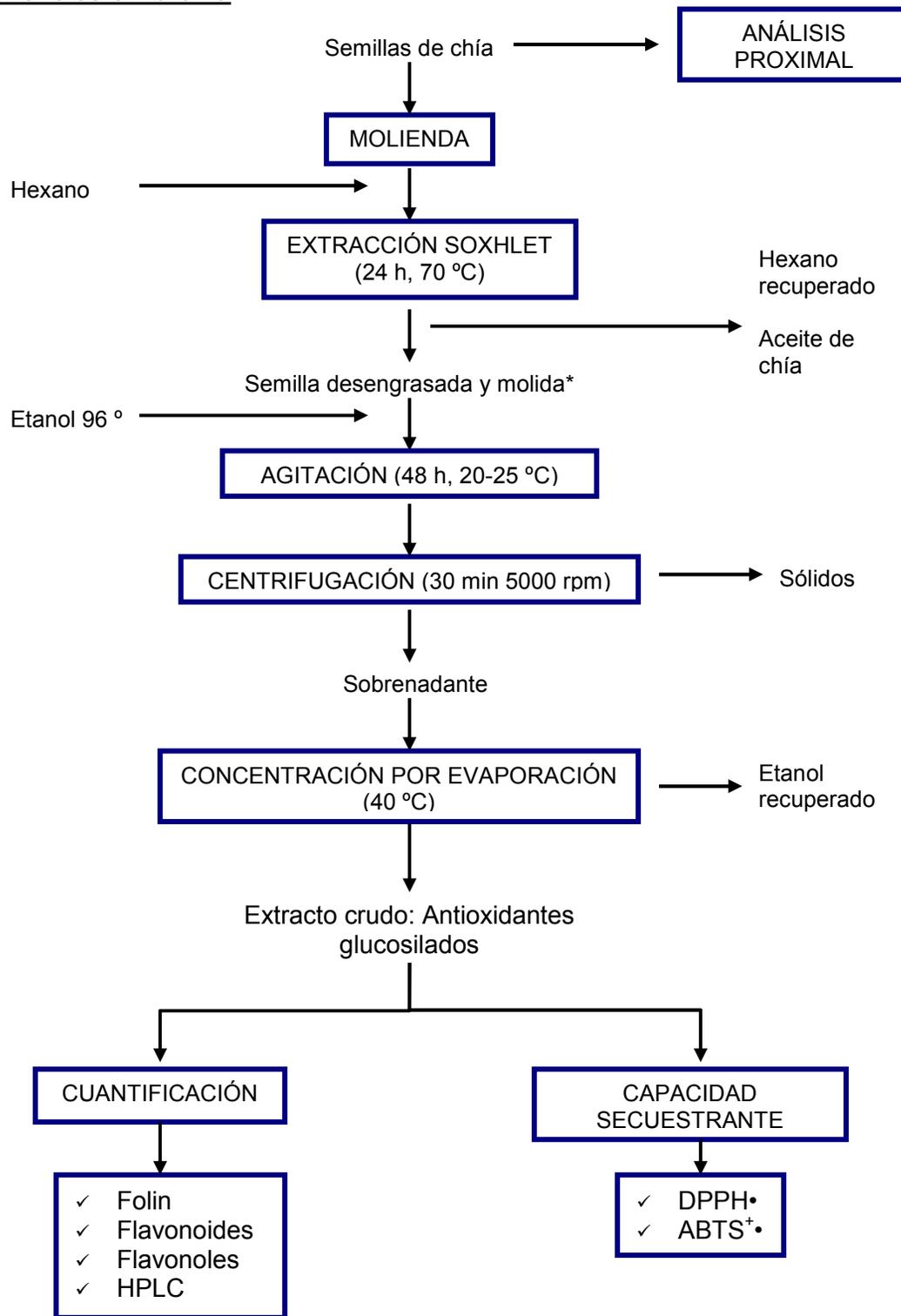
La primera etapa consistió en una extracción de los polifenoles a temperatura ambiente a la que se le llamó extracto crudo (EC); los extractos obtenidos en cada una de las muestras fueron cuantificados y evaluada su capacidad secuestrante (CS).

La segunda etapa consistió en una extracción ácida y térmica para tener un extracto hidrolizado (EH), al que se le determinó su concentración y su CS.

En la tercera etapa se seleccionó una muestra de semilla de chía, de la que se obtuvo un extracto crudo y uno hidrolizado, los cuales fueron sometidos a tres diferentes temperaturas de almacenamiento, para determinar las mejores condiciones de conservación.

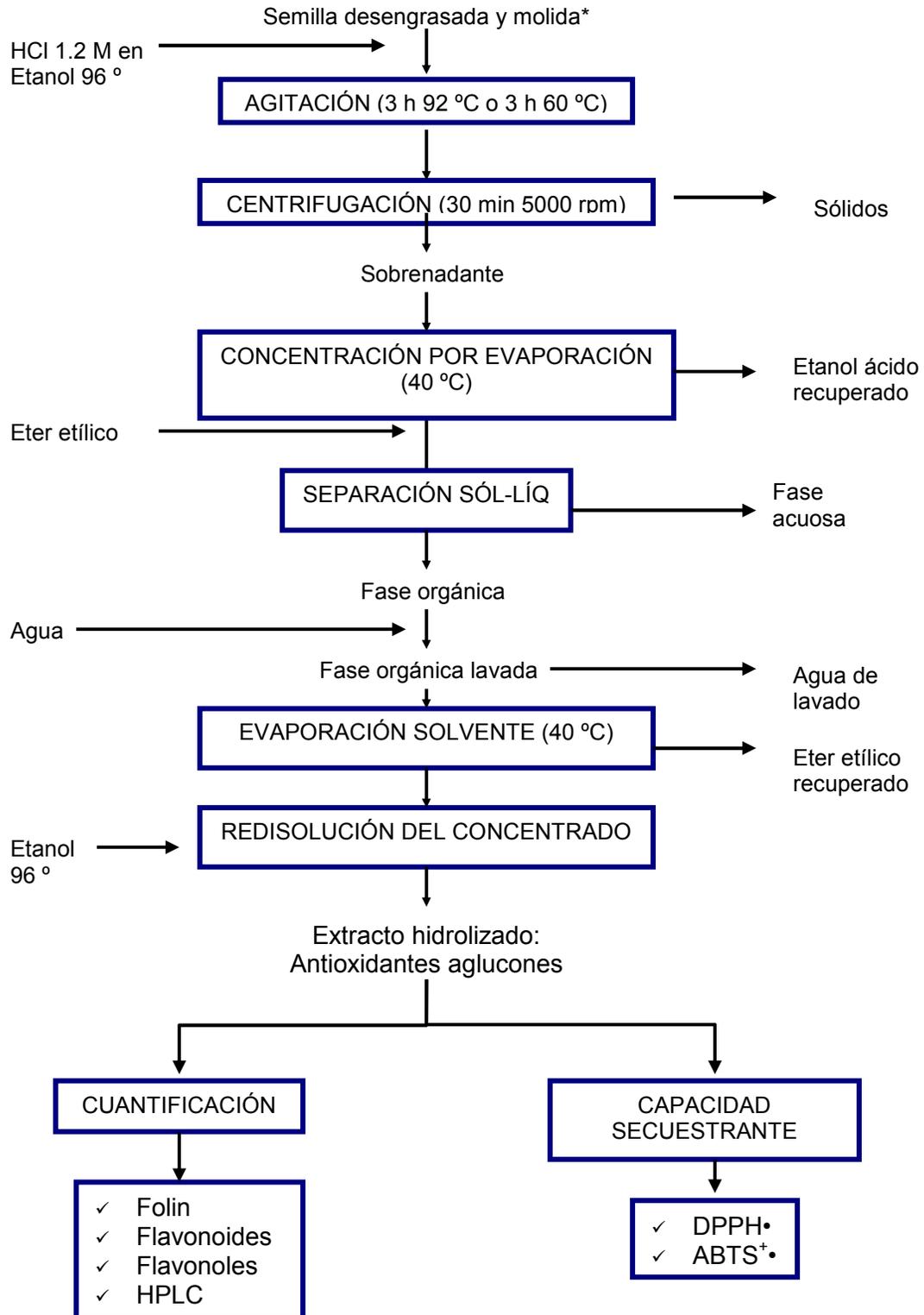
A continuación se muestra un esquema que describe las tres etapas realizadas.

Primera etapa: Efecto del uso de diferentes muestras en el rendimiento de la extracción de polifenoles en la chía



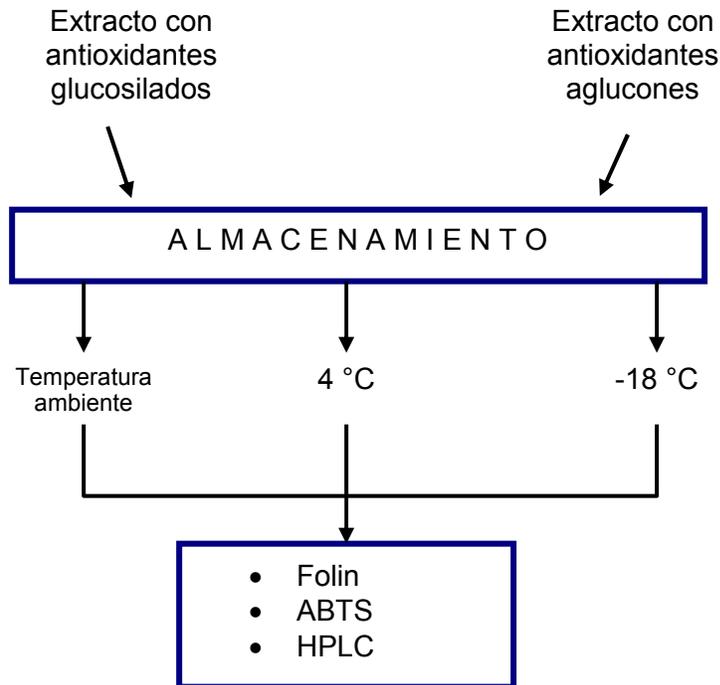
- También se utilizó harina de semilla de chía desengrasada.

Segunda etapa: Efecto de la temperatura de hidrólisis sobre el rendimiento de los polifenoles presentes en la chía



- También se utilizó harina de semilla de chía desengrasada

Tercera etapa: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad de los polifenoles obtenidos de la chía



Primera etapa: Efecto del uso de diferentes muestras de chía en el rendimiento y actividad durante la extracción de polifenoles

Pretratamiento (molienda y desengrasado)

Se trabajó con lotes de 1 kg de semillas obtenidas en diferentes mercados locales de las colonias Portales, Nopalera e Iztapalapa, así como de la Central de Abasto (Central) y una harina de chía de Sinaloa. Se molieron las semillas (1kg) en un molino marca IKA, a una velocidad de 6000 rpm para reducir el tamaño de partícula. Posteriormente se desengrasaron en un equipo Soxhlet, con 6 L de hexano durante 24 horas. Por un lado se recuperó el hexano por evaporación, y por otro, la semilla

desengrasada libre de hexano se almacenó en un frasco de plástico a temperatura ambiente (20-25 °C) en la oscuridad, para descartar variables externas.

5.1 Análisis proximal

A cada una de las muestras se les realizó un análisis proximal (anexo 9.1) como se indica a continuación:

Humedad: Secado en estufa (MAPSA HCT-27), a 100°C durante 8 horas (Kirk et. al., 1996).

Cenizas: Determinación por calcinación y mufla a 550°C (Kirk et. al., 1996).

Proteína total: Método micro-Kjeldahl utilizando 6.25 como factor de conversión de %N a %Proteína.

Extracto etéreo: Método Soxhlet con hexano como solvente, durante 8 horas (James, 1999).

Carbohidratos totales: Diferencia con el resto de los componentes.

5.2 Extracción cruda

La extracción cruda remueve sustancias solubles (antioxidantes, carbohidratos, proteínas). Los antioxidantes obtenidos en este tipo de extracción están principalmente en forma glucosilada y algunos en forma libre, ya que el tratamiento no es agresivo y así se encuentran de forma natural.

En un matraz se agregaron 50 g de chía desengrasada a 500 mL de etanol 96° en agitación a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 48 horas.

La mezcla resultante se centrifugó (Centrífuga Damon/IEC Division HT) durante 30 minutos a 5000 rpm y se desechó el sólido. El sobrenadante (etanol con

antioxidantes) se recuperó, filtró y colocó en un matraz para evaporar el disolvente hasta sequedad.

El residuo seco se redisolvió en la cantidad necesaria de etanol para transvasarlo a un vial que fue almacenado en refrigeración (4°C) (Taga et al., 1984).

5.3 Cuantificación

5.3.1 Polifenoles totales (Folin-Ciocalteu)

La determinación de Folin-Ciocalteu para polifenoles totales se fundamenta en una mezcla de tungstanato o molibdato en un medio altamente alcalino para que se oxiden los compuestos fenólicos dando la formación de O_2^- que reacciona con el molibdato generando óxido de molibdeno MoO^{4+} que presenta una absorbancia a 750 nm (Roginsky, 2005).

Se tomaron 2 mL de extracto (crudo o hidrolizado) y se llevaron a un volumen de 5 mL con HCl 0.3% agitando vigorosamente hasta eliminar la turbidez. Cuando no se eliminó la turbidez, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante cristalino y se trabajó con él (mezcla 1).

En un tubo de ensayo se colocaron 100 μ L de la mezcla 1 y se le adicionaron 2 mL de Na_2CO_3 2% dejándolo en reposo 2 minutos (mezcla 2). Al cabo de este tiempo, a la mezcla 2 se le agregaron 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, diluido previamente en agua 1:1.

La mezcla final se dejó en reposo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se midió su absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU[®]-65.

Para obtener la concentración de polifenoles se realizó una curva patrón con ácido gálico monohidratado (Mallinckrodt Chemicals) como estándar, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados se expresaron como mg EAG (Equivalentes de Ácido Gálico)/g de chía desengrasada (Matthäus, 2002) (Resultados de la curva en Anexo 9.2).

5.3.2 Flavonoides

El contenido total de flavonoides se determinó por un método colorimétrico debido a la formación de un complejo flavonoide-aluminio. Para ello, se tomó 1 mL de extracto (crudo o hidrolizado) y se adicionó 1 mL de AlCl₃ 2% en metanol. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 408 nm utilizando una curva de calibración con una solución del glucósido rutina grado HPLC 95% (SIGMA) a una concentración de 0.3 mg/mL en etanol (Resultados en Anexo 9.2). El contenido de flavonoides se expresó en mg ER (equivalentes de rutina)/g de chía desengrasada (Quettier-Deleu, et al., 2000).

5.3.3 Flavonoles

En un tubo de ensaye se colocaron 2 mL de extracto (crudo o hidrolizado) con 2 mL de AlCl_3 2% en metanol. Una vez mezclados se le adicionaron 6 mL de CH_3COONa 5% en etanol y se volvió a mezclar. El tiempo de reposo fue de 1 hora entre 20-25 °C para determinar la absorbancia a 435.5 nm. Cuando la mezcla presentó turbidez se repitió.

Asimismo, se realizó una curva patrón con 0.0166, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg/mL de rutina en etanol, se tomaron 2 mL de cada concentración y se procedió de la misma manera que en las muestras polifenólicas, para poder expresar los resultados como mg ER/ g de chía desengrasada (Miliauskas, et al., 2004) (Resultados de la curva en Anexo 9.2).

5.3.4 HPLC

En esta metodología se utilizó el trabajo de Tsao y Yang (2003). El equipo de bombas usado fue un sistema Beckman System Gold® 126 con un detector UV Beckman System Gold® 166. El detector UV se colocó en 280 nm. La fase móvil binaria consistió en ácido fórmico 0.2% en agua (bomba A) y acetonitrilo grado HPLC (bomba B). Al ácido fórmico 0.2% se le ajustó el pH a 2.55 cuando fue necesario y se filtró a través de una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm . Tanto el acetonitrilo como el ácido fórmico fueron colocados en un equipo de ultrasonido durante 30 minutos, con el fin de eliminar burbujas de aire. La columna utilizada fue una Kromasil® 100 \AA C_{18} 15 μm , 250 x 4.6 mm (Higgins Analytical INC); la velocidad de flujo fue de

1.0 mL/min a lo largo del ensayo. El volumen de inyección fue de 20 μ L y la mezcla de solventes se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente utilizado en la determinación por HPLC

Tiempo (min)	% Ácido fórmico 0.2% (Bomba A)	% Acetonitrilo (Bomba B)
0	100	0
1	100	0
46	85	15
76	70	30
81	50	50
86	0	100
96	100	0

Todos los estándares utilizados fueron grado HPLC (SIGMA[®]), mismos que se disolvieron en etanol 96° en concentraciones especificadas en la Tabla 2. Las muestras resultantes (extractos) se filtraron con una membrana de nylon de poro de 0.45 μ m antes de ser inyectadas en el equipo. La identificación de los compuestos se hizo comparando los tiempos de retención de las muestras con los estándares.

Tabla 2. Concentraciones de los estándares

Estándar	Conc. (mg/mL)	Estándar	Conc. (mg/mL)	Estándar	Conc. (mg/mL)
Catecol	1.55	Kaempferol	0.60	7-hidroxycumarina	0.25
Epicatequina	1.25	Ácido ferúlico	0.50	Rutina	0.25
Quercetina	1.00	Ácido caféico	0.35	Catequina	0.08
Gallocatequina	0.80	Ácido cumárico	0.30		
Epigallocatequina	0.66	Ácido hidroxicinámico	0.30		

5.4 Determinación de la capacidad secuestrante

5.4.1 Radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

Esta cuantificación se basa en la capacidad de estabilizar el radical libre DPPH• al reaccionar con donadores de hidrógeno; muestra una intensa absorción en la región

visible y puede ser determinado espectrofotométricamente. El ensayo dinámico se refiere al decaimiento observado después de la adición del antioxidante a evaluar, caracterizando su reactividad (Roginsky, 2005).

Se tomaron 2 mL de solución metanólica de DPPH• 3.6×10^{-5} M y se agregaron 50 μ L de antioxidantes estandarizados a 200 ppm medidos por Folin-Ciocalteu. Se monitoreó el decremento en la absorbancia a 515 nm, por 15 minutos a temperatura ambiente, registrando la lectura al minuto 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15. El efecto secuestrante se graficó en función del tiempo y se comparó con un estándar de Trolox® 200ppm (Siddhuraju, et al., 2002). Para obtener la capacidad secuestrante se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%CS = \frac{A_{t=0} - A_{t=final}}{A_{t=final}} \times 100\%$$

Donde:

% CS: Porcentaje de capacidad secuestrante

$A_{t=0}$: Absorbancia a 515 nm en el minuto cero

$A_{t=final}$: Absorbancia a 515 nm en el minuto 15

5.4.2 Radical catiónico ABTS⁺ [ácido 2,2'azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]

Este ensayo se aplica para fenoles naturales, se monitorea el decaimiento del radical catiónico ABTS⁺ producido por la oxidación del ABTS causado por la adición de una muestra que tiene compuestos fenólicos. Este radical tiene una fuerte absorción en el intervalo de 600 - 750 nm; los resultados se compararon contra un estándar de Trolox® que es un derivado del α -tocoferol. (Roginsky, 2005).

Se generó el radical mezclando ABTS 7 mM en agua con 2.45 mM de $K_2S_2O_8$ dejando la mezcla en la oscuridad por 12 horas a temperatura ambiente. Antes de usar la solución de ABTS se le diluyó con etanol, de tal manera que diera una absorbancia de 0.700 ± 0.020 a 734 nm. El espectrofotómetro fue calibrado con etanol. Se adicionaron 1.5 mL de solución de $ABTS^{\bullet}$ a 15 μ L de antioxidantes (extractos) estandarizados a 200 ppm medido por Folin-Ciocalteu y se monitoreó la cinética registrando la lectura al minuto 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15. Los resultados se graficaron en función del tiempo y compararon con lo obtenido con Trolox® 200 ppm (Re et al., 1999). El cálculo para obtener la capacidad secuestrante se hizo como en la determinación con DPPH•.

Segunda etapa: Efecto de la temperatura de hidrólisis en el rendimiento de los polifenoles presentes en la chía

5.5 Extracción ácida

Este tipo de extracción tuvo por objetivo obtener los polifenoles en forma de aglucón, para ello fue necesario tener un medio ácido además de altas temperaturas.

En un equipo de reflujo se mezclaron 50 g de chía desengrasada con 500 mL de HCl 1.2 M en etanol (grado analítico) en un baño a temperatura de 60 °C en una muestra, y a 92 °C en otra, con agitación constante durante 3 horas. Se atemperó a 20-25 °C y se centrifugó durante 30 minutos a 5000 rpm, se recuperó el sobrenadante, y se concentró por evaporación hasta obtener una mezcla color café oscuro.

Ésta mezcla, rica en polifenoles, fue sometida a un proceso de purificación. Se le realizaron extracciones continuas sólido-líquido con 20 mL de éter etílico (reactivo analítico), hasta que el solvente presentó poco o nulo color. Al éter colorido se le hicieron varios lavados con 100 mL de agua hasta que el pH de ésta resultó neutro. El éter lavado se colocó en un matraz haciéndolo pasar por medio de un filtro con Na₂SO₄ anhidro, y se evaporó el disolvente a 40°C. Los polifenoles purificados se redisolieron en la mínima cantidad de etanol y se almacenaron en un vial a 4°C (Czerwinski et al., 2004).

El resto de las determinaciones (Cuantificación: Folin, flavonoides, flavonoles, HPLC; y Actividad: DPPH•, ABTS•⁺) se realizaron de la misma manera que en la primera etapa.

Tercera etapa: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad de los polifenoles obtenidos a partir de la semilla de chía

Para la tercera etapa se trabajó con la muestra de chía Central. Se obtuvo por separado un extracto crudo y uno hidrolizado a 60 °C. Ambos extractos fueron almacenados en temperaturas de -18 °C, 4 °C y 20-25 °C. Se realizaron las determinaciones de Folin-Ciocalteau, ABTS•⁺ y HPLC, a cada extracto para cada temperatura durante un tiempo de 100 días.

5.6 Análisis estadístico

En todas las determinaciones se obtuvo un promedio y desviación estándar, además se hizo un análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA produjo diferencia significativa con $\alpha=0.05$, se hizo una prueba de diferencia significativa mínima de Fisher (DMS por sus siglas en inglés), de acuerdo con lo escrito por Márquez (1991).

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Primera etapa: Efecto del uso de diferentes muestras de chíá en el rendimiento y actividad durante la extracción de polifenoles

6.1 Análisis de las muestras

Las muestras de chíá utilizadas se obtuvieron de diferentes fuentes. Tres de ellas en mercados locales del Distrito Federal correspondientes a las colonias Portales, Nopalera e Iztapalapa; una muestra en un local de la Central de Abasto y una (harina) del Estado de Sinaloa.

6.1.1 Análisis composicional

Al realizar el análisis proximal (Tabla 3) se encontró que el contenido de grasa no mostró diferencia significativa entre los cinco lotes. En el caso de las cenizas, no hubo diferencia significativa entre Sinaloa y Portales; Central, Nopalera e Iztapalapa fueron estadísticamente diferentes entre sí y entre Sinaloa y Portales. En el contenido de proteína todas fueron estadísticamente diferentes.

En los carbohidratos no se realizó análisis estadístico ya que su cálculo fue determinado por diferencia del resto de los componentes y no se contó con una desviación o coeficiente de variación.

Al comparar estos resultados con los reportados por Bushway et al., (1981), sólo en el caso de la concentración de grasa (base seca), los valores son estadísticamente iguales, para el resto de los componentes los resultados mostraron diferencia

significativa. Esto reafirma lo dicho por Moure et al. (2001) en el sentido de que los factores climáticos, de riqueza mineral del suelo y las condiciones de almacenamiento influyen significativamente en la composición físico-química de las plantas.

Tabla 3. Composición de cinco muestras de chía y otras fuentes (g/100 g base seca)

	Cenizas	Proteína total (N x 6.25)	Grasa	Carbohidratos (diferencia)
Sinaloa	4.48 ± 0.05 ^a	17.45 ± 0.13 ^e	34.35 ± 6.20 ^j	36.72
Central	4.41 ± 0.03 ^b	19.81 ± 0.17 ^f	33.49 ± 1.30 ^j	43.10
Portales	4.46 ± 0.02 ^a	33.77 ± 0.51 ^g	34.17 ± 0.69 ^j	27.60
Nopalera	4.03 ± 0.01 ^c	21.49 ± 0.66 ^h	36.15 ± 0.23 ^j	38.32
Iztapalapa	5.07 ± 0.02 ^d	30.32 ± 0.22 ⁱ	35.62 ± 0.16 ^j	29.00
Cebada ¹	2.88 ± 0.04	19.40 ± 0.40	2.31 ± 0.10	53.60 ± 1.00 (almidón)
Sorgo ¹	1.87 ± 0.03	12.1 ± 0.1	3.32 ± 0.1	67.7 ± 1.2 (almidón)
Cacahuete ²	2.4	27.5	48	1.2 (celulosa)
Soya ²	5.3	36.9	17.2	4.5 (celulosa)

Nota: Letras iguales NO presentan diferencia estadística con $\alpha = 0.05$ (ver anexo 9.5 ANOVA 1, 2, 3, 4)

¹ Ragaee et. al. 2006

² Mateo 1961

La grasa y los hidratos de carbono fueron los componentes mayoritarios, ya que conformaron entre el 30-40% del total en base seca, esto da a la chía características de oleaginosa ya que tiene más del 30% en grasa, estos valores son menores a los de la grasa del cacahuete (48%) que es oleaginosa, sin embargo el valor de la chía es alto.

En cuanto a la cantidad de carbohidratos, en la chía va más allá del 30%, aunque es ligeramente menor al de la cebada y el sorgo.

Como fuente de proteína también es importante, ya que sus valores son comparables con los de la cebada, y ligeramente menor al de la soya; este último alimento es muy utilizado como sustituto de carne debido a su alto contenido de proteína. En cuanto a la cantidad de sales minerales, su valor es comparable con el de la soya. Por todo esto, la chía debería ser un alimento tan consumido como la soya, la cebada o el cacahuate, es un alimento rico en macro componentes y presenta un buen equilibrio entre ellos.

Una vez concluido el análisis proximal, se realizó el pretratamiento para extraer los polifenoles en forma de glucósidos (extracto crudo).

6.2 Extracción cruda de los compuestos polifenólicos

La extracción cruda removi6 sustancias solubles en alcohol etílico como estructuras polifen6licas o carbohidratos, adem6s de algunas prote6nas como las prolaminas que son solubles en alcohol y existen en la chía (Olivos, Lugo 2005). En la mayoría de los estudios en los que se obtienen polifenoles se utiliza metanol, etanol o mezclas de solventes como acetona y agua (Turkmen et al., 2006; Lapornik et al., 2005). En este trabajo se decidi6 el uso de etanol como solvente de extracci6n, ya que es menos t6xico, es higi6nico, y es f6cil de obtener.

Los antioxidantes obtenidos en este tipo de extracci6n no se presentan en su forma agluc6n, sino en su forma glucosilada, ya que el tratamiento (disolvente y temperatura) no es agresivo y por lo tanto respeta su composici6n original.

De los cinco lotes de chía estudiados se obtuvieron diferentes rendimientos de extracción (g de residuo/100 g de semilla de chía desengrasada) de compuestos glucosilados: Central **5.89** ± 0.12 > Sinaloa **3.95** ± 0.27 > Portales **3.51** ± 0.24 > Nopalera **3.14** ± 0.03 > Iztapalapa **2.84** ± 0.21. Estos rendimientos fueron estadísticamente diferentes (ver Anexo 9.5 ANOVA 5), además de ser bajos, comparados con otras fuentes, como el extracto de semillas de girasol (oleaginosa) cuyo rendimiento es 10.2%, éste valor no sólo es diferente por la fuente, sino porque el sistema de solventes utilizado fue una mezcla de metanol al 70% en agua (Matthäus, 2002).

6.3 Cuantificación

6.3.1 Polifenoles totales (Folin-Ciocalteu)

Al realizar la cuantificación por medio de Folin, los extractos que mostraron un mayor contenido total de polifenoles glucosilados fueron: Sinaloa con 0.74 ± 0.01 igual a Central (0.71 ± 0.03), seguido de Portales (0.27 ± 0.01) y finalmente, estadísticamente iguales, Nopalera e Iztapalapa (0.15 ± 0.00 y 0.13 ± 0.00 mg EAG/g de semilla de chía desengrasada).

6.3.2 Cuantificación de flavonoides

Los compuestos polifenólicos se conforman por varios grupos, uno de los principales pertenece a los flavonoides, por lo que fue importante conocer su concentración en el extracto. La cantidad de flavonoides obtenidos en las muestras se puede ver en la Tabla 4.

El extracto de Portales tuvo una mayor proporción de flavonoides dentro de los polifenoles totales, comparado con el resto de las muestras utilizadas. Se esperaba que el contenido mayoritario de flavonoides se hubiera presentado en los extractos de Sinaloa o Central, ya que en estos se obtuvo un mayor rendimiento en la extracción, sin embargo, en la práctica no sucedió.

Al ser comparados los resultados descritos con los de otras especies de *Salvias* (extracto metanólico) (Tabla 4), éstas presentaron un mayor rendimiento respecto a *Salvia hispánica*. Aunque se trata del mismo género, esto no es indicativo de que deban poseer iguales características, ya que se ha visto que realizando la misma metodología de extracción en una misma especie de *Salvia*, el resultado varía.

Tabla 4. Contenido de polifenoles en los extractos crudos (glucosilados) (mg/g chía desengrasada)

Lote de chía	Polifenoles totales (EAG)	Flavonoides (ER)	Flavonoles (ER)
Sinaloa	0.74 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.00 ^e	0.02 ± 0.00 ^j
Central	0.71 ± 0.03 ^a	0.02 ± 0.00 ^f	0.02 ± 0.00 ^k
Portales	0.27 ± 0.01 ^c	0.03 ± 0.00 ^g	0.01 ± 0.00 ^l
Nopalera	0.15 ± 0.00 ^d	0.01 ± 0.00 ^h	0.00 ± 0.00 ^m
Iztapalapa	0.13 ± 0.00 ^d	0.01 ± 0.00 ⁱ	0.00 ± 0.00 ^m
<i>S. officinalis</i> *	0.90 ± 0.04	0.14 ± 0.06	0.02 ± 0.00
<i>S. glutinosa</i> *	0.68 ± 0.04	0.23 ± 0.01	0.04 ± 0.00

*Milliauskas et al. 2004

Nota: Letras iguales corresponde a muestras estadísticamente iguales con $\alpha = 0.05$ (ver anexo 9.5 punto ANOVA 6, 7, 8)

6.3.3 Cuantificación de flavonoles

La cantidad de flavonoles (Tabla 4) en el extracto Portales fue mayor que los de Sinaloa y Central, y estos mayores a Nopalera e Iztapalapa (estadísticamente iguales). En el caso de Sinaloa, el 91.41% de los flavonoides corresponden a flavonoles, mientras que en el resto, menos del 50% del total de flavonoides son flavonoles.

Los flavonoles junto con las flavonas son los grupos más importantes dentro de los flavonoides y se encuentran comúnmente en forma de glucósidos. Dentro de los flavonoles existen la quercetina y el kaempferol, dos compuestos importantes que se encuentran en especies de *Salvia* (Lu y Foo, 2002), y que por sus características estructurales pueden tener un aporte importante en el secuestro de especies radicales (Rice- Evans et al., 1996).

6.3.4 HPLC

Este ensayo necesitó de una valoración previa para encontrar las condiciones de tiempo y mezcla de fase móvil en las que se obtuvieran mejores resultados. Estos se presentan más adelante. Una vez determinada la mezcla de fase móvil y el tiempo de duración de cada inyección, se procedió a la evaluación de los extractos crudos de las semillas de Sinaloa y Central (Figura 11).

Primero se inyectó el extracto crudo Central (Figura 11a) y los picos obtenidos no pudieron ser identificados ya que los tiempos de retención no coincidieron con alguno de los estándares.

El extracto glucosilado Sinaloa (Figura 11b) presentó el mismo perfil que el crudo Central. Cabe mencionar que los estándares inyectados se encuentran en forma de aglucón, mientras que los presentes en estos extractos se obtuvieron de forma glucosilada. Del perfil de los extractos crudos Sinaloa y Central destacaron dos picos en los tiempos de 61 y 67 minutos, por lo que existe la posibilidad de que se trate de los mismos componentes, seguramente glucosilados.

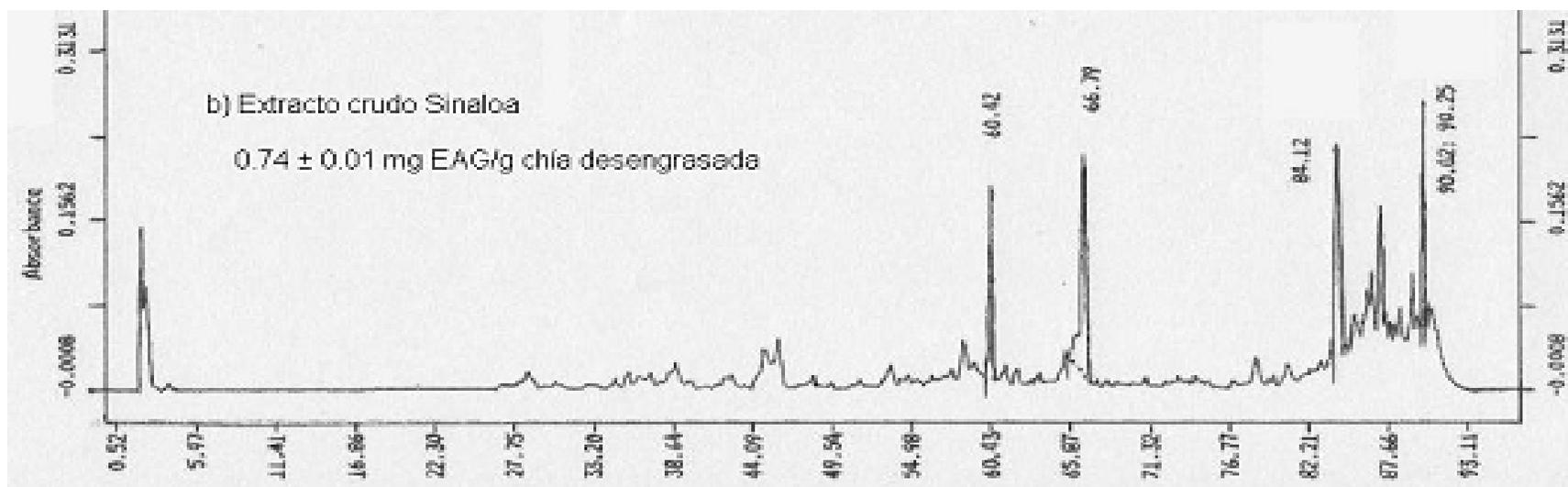
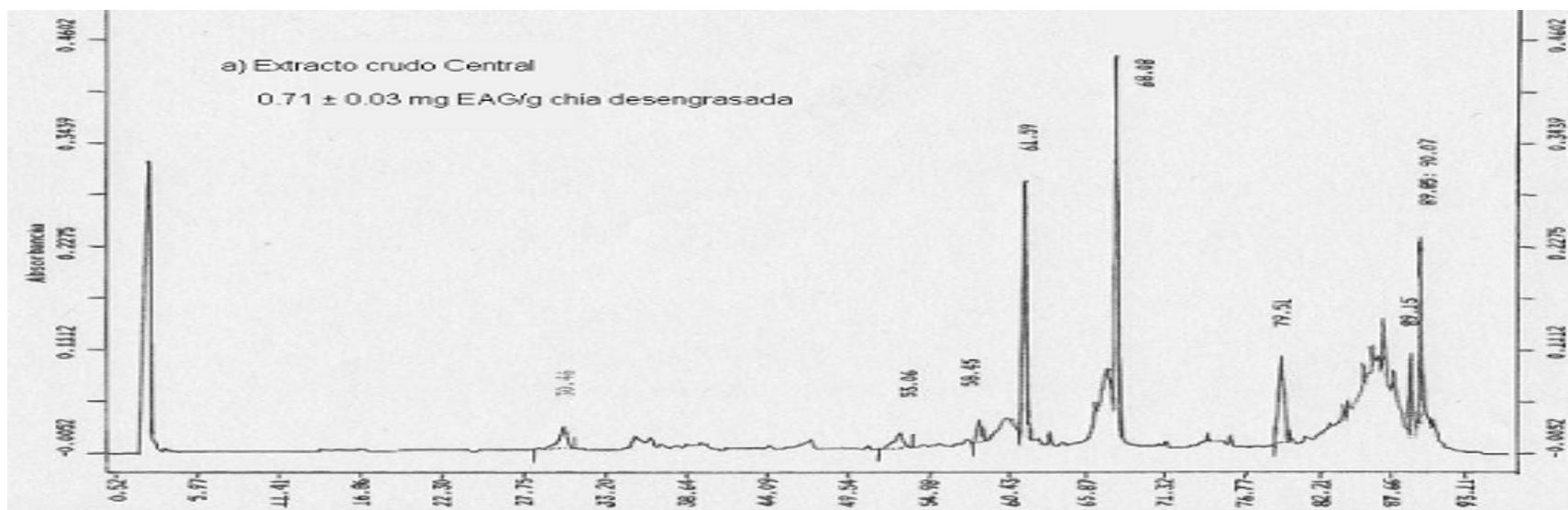


Figura 11. Cromatogramas de los extractos crudos Central (a) y Sinaloa (b)

Tampoco se pudo elucidar su estructura química ya que durante la estandarización del método no se encontró algún comportamiento entre estructura química y orden de elusión. No obstante, se ha reportado (Lu y Foo, 2002), que en la chía se encuentran glucósidos de luteolina, kaempferol, quercetina y apigenina, compuestos que pudieran estar presentes en estas muestras. Este ensayo mostró que la técnica de HPLC para cuantificar polifenoles en extractos crudos para la semilla de chía no fue efectiva.

6.4 Determinación de la capacidad secuestrante

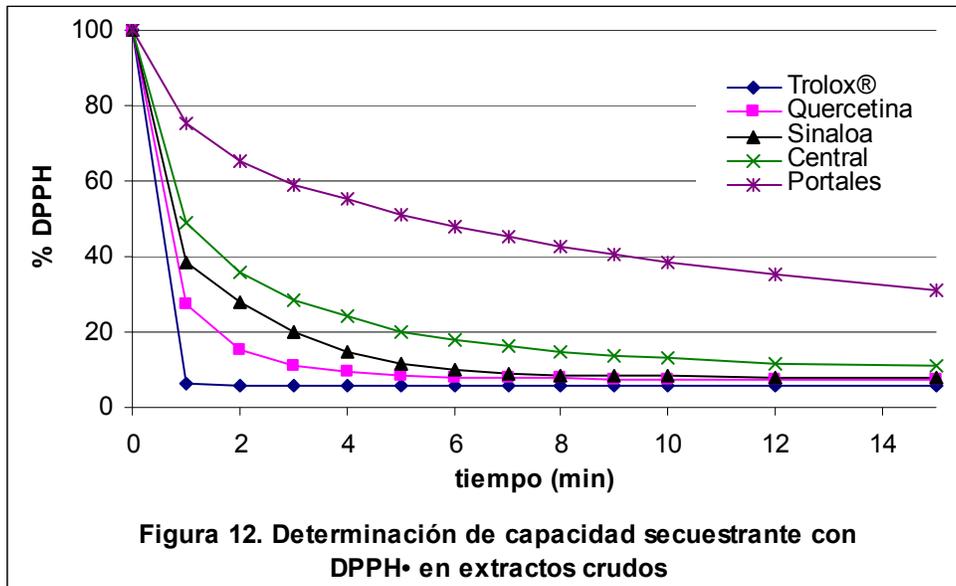
Existen muchos ensayos para determinar la eficiencia de los antioxidantes. En este estudio se eligieron dos métodos basados en la determinación de la capacidad secuestrante, rápidos y sencillos, el DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y el ABTS•⁺ (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), en donde el uso de especies radicales libres que al ser capturados por la mezcla polifenólica, provoca un deterioro en el color que se puede cuantificar espectrofotométricamente (Roginsky et al., 2005).

Los extractos analizados fueron Sinaloa, Central y Portales, ya que Iztapalapa y Nopalera presentaron una cuantificación inicial inferior a 200 ppm, por lo que no sería válido compararlos. Se hizo necesario tener esta concentración ya que es la máxima permitida para los antioxidantes en alimentos.

6.4.1 Radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

Los resultados para el DPPH• se muestran en la Figura 12. Se utilizaron como estándares el Trolox®, (derivado del α -tocoferol) y la quercetina (uno de los polifenoles

aglucones más comunes en plantas). Todas las muestras analizadas se estandarizaron a 200 ppm medidos por Folin-Ciocalteu.



La inhibición presentó una pendiente muy pronunciada para todas las muestras en los primeros minutos (ver Anexo 9.6), seguida de una velocidad lenta. Ello nos indica que al inicio reaccionaron rápidamente los componentes más activos con el radical, mientras que la reacción lenta fue dada por los polifenoles poco reactivos (Villaño et. al., 2004). El orden de esta reacción puede ser uno ya que la gráfica del anexo 9.6 (figura A4) tiene un buen coeficiente de correlación.

En un estudio realizado por Chen y Ho (1997), el orden decreciente de actividad secuestrante en algunos compuestos fue: ácido rosmarínico >> ácido caféico > ácido clorogénico > α -tocoferol > ácido ferúlico = BHT. Posiblemente estas estructuras estén involucradas en el secuestro de estos extractos.

El Trolox® tuvo una capacidad de $94.39 \pm 0.17\%$, mientras que la quercetina tuvo una CS de $92.61 \pm 0.34\%$, ambas muestras fueron estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$). La quercetina presentó una menor capacidad de secuestro durante los primeros 5 minutos, pero logró tener al final del experimento un comportamiento similar al Trolox® aunque no estadísticamente igual.

Ninguna de las dos especies tuvo 100% de inhibición ya que el producto final de la reacción no es incoloro, sino que deja un ligero color amarillo que absorbe en el espectro visible. Por ello si se tiene un porcentaje de inhibición a partir del 93%, se dice que hay una inhibición completa (Milliauskas et al., 2004).

Una buena actividad de los antioxidantes es atribuida a que la estructura polifenólica posee muchos sustituyentes hidroxilo reactivos como el caso de la quercetina (Akowuah, et al., 2005).

El orden descendente de capacidad secuestrante (Tabla 5) fueron: Trolox® > Sinaloa = Quercetina > Central >> Portales. En la Figura 12 se observa que si la reacción se hubiera dejado por un tiempo más prolongado, llegado el momento todas las especies presentarían capacidades de secuestro mayores, ya que el comportamiento de los tres lotes no llegó a un valor de absorbancia constante.

El extracto de Portales mostró una menor capacidad con respecto al resto de los lotes, además su pendiente gráfica (ver figura A4, Anexo 9.6) no fue tan pronunciada como en el resto de las muestras.

Una buena CS puede estar dada por la presencia de ácido caféico o derivados del ácido rosmarínico, compuestos que se han encontrado en especies de *Salvia* y que se ha demostrado su gran capacidad antioxidante (Lu y Foo, 2001).

Tabla 5. Capacidad secuestrante (%CS) entre el ensayo de DPPH• y ABTS•⁺ para los extractos crudos

Muestra	Capacidad secuestrante (%)		Referencia
	DPPH•	ABTS• ⁺	
Trolox®	94.39 ± 0.17 ^a	99.16 ± 0.29 ^e	
Quercetina	92.61 ± 0.34 ^b	99.18 ± 0.10 ^e	
Sinaloa	91.89 ± 0.30 ^b	99.58 ± 0.14 ^e	
Central	87.90 ± 1.83 ^c	98.64 ± 0.32 ^e	
Portales	66.96 ± 1.74 ^d	89.47 ± 4.62 ^f	
<i>Salvia officinalis</i>	92.3 ± 0.5	85.7	Miliauskas et al., 2004
<i>Salvia sclarea</i>	92.9 ± 0.4	60.0	Miliauskas et al., 2004
<i>Salvia glutinosa</i>	91.5 ± 0.5	78.57	Miliauskas et al., 2004

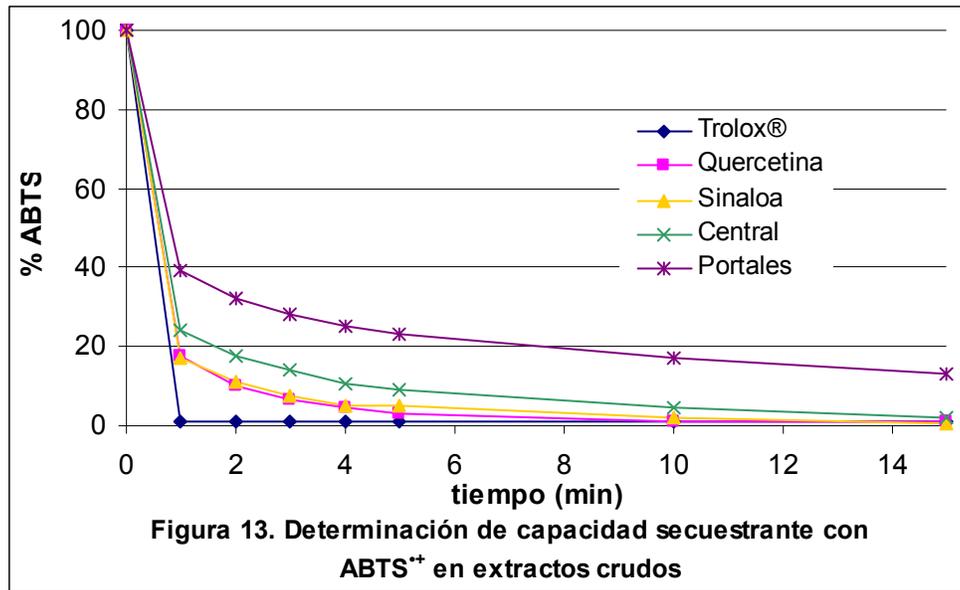
Nota: Letras iguales no presentan diferencia significativa (Ver anexo 9.5 ANOVA 9, 10)

6.4.2 Radical catiónico ABTS•⁺ [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]

En la Figura 13 se muestran los resultados para la reacción con el radical ABTS•⁺ en donde no se encontró diferencia significativa para el Trolox®, quercetina, en Sinaloa y Central (Tabla 5); sólo el extracto Portales tuvo un valor menor en este ensayo.

Al observar la Figura 13 vemos que el Trolox® al primer minuto llegó a un máximo de secuestro; en cambio el extracto Central no pudo secuestrar al ABTS•⁺ en

su totalidad en los primeros minutos, sino que necesitó los 15 minutos para hacer lo mismo que el Trolox® en los primeros minutos. Por su parte, el extracto de chía de Portales siempre mantuvo poca cantidad secuestrada.



Al realizar esta gráfica en escala semilogarítmica (ver Figura A5 anexo 9.6) se puede decir que el orden de la reacción para los tres extractos es 1, ya que los coeficientes de correlación son cercanos a 1.

Se sabe que los flavonoides son más reactivos que los ácidos hidroxicinámicos y éstos más activos que los ácidos hidroxibenzoicos (Rice-Evans, 1996). Esto sugiere que una pequeña parte del total polifenólico (flavonoides) está interaccionando con los radicales.

Al comparar ambas técnicas de secuestro de especies radicales (Tabla 5), se observó que los extractos glucosilados de los diferentes lotes de chía, en la

determinación con ABTS•⁺ presentaron altas CS. En el primer minuto el secuestro fue mayor con respecto al resto de la cinética. La determinación con DPPH• mostró un menor secuestro respecto a la determinación con ABTS•⁺.

6.5 Ensayo de HPLC (Determinación de las condiciones de tiempo de ensayo y mezcla de fase móvil)

Se decidió hacer un estudio de HPLC que pudiera separar la mayor cantidad de polifenoles y hacer la técnica funcional para trabajos posteriores.

La determinación de fenólicos condensados y oligomerizados es un problema difícil debido a la amplia forma estructural en la que pueden ser encontrados (Roginsky, et al., 2005); por ello se probaron varias formas de hacer la mezcla de fase móvil con una misma solución estándar, las principales características de los diferentes gradientes se muestran en la Tabla 6, mientras que los detalles se encuentran en el anexo 9.3.

Tabla 6. Gradientes utilizados para obtener la mejor respuesta

	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 3	Gradiente 4
Tiempo de ensayo (minutos)	76	56	81	96
% ácido fórmico inicial	95	95	100	100
% ácido fórmico final	0	0	0	0
No. de estándares inyectados	11	11	11	11
No. de picos obtenidos	7	7	9	10

De todos estos gradientes se decidió hacer el número 4 (Figura 14), ya que fue el método de ensayo en el que los estándares se resolvieron mejor (logró separar 9 de los 11 compuestos inyectados). En el caso del ensayo 1 y 2, aunque el tiempo fue menor respecto al resto de las propuestas, la resolución de los picos fue muy pobre, ya que coeluyeron cuatro estándares. El gradiente 2 tuvo un tiempo de corrida de 56 minutos, todos los picos salieron antes del minuto 36 pero tampoco se resolvieron adecuadamente. El gradiente tres logró separar 9 de los 11 compuestos inyectados, aunque algunos compuestos se mezclaron un poco en las bases. Un ensayo más prolongado hubiera sido muy largo e involucraría mayor gasto de reactivo.

Los resultados de la solución estándar inyectada (Tabla 7) indicaron que la mezcla fue separada casi en su totalidad. Sólo el ácido cumárico y el ácido hidroxicinámico no se resolvieron debido a que sus tiempos de retención (49.12 y 48.80 minutos respectivamente) fueron muy similares y la columna no fue capaz de separarlos.

Al observar las estructuras químicas de los estándares inyectados (Figura 15), no se encontró algún patrón con el orden de elusión. En el caso de las dos especies coeluyeron. Estructuralmente el ácido cumárico tiene un sustituyente hidroxilo en posición -para y el hidroxicinámico no lo presenta, diferencias que pudieron afectar la coelución.

Tabla 7. Factor de respuesta de los estándares analizados

	Conc. (mg/mL)	Tiempo de retención (min)	Factor de respuesta	% C.V.	n
Catecol	1.55	26.56	358.50 ± 11.29	3.15	3
Epigallocatequina	0.66	35.60	17.72 ± 0.45	2.54	2
Catequina	0.08	36.51	202.29 ± 7.75	3.83	3
Ác. Caféico	0.35	39.64	1085.07 ± 65.71	6.06	7
Epicatequina	1.25	45.00	214.96 ± 6.66	3.10	6
Ácido cumárico, Ácido hidroxicinámico	0.30 0.30	50.14	N. D.	N. D.	N. D.
Gallocatequina	0.80	50.61	381.16 ± 13.71	3.60	2
7-hidroxycumarina	0.25	52.41	572.63 ± 4.36	0.76	3
Ácido Ferúlico	0.50	55.20	860.26 ± 35.10	4.08	3
Rutina	0.25	57.19	201.18 ± 11.49	5.71	5
Quercetina	1.00	77.43	352.41 ± 4.08	1.16	3
Kaempferol	0.60	83.83	391.74 ± 95.60	24.40	2

N. D.: No Determinado

Nota: epigallocatequina y gallocatequina no se inyectaron en la solución estándar, solo se inyectaron individualmente.

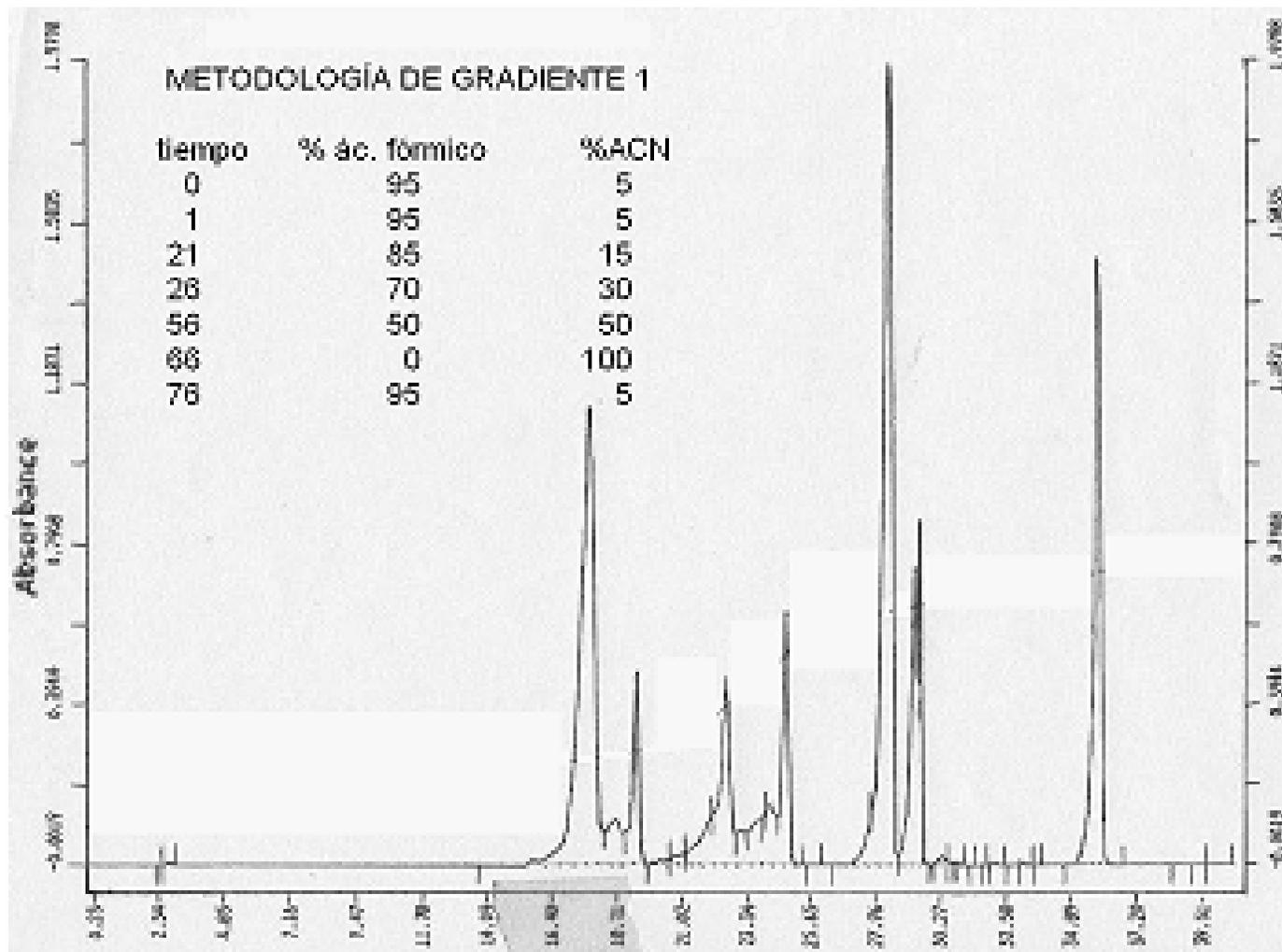


Figura 14. Cromatogramas de los diferentes gradientes de los estándares.

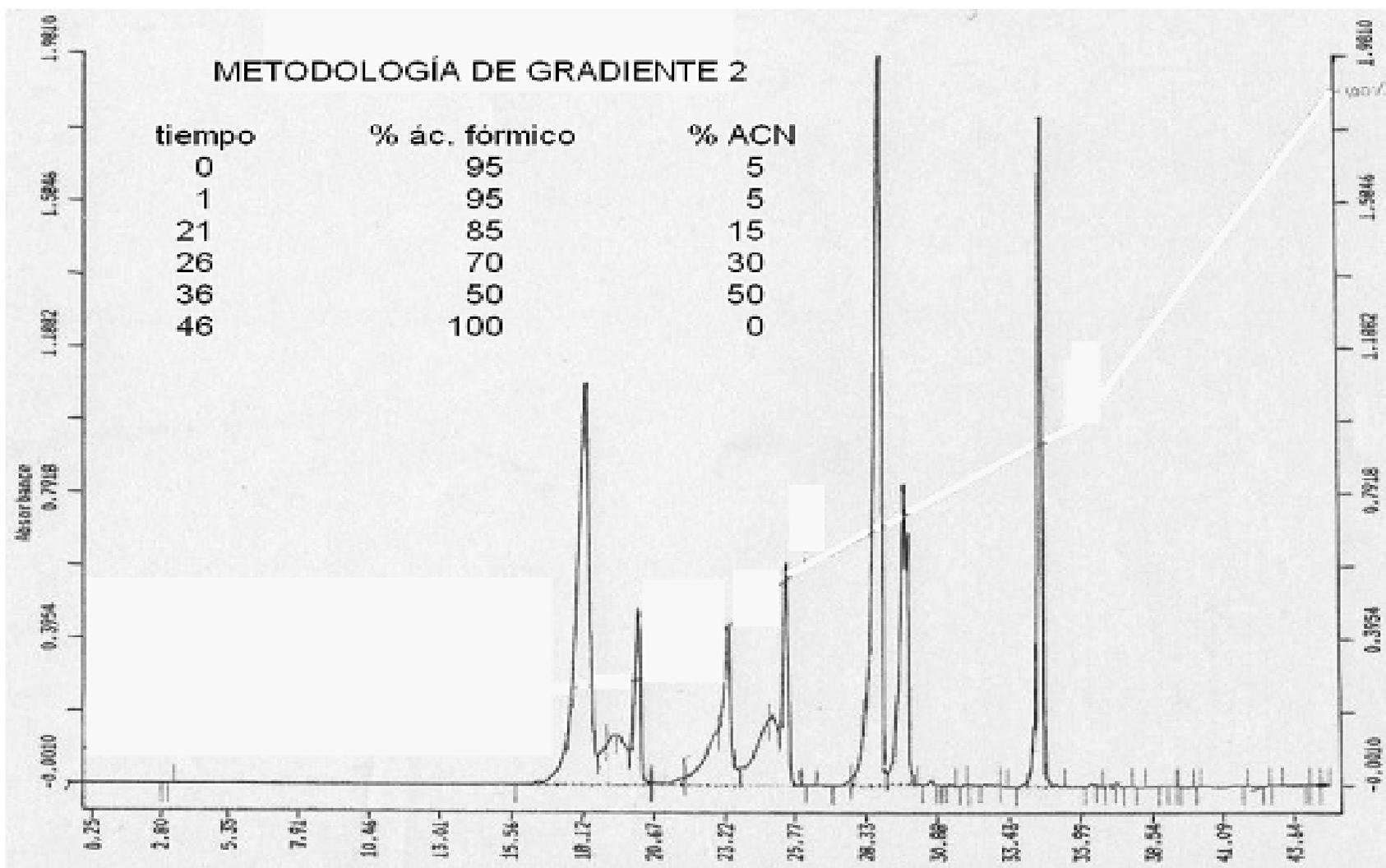


Figura 14 (Cont.). Cromatograma de los diferentes gradientes de los estándares.

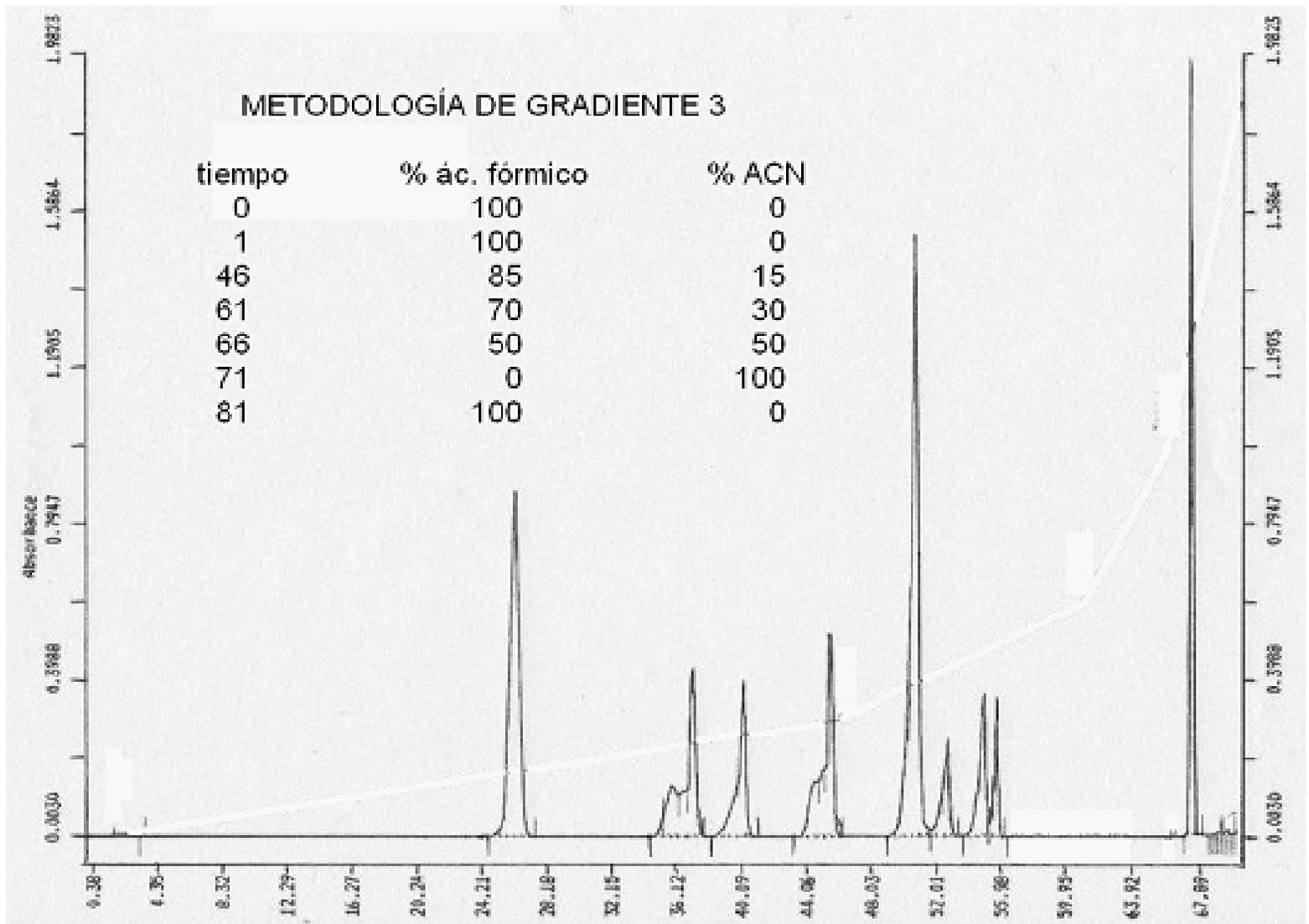


Figura 14 (cont.). Cromatograma de los diferentes gradientes de los estándares.

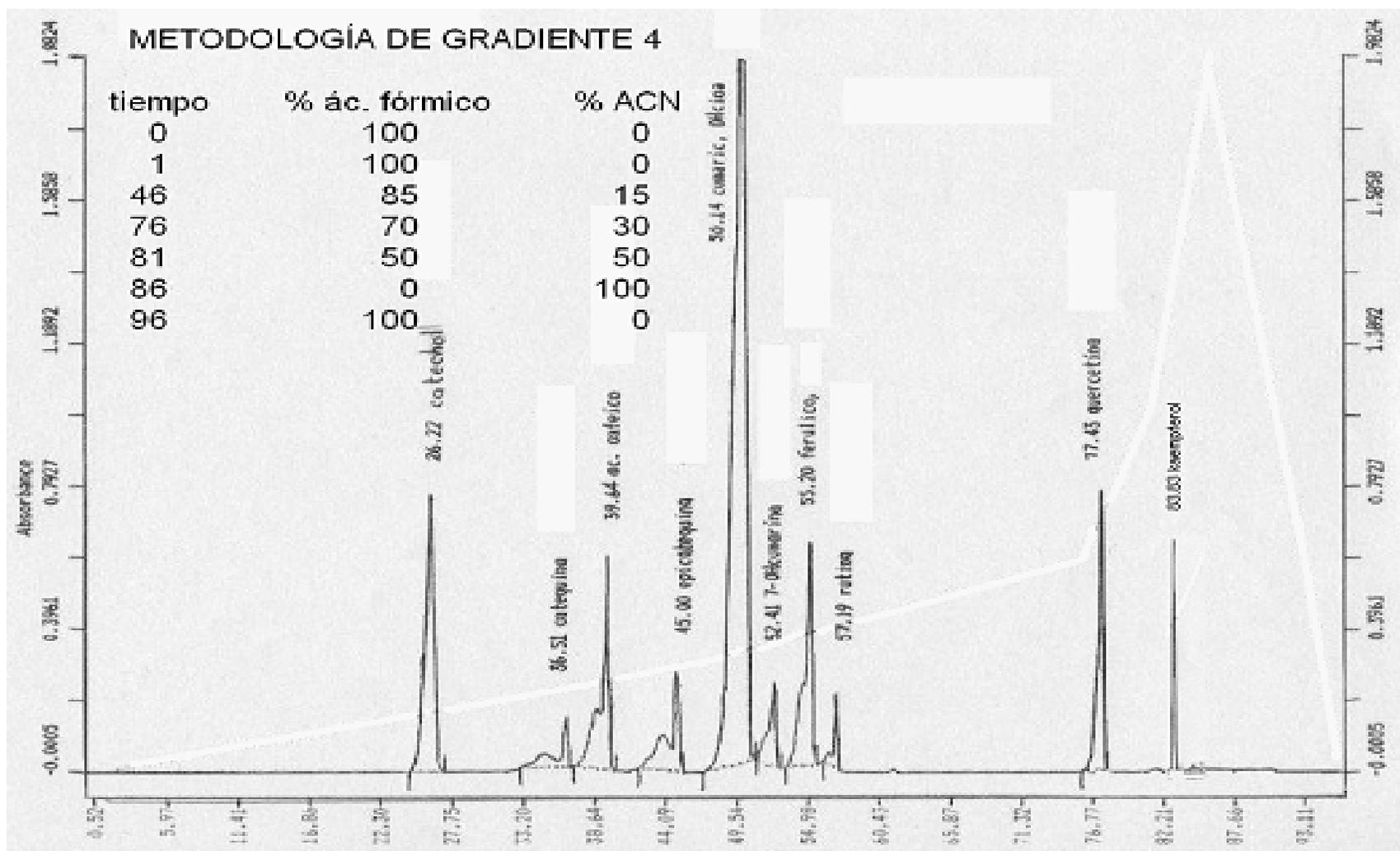


Figura 14 (Cont.). Cromatograma de los diferentes gradientes de los estándares

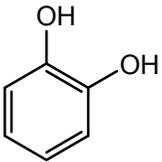
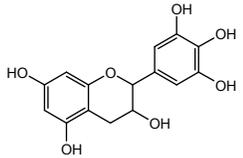
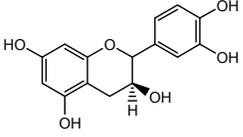
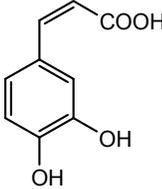
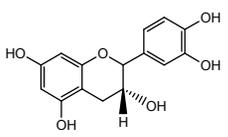
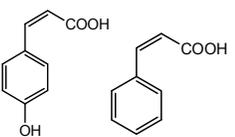
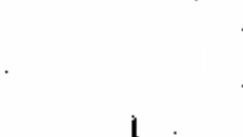
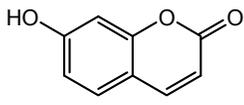
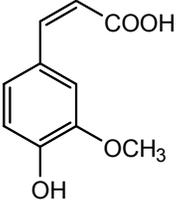
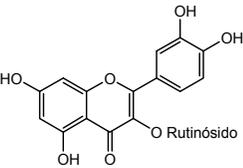
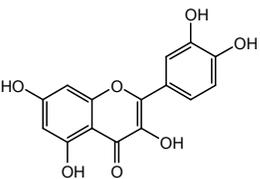
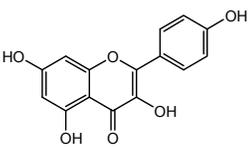
 <p>catecol (26.56 min)</p>	 <p>epigallocatequina (35.60 min)</p>	 <p>catequina (36.51 min)</p>	 <p>ácido caféico (39.64 min)</p>
 <p>epicatequina (45.00 min)</p>	 <p>ácido cumárico = ácido hidroxicinámico (50.14 min)</p>	 <p>galocatequina (50.61 min)</p>	 <p>7-hidroxicumarina (52.41 min)</p>
 <p>ácido ferúlico (55.20 min)</p>	 <p>rutina (57.19 min)</p>	 <p>quercetina (77.43 min)</p>	 <p>kaempferol (83.83 min)</p>

Figura 15. Estructuras de la mezcla estándar de acuerdo con su tiempo de retención

Segunda etapa: Efecto de la temperatura de hidrólisis en el rendimiento de los polifenoles presentes en la chía

6.6 Extracción termoácida (hidrolizado)

El motivo para realizar una extracción ácida fue el tener los polifenoles en forma de aglucones, es decir, libres del azúcar. Para esta extracción no se utilizaron todos los lotes de chía, ya que de acuerdo con los resultados de la extracción cruda, los lotes

Sinaloa y Central tuvieron mayor concentración de polifenoles además de una gran CS, por lo que se decidió utilizar sólo éstas.

La metodología de extracción ácida posee condiciones drásticas (HCl 1.2 M y temperatura de 92 °C), que permitirían obtener polifenoles solubles en etanol además de algunos polifenoles insolubles, que fueron hidrolizados en el momento de la extracción debido a que se encontraban fuertemente asociados con la pared celular de las semillas (Sánchez, 2002).

Se aplicó una temperatura de extracción de 92 °C, en estas condiciones pueden darse reacciones de caramelización, Maillard y degradación de Strecker, por ello tuvo un tratamiento de purificación.

Los rendimientos para estos extractos fueron de $2.70 \pm 0.05\%$, para el lote de Sinaloa; y $3.60 \pm 0.18\%$, para el de Central, mismos que fueron estadísticamente diferentes (ver Anexo 9.5 ANOVA 11). Estos valores resultaron menores al ser comparados con sus extractos crudos (glucosilados), sin embargo, de acuerdo con Folin (Tabla 8), la concentración de polifenoles fue mucho mayor en los ácidos.

6.7 Cuantificación

6.7.1 Cuantificación total, flavonoides y flavonoles

La concentración por Folin fue de 2.43 ± 0.02 y 2.46 ± 0.05 mg EAG/g de semilla de chía desengrasada para Sinaloa y Central respectivamente; no presentaron diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre sí. Este valor está muy por encima del reportado

por Milliauskas et al. (2004) en donde el género *Salvia* presentó 400 mg EAG/g chía desengrasada.

El porcentaje de flavonoides y flavonoles en ambos extractos se muestra en la Tabla 8. La cantidad de flavonoides entre ambos lotes presentó diferencia significativa, mientras que las concentraciones de flavonoles fueron estadísticamente iguales.

Alrededor del 80% de los flavonoides corresponden a los flavonoles; el otro 20% podrían ser flavonas, ya que son el siguiente componente principal de los flavonoides (Cadenas, 2002).

Tabla 8. Contenido de polifenoles totales, flavonoides y flavonoles en los extractos hidrolizados (mg/g chía desengrasada)

Lote de chía	Polifenoles totales (EAG)	Flavonoides (ER)	Flavonoles (ER)
Sinaloa	2.43 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.00 ^b	0.16 ± 0.01 ^d
Central	2.46 ± 0.05 ^a	0.21 ± 0.00 ^c	0.17 ± 0.01 ^d

Nota: Letras iguales corresponden a muestras estadísticamente iguales $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 9.4 ANOVA 12, 13, 14)

Al comparar los resultados obtenidos de los extractos crudos con los hidrolizados se observa una mayor concentración de polifenoles totales en estos últimos, además de una mayor proporción de flavonoides y flavonoles utilizando la extracción ácida, lo que significa que el tratamiento térmico y el medio ácido fueron condiciones favorables para aumentar los rendimientos y proporciones.

Los flavonoides interaccionan con las estructuras polisacáridas en las plantas a través de enlaces no covalentes, la fuerza o debilidad que los una facilitará o dificultará

la extracción; por ello, en este caso se necesitó de condiciones más drásticas para aumentar el rendimiento.

6.8 Determinación de capacidad secuestrante (DPPH• y ABTS•⁺)

En estos extractos hidrolizados (Sinaloa y Central) se encuentran las formas agluconas de los polifenoles debido a las condiciones de obtención, razón por la que la cantidad secuestrada en estos residuos fue mayor que en los extractos crudos, ya que la forma glucosilada disminuye la CS en el caso del DPPH• por que presenta impedimento estérico (Lu y Foo, 2001).

Los resultados para el DPPH• (Tabla 9, Figura 16) no presentaron diferencia estadística, sólo el Trolox® tuvo un secuestro ligeramente menor respecto al reportado con el uso de ABTS•⁺. Su comportamiento fue similar a los extractos crudos, es decir, una fuerte CS durante los primeros cinco minutos, tiempo suficiente para capturar casi todo el radical.

Al comparar los extractos hidrolizados con los crudos, se observa que el proceso de hidrólisis mostró una mayor CS respecto a los extractos glucosilados (Figura 12) para el ensayo con DPPH•, ya que los aglucones presentan una mayor actividad que las formas glucosiladas (Heim, 2002).

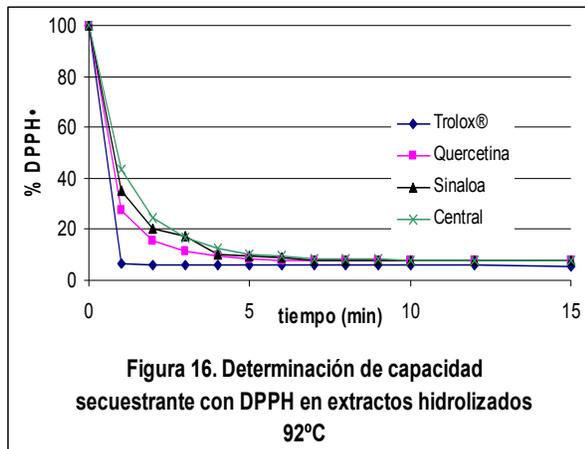


Figura 16. Determinación de capacidad secuestrante con DPPH• en extractos hidrolizados 92°C

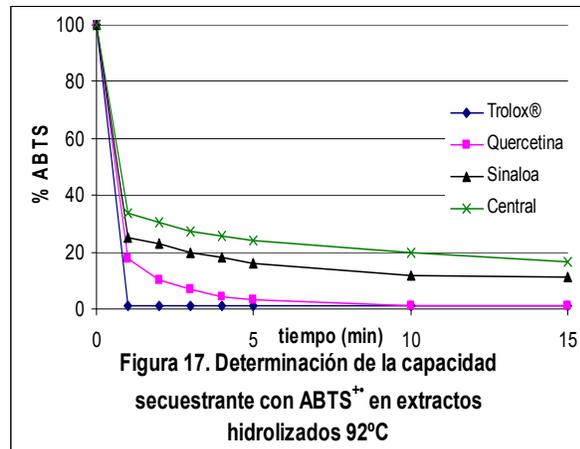


Figura 17. Determinación de la capacidad secuestrante con ABTS•+ en extractos hidrolizados 92°C

Para el caso de la determinación con ABTS•⁺ (Figura 17), los extractos presentaron un secuestro parcial mayor al 85% (Tabla 9), estadísticamente diferentes entre sí y entre las referencias. Estos valores fueron menores con respecto a los extractos crudos ya que en la determinación con ABTS•⁺ se corre el riesgo de observar el efecto de especies que no necesariamente poseen actividad antioxidante. En el caso de los extractos crudos no se llevó a cabo ningún proceso de purificación, en consecuencia los azúcares pudieron haber influido en el secuestro total (Roginsky, et al., 2005).

En la figura A6 (anexo 9.2), no se pudo encontrar el orden de la reacción, sin embargo en la figura A7 (anexo 9.2), se observó que quercetina, Sinaloa y Central presentan un comportamiento de primer orden para la determinación con ABTS•⁺.

En los extractos glucosilados existe la presencia de azúcares que no tienen efecto antioxidante, pero también existe tirosina y fenilalanina (Olivos Lugo, 2005), compuestos aromáticos que intervienen en la determinación de CS por ABTS•⁺. Es por

esto que los extractos hidrolizados presentaron un menor secuestro ya que tuvieron un proceso de purificación que no ocurrió en el extracto crudo.

Tabla 9. Capacidad secuestrante (%CS) para los ensayos de DPPH• y ABTS•⁺ en los extractos hidrolizados 92 °C

Muestra	Capacidad secuestrante (%)	
	DPPH•	ABTS• ⁺
Trolox®	94.39 ± 0.17 ^a	99.16 ± 0.29 ^c
Querce-tina	92.61 ± 0.34 ^b	99.18 ± 0.10 ^c
Sinaloa	93.05 ± 1.50 ^b	89.00 ± 2.30 ^d
Central	92.30 ± 1.33 ^b	85.38 ± 1.33 ^e

Nota: A letras iguales muestras iguales, a letras diferentes, existe diferencia significativa $\alpha = 0.05$ (ver Anexo 9.5 ANOVA 15, 16)

Al inicio de esta etapa se utilizó una temperatura de extracción de 92 °C y un medio ácido por el HCl 1.2 M en etanol, aumentando significativamente la concentración de polifenoles respecto a la obtenida a temperatura ambiente (extracto crudo). Sin embargo, Moure, et al. (2001), afirmaron que altas temperaturas durante la extracción pueden afectar la estabilidad de los compuestos, así como la existencia de degradación química, enzimática o térmica.

Por ello se realizó una extracción ácida a 92 °C y una a 60 °C para ver el efecto en su cuantificación. A 60 °C no hay efecto negativo significativo en la cuantificación con respecto a lo obtenido a 92 °C, además de observar buenas actividades antioxidantes.

6.9 Cuantificación de polifenoles totales, flavonoides y flavonoles

La muestra utilizada para este proceso, fue el lote obtenido en el mercado de la Central de Abasto, ya que presentó buenos resultados para el proceso de hidrólisis en cuanto a concentración polifenólica y Capacidad Secuestrante. Además de que se contaba con mayor cantidad de chía respecto a la de Sinaloa.

El rendimiento encontrado fue de $3.60 \pm 0.03\%$ para el extracto a $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $3.62 \pm 0.06\%$ en el de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ que estadísticamente no presentaron diferencia (ver Anexo 9.5 ANOVA 17). El valor de Folin aumentó de manera significativa, ya que a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ se obtuvieron $2.88 \pm 0.02\text{ mg EAG/g}$ de semilla de chía desengrasada, mientras que a $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ se encontró una concentración de $2.50 \pm 0.06\text{ mg EAG/g}$ de semilla de chía desengrasada.

En un principio se establecieron condiciones de $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener el extracto hidrolizado ya que la temperatura haría romper las asociaciones de los polifenoles con proteínas y azúcares unidos a la pared celular. Sin embargo, al proponer una temperatura menor se obtuvo un mayor rendimiento indicando que la alta temperatura tuvo un efecto negativo en la cuantificación.

Las concentraciones de flavonoides (Tabla 10) no variaron en las condiciones establecidas, sin embargo, en el caso de los flavonoles encontrados en el extracto a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ se reportó una concentración mayor que los flavonoides. Este valor puede deberse a que los flavonoides reportados pertenecen sólo al grupo de los flavonoles y no hubo otro tipo de flavonoides (como las flavonas).

Tabla 10. Contenido de polifenoles en los extractos hidrolizados obtenidos utilizando dos temperaturas de extracción (mg/g chía desengrasada)

Temperatura (°C)	Polifenoles totales (EAG)	Flavonoides (ER)	Flavonoles (ER)
92	2.50 ± 0.06 ^a	0.20 ± 0.00 ^c	0.14 ± 0.01 ^d
60	2.88 ± 0.02 ^b	0.20 ± 0.01 ^c	0.23 ± 0.01 ^e

Nota: A letras iguales corresponden muestras estadísticamente iguales con $\alpha=0.05$ (ver Anexo 9.5 ANOVA 18, 19, 20)

6.10 Perfil HPLC

Aquí se presentan los resultados de las inyecciones de los extractos hidrolizados en las dos temperaturas de hidrólisis. No se inyectó la muestra hidrolizada Sinaloa, ya que debido a los resultados, no existió diferencia, por lo que se hizo la suposición de que el perfil sería igual.

En cuanto a los extractos hidrolizados, en el caso del hidrolizado a 92 °C (Fig. 18a), el perfil mostró 7 picos en donde el de 52.8 minutos fue posible 7-hidroxycumarina. No se ha reportado la existencia de este compuesto en las especies de salvia, por lo que se inyectó nuevamente adicionando 7-hidroxycumarina como estándar interno. Este cromatograma mostró claramente la existencia de dos picos con tiempos de retención de 52.8 y 52.3 minutos, por lo que se descartó la presencia de 7-hidroxycumarina.

Al inyectar el extracto hidrolizado a 60 °C (Fig. 18b), el perfil encontrado fue muy diferente al de 92 °C, ya que se obtuvieron cuatro picos principales, en los que se pudo identificar ácido caféico, quercetina y kaempferol, en las concentraciones de 4.95 ± 0.25 , 5.72 ± 0.28 y 11.19 ± 0.56 mg/100mL de extracto respectivamente.

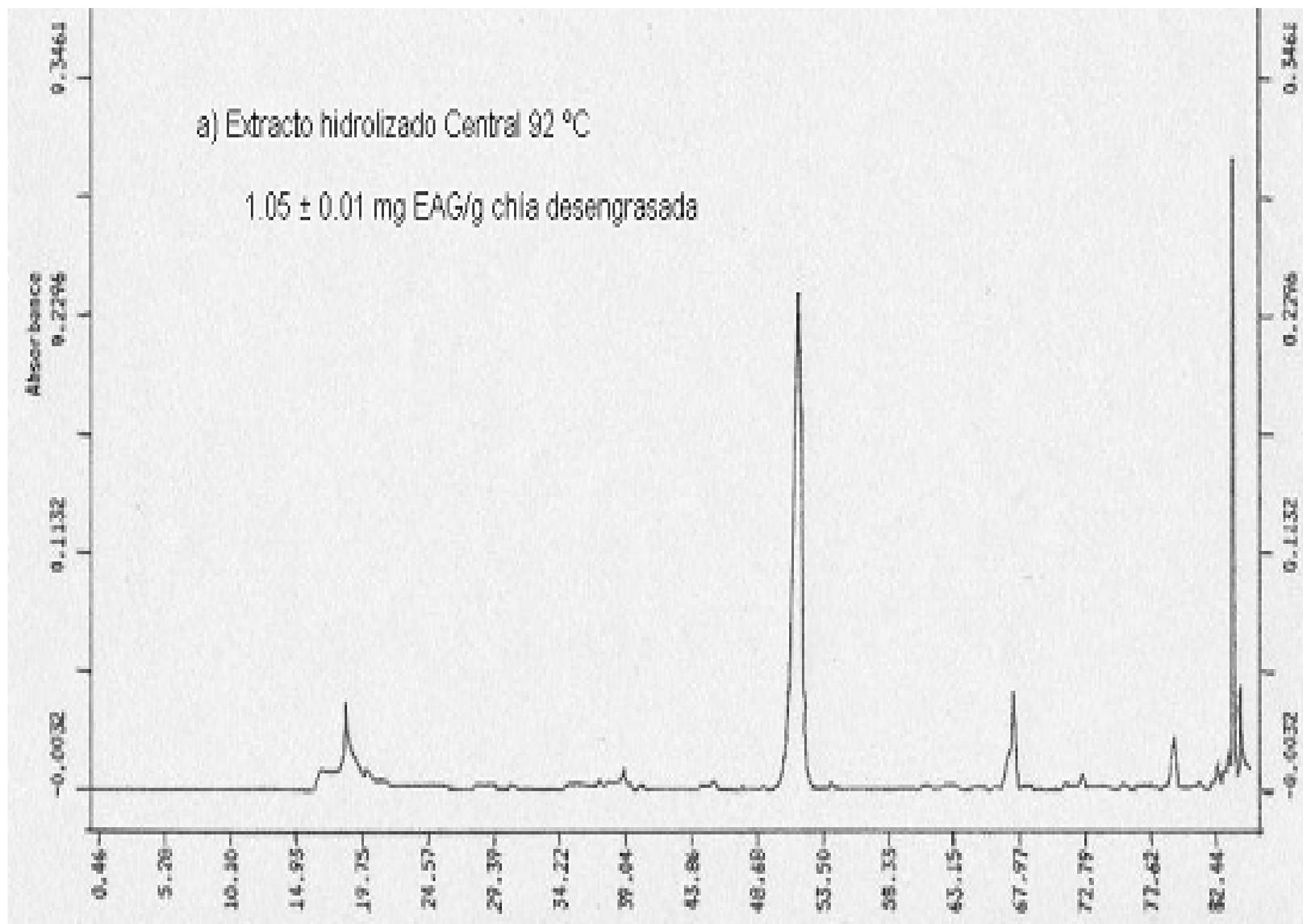


Figura 18. Cromatograma del extracto hidrolizado Central 92 °C (a)

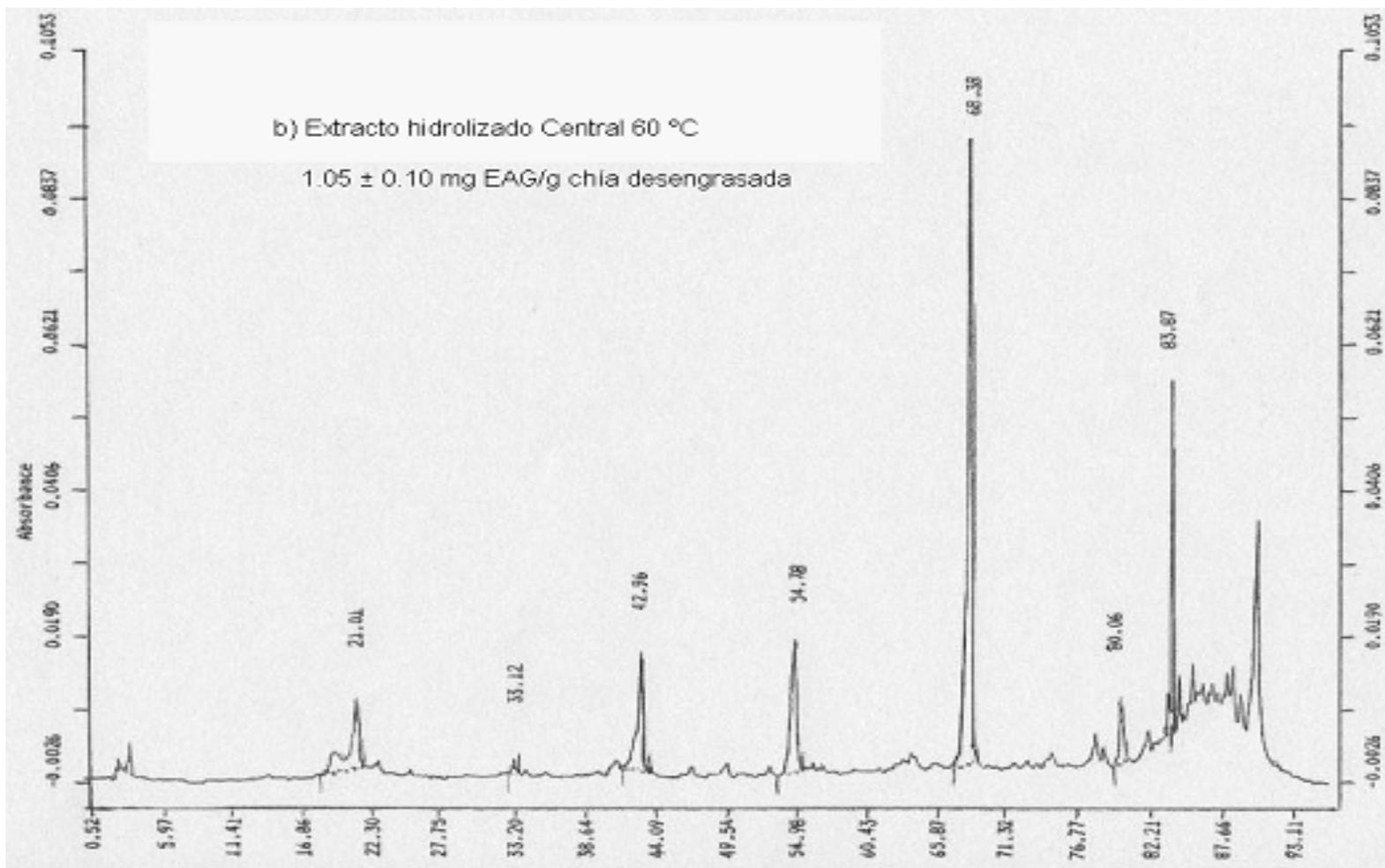


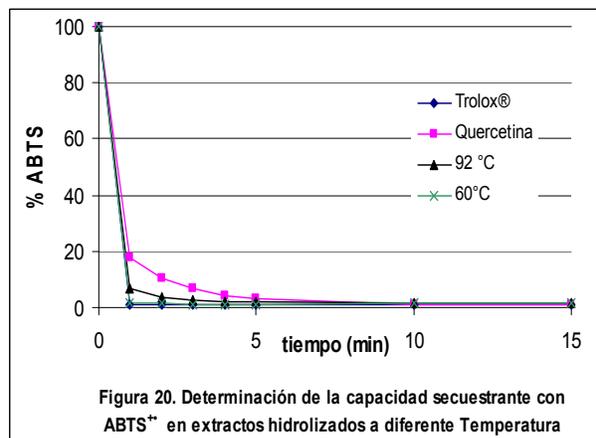
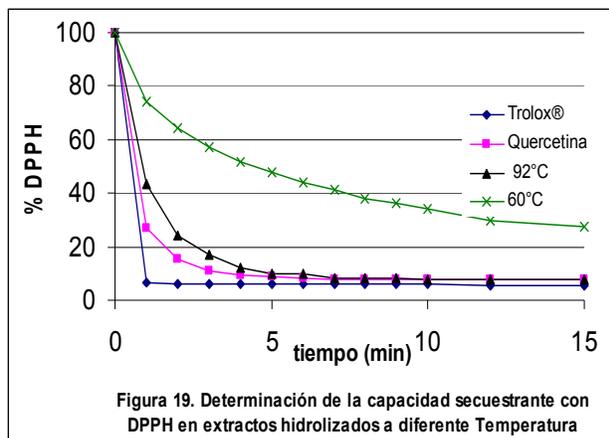
Figura 18. Cromatograma del extracto hidrolizado Central 60 °C (b)

Ambos extractos hidrolizados presentaron durante los monitoreos de CS buenos resultados. En el caso de $ABTS\cdot^+$, el de 60 °C presentó una menor actividad; sin embargo, el perfil en HPLC fue totalmente diferente, indicando que el cambio de temperatura no sólo afecta en la concentración polifenólica total, sino en su perfil cromatográfico.

Los tres polifenoles encontrados en la chía son muy abundantes en otros alimentos. El ácido caféico se encuentra en uvas verdes, olivo, col y espárragos. La quercetina se encuentra en cebollas, piel de manzana, moras, uvas negras, te y brócoli. El kaempferol se encuentra en brócoli, puerro, toronjas y te (Rice-Evans et al., 1997).

6.11 Determinación de capacidad secuestrante ($DPPH\cdot$ y $ABTS\cdot^+$)

La temperatura fue importante en la cuantificación ya que se consiguió una mayor cantidad de polifenoles totales en el extracto a 60 °C, pero también se necesitó conocer si la temperatura influía sólo en su concentración o también en la actividad secuestrante (Figuras 19 y 20).



Para el ensayo con DPPH• (Figura 19) el extracto a 92 °C tuvo un buen rendimiento igual al de quercetina, en cambio el de 60 °C tuvo un comportamiento pobre, ya que su capacidad secuestrante fue de poco más del 70% (Tabla 11), además de que su cinética no presentó alta CS durante los primeros minutos.

Si un compuesto polifenólico se encuentra todavía asociado a otras estructuras como los azúcares, la determinación con DPPH• se ve empobrecida, ya que existe impedimento estérico (Roginsky et al., 2005).

Para el caso de ABTS•⁺ (Figura 20) el Trolox® y el extracto hidrolizado Central a 60 °C fueron casi iguales gráficamente, ya que se traslaparon sus cinéticas; sin embargo, al analizarlas estadísticamente (Tabla 11) muestra diferencia significativa al final de la cinética. El porcentaje de capacidad secuestrante final en ambas temperaturas no mostró diferencia estadística, a pesar de que su comportamiento durante los primeros cinco minutos sí lo fue.

Al observar la figura A8 (anexo 9.2), se puede decir que el extracto hidrolizado a 60 °C tiene una cinética de orden uno, mientras que los demás no se pudo saber ya que los coeficientes de correlación no fueron cercanos a 1.

Con los resultados obtenidos se puede decir que el mejor extracto es el hidrolizado a 60 °C, ya que tuvo una mayor concentración de polifenoles totales respecto al hidrolizado a 92 °C y al glucosilado. En cuanto a la capacidad secuestrante,

ambas temperaturas de hidrólisis tuvieron buenos resultados en la determinación con ABTS^{•+}.

Tabla 11. Capacidad secuestrante (%CS) para los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+} en los extractos hidrolizados a dos temperaturas de la semilla de chía Central

Muestra	Capacidad secuestrante (%)	
	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
Trolox®	94.39 ± 0.17 ^a	99.16 ± 0.29 ^e
Querce-tina	92.61 ± 0.34 ^b	99.18 ± 0.10 ^e
Extracto obtenido a 92 °C	92.3 ± 0.31 ^b	98.72 ± 0.02 ^f
Extracto obtenido a 60 °C	71.85 ± 1.42 ^c	98.91 ± 0.29 ^f

Nota: Letras iguales representan muestras estadísticamente iguales con $\alpha = 0.05$ (ver Anexo 9.5 ANOVA 21, 22)

Tercera etapa: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad de los polifenoles obtenidos de la chía

Chang, et al. (2006) hicieron un estudio en el que descubrieron que la temperatura y la luz son los factores con mayor influencia en la actividad antioxidante durante el almacenamiento de los antioxidantes naturales. Estos factores también se ven reflejados en su concentración; por ello se decidió realizar una cinética de dos extractos para el lote de Central (crudo e hidrolizado a 60 °C) almacenándolos en la oscuridad a tres diferentes temperaturas: temperatura ambiente (20-25 °C), temperatura de refrigeración (4 °C) y temperatura de congelación (-18 °C). Se monitoreó cada cinco días los primeros 40; al no haberse encontrado diferencias significativas se prolongó el intervalo a cada 7 días hasta 100. No se mostraron en las gráficas todos los resultados ya que fueron irrelevantes, sin embargo se incluyen en el anexo 9.4. Cada día de

monitoreó se tomó una muestra de los extractos a las temperaturas determinadas, y se les colocó en la oscuridad a temperatura ambiente para estar en condiciones de analizarlas.

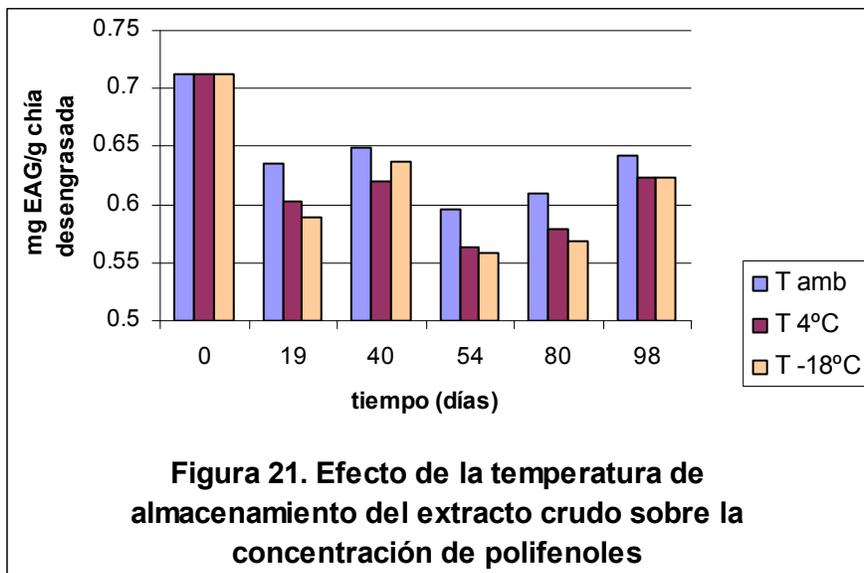
6.12 Extracto crudo

6.12.1 Cuantificación total

En este extracto (Figura 21), no se encontró diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento (ver Anexo 9.5 ANOVA 23) lo cual pone en evidencia que utilizando una temperatura de entre $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se conservan los extractos. A temperatura ambiente es menos ideal ya que se han reportado casos (Chang et al., 2006) en los que en estas condiciones existe una disminución de la cantidad inicial polifenólica de un 8% después de 6 meses; Montoro et al. (2006), encontraron que el extracto de antioxidantes de moras es estable durante 3 meses.

En el experimento realizado, el primer registro (día 0), el extracto, presentó una concentración inicial de 0.71 ± 0.03 mg EAG/gde semilla de chia desengrasada, que disminuyó en los siguientes 5 días (0.62 ± 0.02 mg EAG/g chia desengrasada), esto tal vez pudiera significar que existen componentes de fácil degradación.

Los resultados de las tres temperaturas utilizadas durante el almacenamiento no fueron suficientes para determinar la velocidad de degradación -el tiempo que se ha reportado para observar el efecto es de 6 meses, como mínimo (Montoro et al. 2006, Chang et al., 2006).

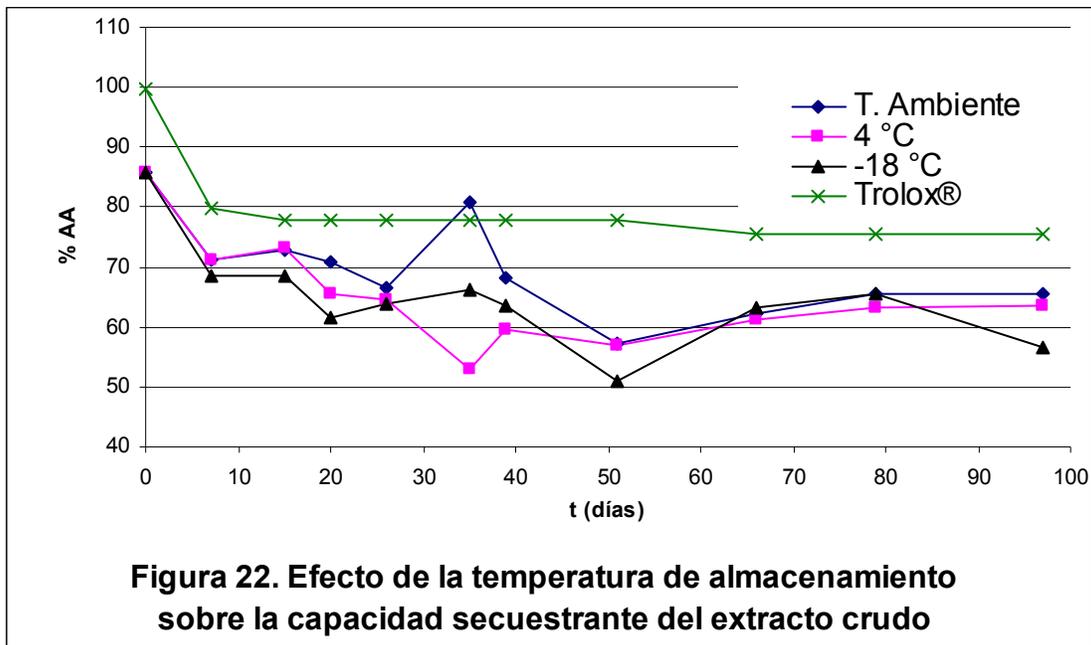


6.12.2 Determinación de la capacidad secuestrante

No se encontró diferencia significativa entre las temperaturas trabajadas en el ensayo de ABTS^{•+} (Ver Anexo 9.5 ANOVA 24) sin embargo, en los tres casos se ve una tendencia a la disminución de la CS (Figura 22). Al inicio el extracto presentó una actividad de $85.74 \pm 5.82\%$ y al final de $65.56 \pm 2.13\%$ para el almacenado a 20-25 °C, $63.59 \pm 1.34\%$ para 4 °C y $56.64 \pm 1.73\%$ en -18 °C.

Sin embargo, el tiempo utilizado no fue suficiente para concluir acerca de la duración necesaria para que el extracto pueda ser viable. Al respecto, Naithani et al. (2006) realizaron un estudio de 15 meses en donde a los cinco comenzaron a disminuir las concentraciones de polifenoles en infusiones de hierbas (tes), así como su actividad antioxidante.

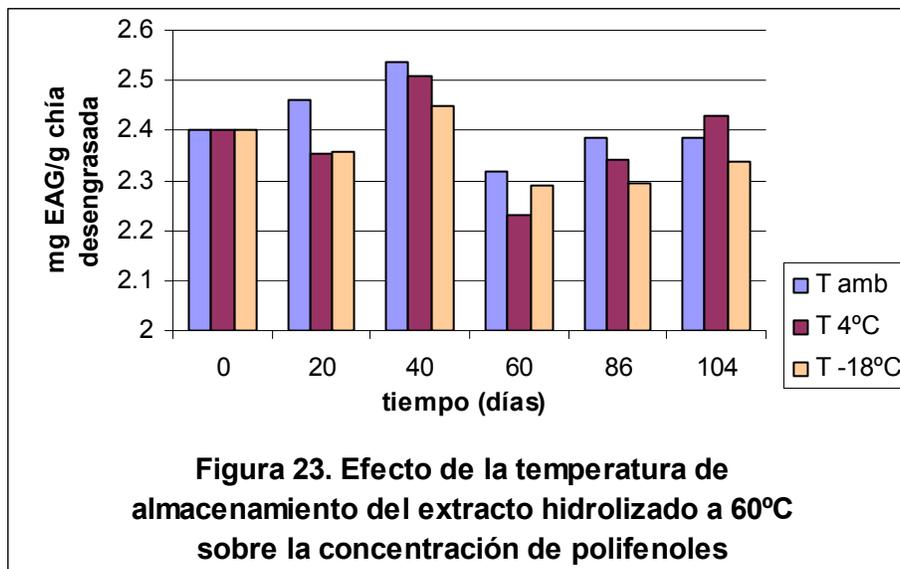
Se tomó como referencia el Trolox® que fue almacenado a -18 °C durante el tiempo de la experimentación. Este presentó un secuestro total el día cero de $99.60 \pm 0.12\%$, durante los siguientes 10 días se registró una baja continua, hasta sólo el $75.66 \pm 3.59\%$.



6.13 Extracto hidrolizado a 60 °C

6.13.1 Cuantificación total

Al término de la cinética (Figura 23) no se encontró diferencia significativa entre las tres temperaturas de almacenamiento utilizadas (Ver Anexo 9.5 ANOVA 25). Chang et al. (2006) usaron una temperatura de almacén de 40 °C y observaron que los polifenoles de frutas de hawthorn se degradaban rápidamente, mientras que a temperatura ambiente (23 °C) sólo se degradaban en un 30% después de seis meses.



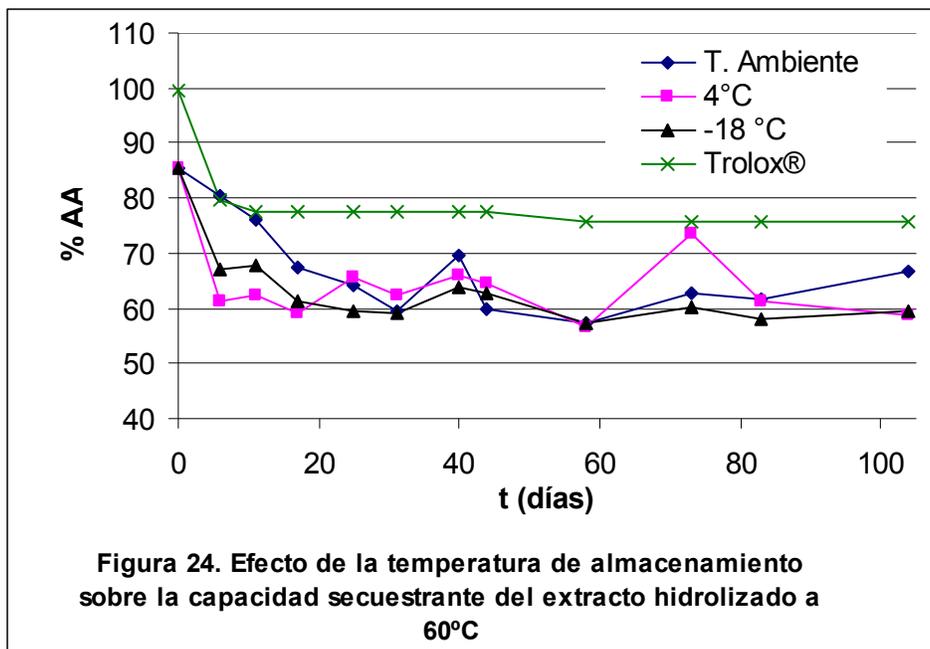
La concentración durante los primeros 46 días permaneció constante a las tres temperaturas de almacenamiento, el día 60 se registró una disminución en la concentración, permaneciendo nuevamente constante hasta el final del ensayo, aunque ligeramente menor respecto a los primeros 40 días. Al realizar el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa a lo largo de la experimentación.

6.13.2 Determinación de la capacidad secuestrante

Al disminuir la concentración de polifenoles, pudiera disminuir también la CS, por lo que se decidió realizar simultáneamente el estudio cinético de ABTS^{•+}. Se decidió esta técnica, por que utiliza menor cantidad de muestra que el ensayo con DPPH[•]. Primero se estandarizaron cada uno de los extractos a 200 ppm, conforme a los resultados obtenidos en Folin (Figura 24).

El valor inicial de la CS en el extracto fue de $85.38 \pm 0.94\%$. Se observó una disminución de las actividades en las tres temperaturas de almacenamiento los primeros 17 días, después las actividades fueron muy parecidas. No existió diferencia significativa entre las tres temperaturas de almacenamiento: ambiente ($66.61 \pm 3.83\%$), refrigeración ($58.92 \pm 3.50\%$), congelación ($59.49 \pm 1.91\%$) (Ver Anexo 9.5 ANOVA 26).

El extracto hidrolizado a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue estable en su concentración polifenólica, con una ligera disminución el día 60; sin embargo, su actividad presentó una disminución notable durante los primeros 17 días, encontrándose que el almacenado a temperatura ambiente tuvo un mayor porcentaje de CS. Este comportamiento se debió probablemente a que el solvente utilizado para disolver los polifenoles es volátil y aunque se tapó el recipiente (tapa y parafilm®) durante la toma de muestra, no se logró detener la evaporación.



6.13.3 Perfil HPLC

Al analizar los resultados (Figura 25) se puede observar que el extracto hidrolizado no presentó disminución de áreas en cada una de las especies identificadas previamente (ácido caféico, quercetina y kaempferol), no hubo diferencia significativa durante los primeros 46 días para las tres temperaturas trabajadas (ver Anexo 9.5 ANOVA 27, 28, 29); los picos que no se pudieron identificar, tampoco presentaron cambios visibles, y no se encontraron diferencias en las áreas.

Los resultados para el extracto hidrolizado de los compuestos identificados se muestran en la Tabla 12, ahí se confirma que no existe diferencia significativa en los extractos almacenados en las temperaturas establecidas.

Tabla 12. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la concentración de los polifenoles identificados por HPLC

		Temperatura de almacenamiento		
Compuesto	día	Ambiente (20 -25 °C)	Refrigeración (4 °C)	Congelación (-18 °C)
Ácido caféico (mg/mL)	0	4.95	4.95	4.95
	46	3.93	3.88	5.5
Quercetina (mg/mL)	0	5.72	5.72	5.72
	46	5.98	6.32	6.24
Kaempferol (mg/mL)	0	11.19	11.19	11.19
	46	12.02	11.89	11.86

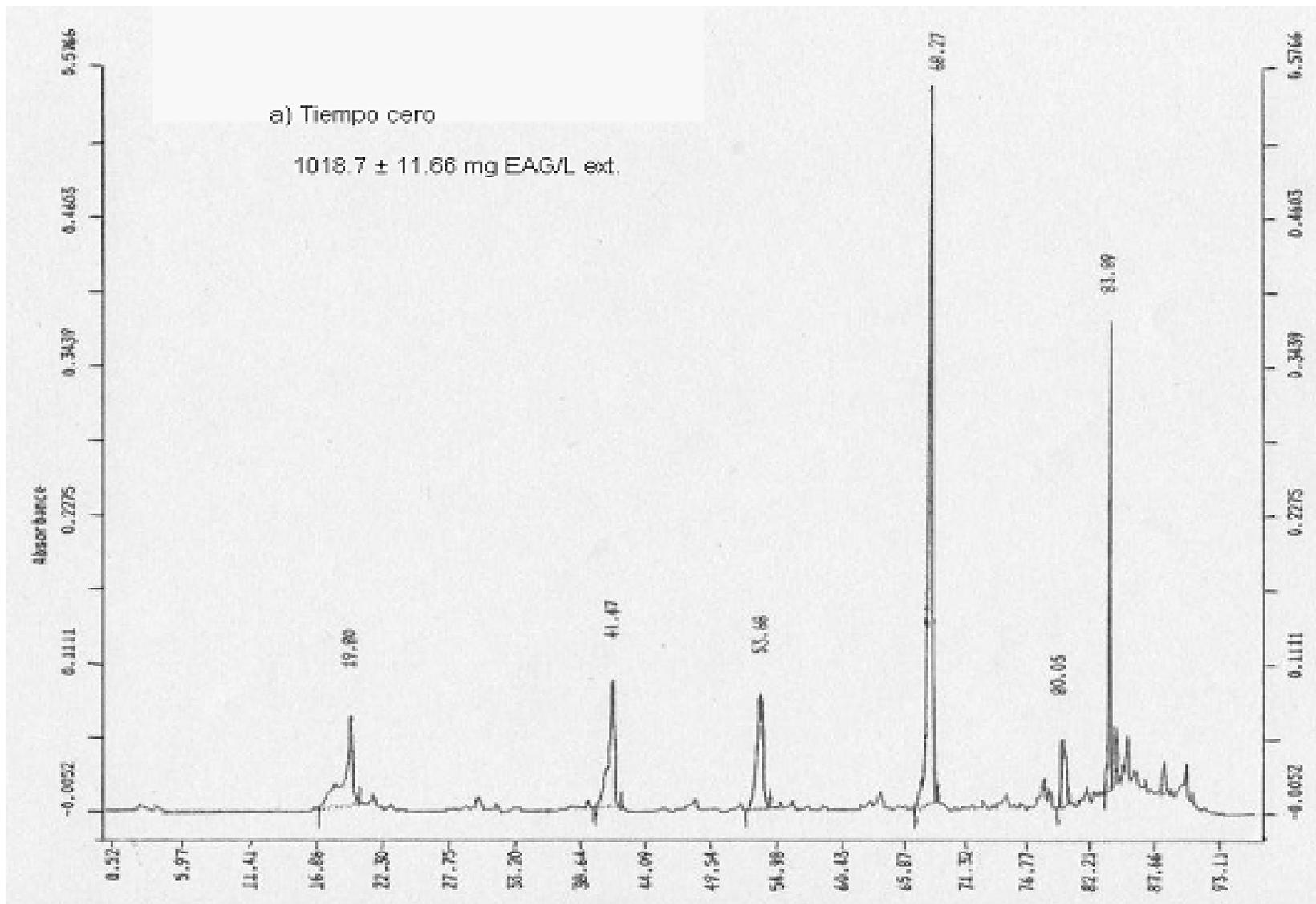


Figura 25. Cromatograma de cinética para el extracto hidrolizado. a) tiempo cero

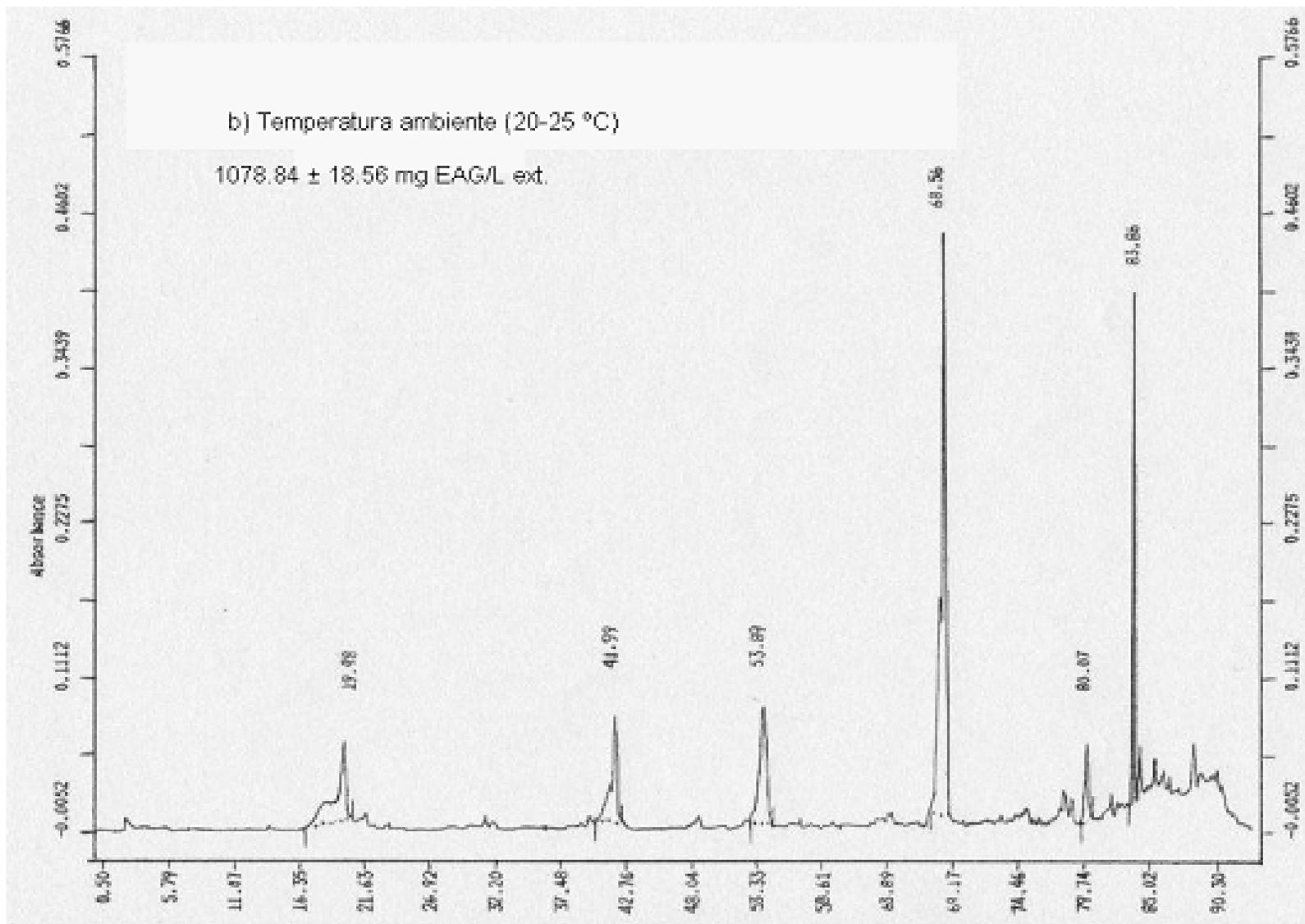


Figura 25. Cromatograma de cinética para el extracto hidrolizado. b) temperatura ambiente (20-25 °C)

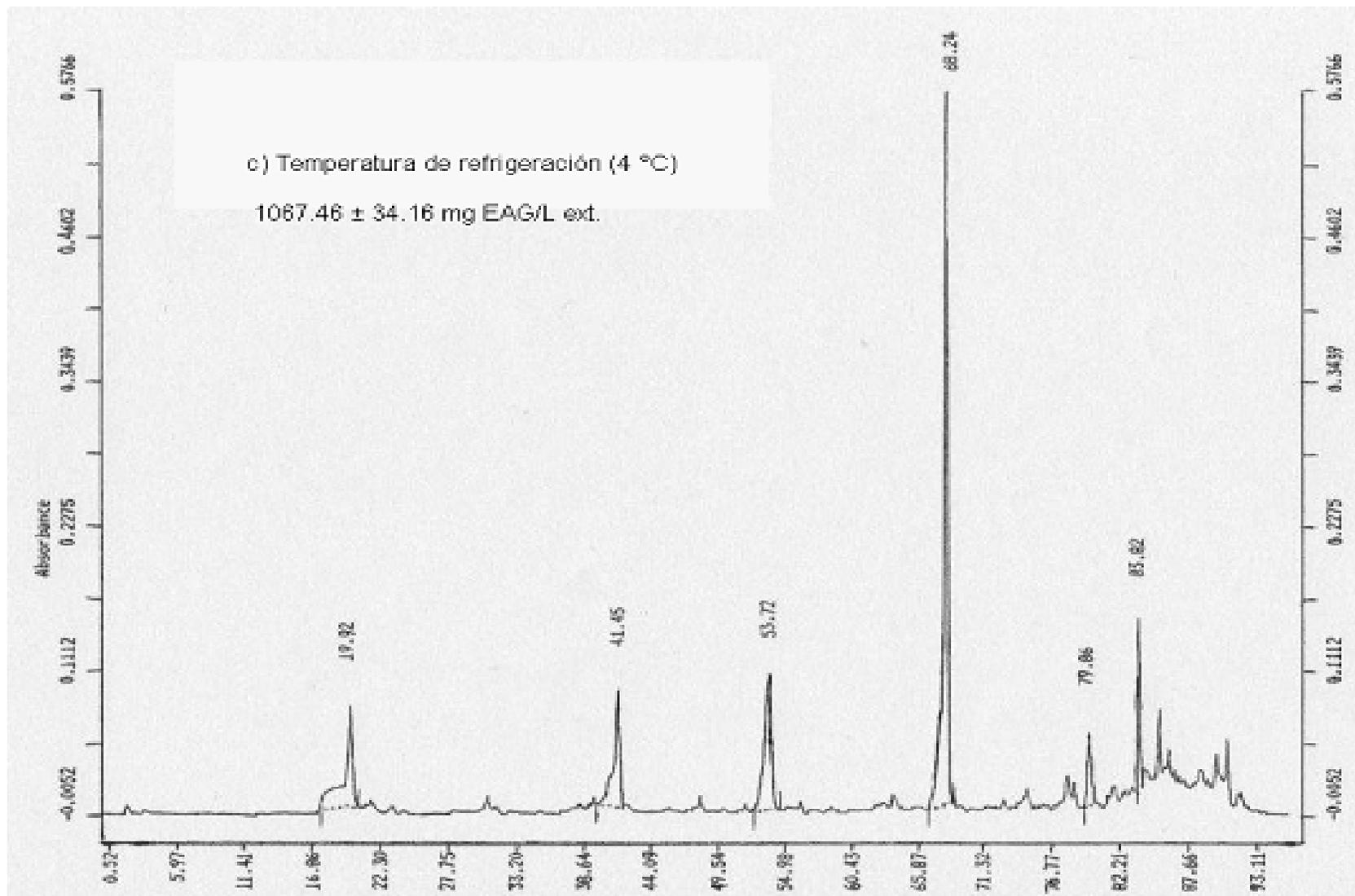


Figura 25 (Cont.). Cromatograma de cinética para el extracto hidrolizado. c) refrigeración (4 °C)

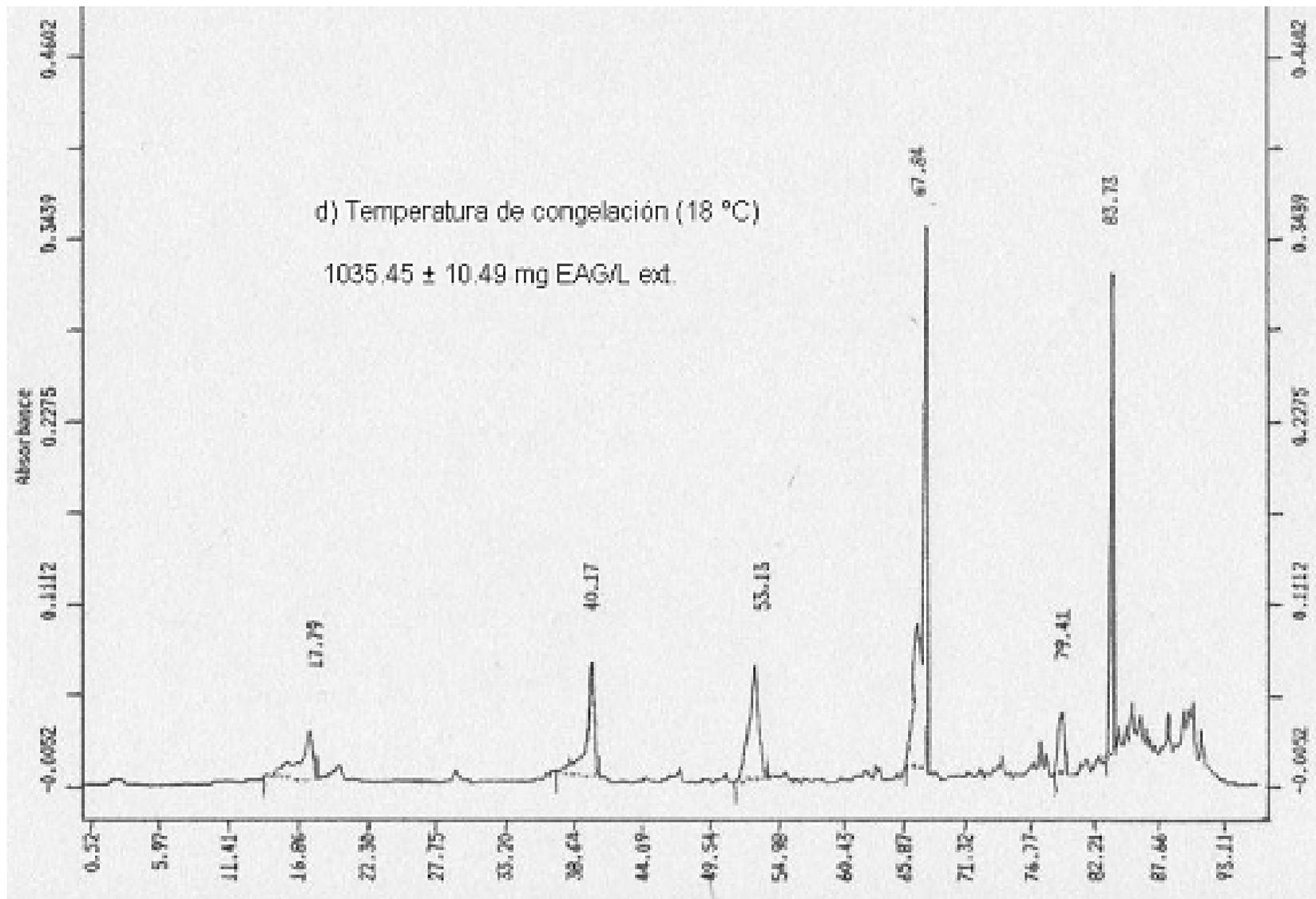


Figura 25 (Cont.). Cromatograma de cinética para el extracto hidrolizado. d) congelación (-18 °C).

7. CONCLUSIONES

Primera etapa: Efecto del uso de diferentes muestras de chía en el rendimiento y actividad durante la extracción de polifenoles

- ✓ El estudio demostró que existen diferencias en la cantidad de polifenoles contenidos en los extractos crudos analizados, que posiblemente se deben a condiciones climatológicas o de riqueza del suelo, las cuales están fuera del ámbito de este trabajo.
- ✓ La semilla de chía puede ser utilizada como una buena fuente de antioxidantes naturales, sin embargo, es necesario realizar más pruebas (como adicionarlos en alimentos para ver como lo protege) que permitan definir su calidad y eficiencia.

Segunda etapa: Efecto de la temperatura de hidrólisis en el rendimiento de los polifenoles presentes en la chía

- ✓ Realizar una extracción con calor (92 °C) y acidez (HCl 1.2 M), aumentó significativamente la concentración de los polifenoles.
- ✓ Se logró encontrar una metodología de HPLC en el que se identificó el 90.9% de los polifenoles inyectados, la desventaja fue el tiempo de corrida de 1.5 h.
- ✓ La temperatura de hidrólisis durante la extracción afectó el perfil en HPLC, encontrándose ácido caféico, quercetina y kaempferol.

Tercera etapa: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad de los polifenoles obtenidos de la chía

- ✓ La temperatura de almacenamiento no afectó de manera significativa la estabilidad de los extractos glucosilados ni aglucones.

- ✓ La capacidad secuestrante (medida con ABTS•⁺) de los extractos fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento; éste comportamiento es igual para las tres temperaturas, lo que nos indica que la temperatura no afecta la CS.

- ✓ No se pudo determinar una cinética de deterioro en los extractos debido a que el tiempo de monitoreo fue poco.

- ✓ El extracto hidrolizado a 60 °C y almacenado en la oscuridad en una temperatura de refrigeración es la forma ideal para la obtención y almacenamiento de los compuestos polifenólicos presentes en la semilla de chía por un tiempo de 100 días.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akowuah G. A., Ismail Z., Norhayati I., Sadikun A., The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity, *Food Chemistry*, 93 (2005) 311-317.
- Álvarez Chávez L. M., Identificación y Cuantificación de compuestos nutracéuticos presentes en el aceite de la semilla de chía (*Salvia hispánica*), UNAM, México D.F. 2004.
- Ayerza R., Coates W., Semillas de chía: Nueva fuente natural de ácidos grasos omega-3, antioxidantes y fibra dietética, Southwest Center for Natural Products Research & Commercialization (en línea disponible en <http://www.eatchia.com/chiasourcesp.html>; consultado el 07 de mayo de 2007).
- Belitz H. D., Grosch W., Química de los alimentos, Zaragoza: ACRIBIA SA, 1997, 237-240.
- Beltrán-Orozco, M. C., Romero, M. R., La chía, alimento milenario (en línea disponible en <http://www.alfaeditores.com/historico/alimentaria/Sep/.20Oct%202003%20La%20Chia%20Alimento%20Milenario.pdf#search='la%20ch%C3%Ada%20Alimento%20milenario'>; consultado el 08 de mayo de 2007), 3.
- Bushway A. A., Belyea R. P., Bushway R. J., Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein, *Journal of Food Science*, 46 (1981) 1349-1350.
- Cadenas, Enrique. Handbook of antioxidants. Revised & Expanded, New York: Lester Packer, 2002, 306-309.
- Chang Q., Zuo Z., Chow S. S. M., Ho K. K. W., Effect of storage on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) fruits and a hawthorn drink, *Food Chemistry*, 98 (2006) 426-430.
- Chen H. J., Ho T. C., Antioxidant Activities of Caffeic Acid and its related hydroxycinnamic acid compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (1997) 2374-2378.

- Czerwinski Jan, Bartnikowska Elzbieta, Leontowicz Hanna, Lange Ewa, Leontowicz Maria, Katrich Elena, Trakhtenberg Simon, Gorinstein Shela, Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively effect plasma lipid profile in rats fed cholesterol containing diets, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15 (2004) 622-629.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food Chemistry*, 97 (2006) 654-660.
- Earle L. R., Ingeniería de los alimentos (Las operaciones básicas del procesado de alimentos), 2ª edición, Zaragoza: ACRIBIA SA, 1998, 113-126.
- Fennema Owen R., Química de los alimentos, Madrid: ACRIBIA SA, 1993, 223-227, 239.
- Gramza A., Korczak J., Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems, *Trends in Food Science & Technology*, 16 (2005) 351-358.
- Harborne B. J., Williams A. C., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55 (2000) 481-504.
- Hiem E. K., Tagliaferro R. A., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (2002) 572-584.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agropecuarias (INIFAP), México: Informe nacional para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos, Leipzig 1996, Distrito Federal, junio 1995. pp. 15.
- James C. S., Analytical chemistry of Foods, New York: ASPEN Publication, 2000, 47-48,
- Kirk R. S., Sawyer R., Egan H., Composición y análisis de alimentos de Pearson, 2ª ed., México: CECOSA, 1996, 11-12.
- Koşar M., Dorman D. H. J., Hiltunen R., Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species, *Food Chemistry*, 91 (2005) 525-533.

- Lapornik B., Prošek M., Golc A., Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time, *Journal of Food Engineering*, 71 (2005) 214-222.
- Lotito B. S., Frei B., Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine*, 41 (2006) 1727-1746.
- Lu Y., Foo Y. L., Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*), *Food Chemistry*, 75 (2001) 197-202.
- Lu Y., Foo Y. L., Polyphenolics of *Salvia* a review, *Phytochemistry*, 59 (2002) 117-140.
- Márquez de Cantú M. J., Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas, Iztapalapa, México: Mc Graw Hill, 1991, 361-412, 558, 569-570.
- Mateo Box J. M., Leguminosas de grano, Barcelona, Salvat, 1961, 550 p.
- Matthäus B., Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseed, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 3445, 3447.
- Milliauskas G., Venskutanis P.R., Van Beek T. A., Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chemistry*, 85 (2004) 231-237.
- Montoro P., Tuberoso C. I. G., Piacente S., Perrone A., De Feo V., Cabras P., Pizza C., Stability and Antioxidant Activity of polyphenols in extract of *Myrtus communis* L. berries used for preparation of myrtle liqueur, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (2006) 1614-1619.
- Moure A., Cruz M. J., Franco D., Domínguez J. M., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M. J., Parajó J. C., Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72 (2001) 145-171.
- Naithani V., Smitha N., Kakkar P., Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content, *Food Research International*, 39 (2006) 176-181.
- Olivos Lugo B. L., Estudio de las propiedades térmicas, funcionales y nutritivas de la fracción proteínica de la semilla de chía (*Salvia hispánica*), UNAM, México. D.F. 2005.

- Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T. Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J-C., Bailleul F., Trotin F., Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour, *Journal of Ethnopharmacology*, 72 (2000) 35-42.
- Ragae S., El-Sayed M., Aal A., Noaman M., Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use, *Food Chemistry*, 98 (2006) 32-38.
- Rakic S., Povrenovic D., Tesevic V., Simic M., Malctic R., Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food, *Journal of Food Engineering*, 74 (2006) 416-423.
- Re Roberta, Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang, Rice-Evans C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (1999) 1231-1237.
- Reyes Caudillo E. La chía (*Salvia hispánica* L.): fuente de fibra dietética total con propiedades funcionales y antioxidantes, UNAM, México, D.F. 2006.
- Rice-Evans A. C., Millar J. N., Paganga G., Structure-Antioxidant Activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (1996) 933-956.
- Rice-Evans A. C., Miller J. N., Paganga G., Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2 (1997) 152-159.
- Roginsky V., Lissi A. E., Review of methods to determine Chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry*, 92 (2005) 245-249.
- Sánchez M. C., Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. Biodisponibilidad y metabolismo, *Alimentaria*, (2002)19-27.
- Siddhuraju P., Mohan P. S., Becker K., Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp, *Food Chemistry*, 79 (2002) 61-67.
- Spencer J., Abd El Mohsen M., Rice-Evans C., Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423 (2004) 148-161.

- Spigno g., De Faveri D. M., Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts, *Journal of Food Engineering*, (2006) 1-9.
- Taga S. M., Miller E. E., Pratt E. D., Chia seed as a source of natural lipid antioxidants, *Journal of American Oil Chemists Society*, 61 (1984) 928-931.
- Tsao R., Yang R., Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using HPLC, *Journal of Chromatography A*, 1018 (2003) 29-40.
- Turkmen N., Sari F., Velioglu Sedat., Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteau methods, *Food Chemistry*, (2006).
- Villaño D., Fernández-Pachón M. S., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C., The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time, *Talanta*, 64 (2004) 501-509.
- Vogels M. J., Denney C. R., Barnes D. J., Thomas M., Textbook of Quantitative Chemical Analysis, 6^a edición, Singapur, Prentice Hall, 2000, 261-283.
- Waterman G. P., Mole S., Analysis of phenolic plant metabolites, Gran Bretaña, Blackwell Scientific Publications, 1994, 2, 3, 161-167.
- <http://www.itis.gov/index.html>, base de datos en línea de *Integrated Taxonomic Information System*, consultada el 08/05/07.
- <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>, (consultada el 31 de marzo de 2008).
- <http://www.saludvida.com.ar/Contenidos/naturales/fitoter/Chia/geografiahistoria.html> (consultada el 8 de mayo de 2007).

9. ANEXO

9.1 Metodologías realizadas para la determinación del análisis proximal de las muestras

Humedad (Secado en estufa)

Pesar de 2 a 3 gramos de muestra en un pesafiltro con tapa (previamente pesado después de tenerlo a peso constante 2 h a 130 °C aprox.) Secar la muestra 2 h en estufa a 100-110 °C. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en el desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente. Repetir hasta peso constante.

Calcular el porcentaje de humedad, reportándolo como pérdida por secado a 100-110 °C.

Cenizas (Calcinación y mufla a 550 °C)

Pesar de 3 a 5 gramos de muestra en un crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente pesado, después de ponerlo a peso constante 2 h aprox. En la mufla a 600 °C. Calcinar la muestra, primeramente con un mechero en la campana hasta que no se desprendan humos y posteriormente meter a la mufla 2 h cuidando que la temperatura no pase de 550 °C. Repetir la operación anterior si es necesario, hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises, homogéneas. Enfriar en desecador y pesar.

Proteína total (Método micro-Kjeldahl)

Pesar de 0.1 – 0.2 g de muestra y se introduce en un tubo de Kjeldahl, se agregan 0.15 g de sulfato de cobre pentahidratado, 2.5 g de sulfato de potasio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. NOTA: colocarlo en un papel y realizar un blanco con todo menos la muestra.

Encender el aparato y precalentar a la temperatura de 360 °C. Colocar los tubos en el portatubos del equipo Kjeldahl y colocarlo en el bloque de calentamiento. Poner la unidad de evacuación de gases con las juntas colocadas sobre los tubos de digestión. Accionar la trampa de succión de gases antes de que se produzcan estos. Calentar

hasta total destrucción de la materia orgánica, es decir hasta que el líquido quede transparente con una coloración azul verdosa.

Una vez finalizada la digestión, sin retirar la unidad de evacuación de gases, colgar el portatubos para enfriar. (Tener la precaución de colocarlo adecuadamente, de lo contrario se podría caer).

Después de realizado el enfriamiento, terminar la digestión apagando el equipo y desconectar la trampa.

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL adicionar 50 mL de ácido bórico 4% con indicadores (fenolftaleína 0.035%, rojo de metilo 6.6%, verde de bromocresol 3.3%)

Conectar el aparato de destilación y esperar unos instantes para que se genere vapor.

Colocar el tubo de digestión con la muestra diluida y las sales disueltas en un volumen no mayor de 10 mL de agua destilada, en el aparato de destilación cuidando de introducir la alargadera hasta el fondo de la solución.

Adicionar NaOH al 36% (hasta 40 mL aproximadamente). Colocar la palanca de vapor en encendido hasta alcanzar un volumen de destilado en el matraz Erlenmeyer de 100 mL, lavar la alargadera con agua destilada, recoger el agua de lavado sobre el destilado, una vez finalizada la destilación, regresar la palanca de vapor a la posición original. Titular el exceso de ácido con una solución de HCl 0.1 N. Calcular el % de proteína con el factor de conversión 6.25

Extracto etéreo (Método Soxhlet)

Colocar a peso constante un matraz bola de fondo plano con perlas o piedras de ebullición en la estufa a 100 °C, aproximadamente 2 h.

Pesar de 4 a 5 gramos de muestra sobre un papel, enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con un algodón (No apretar el algodón contra la muestra) y colocar el cartucho en el extractor.

Conectar el matraz al extractor, en que se debe encontrar el cartucho con la muestra y este al refrigerante. (No poner grasa en las juntas). Agregar dos cargas del disolvente (hexano) por el refrigerante y calentar el matraz con parrilla a ebullición suave. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, dejar caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

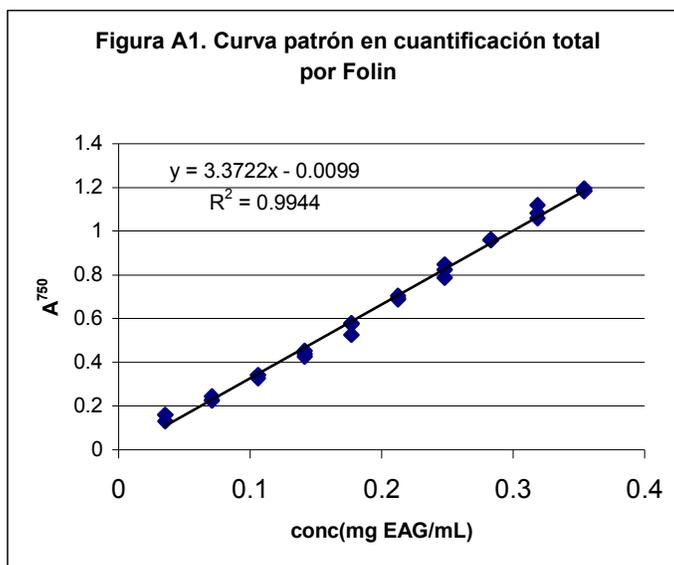
Una vez extraída toda la grasa, quitar el cartucho con la muestra desengrasada, seguir calentando hasta casi total eliminación del disolvente, recuperándolo antes de que se descargue. Quitar el matraz y secar el extracto en estufa a 100 °C por 30 minutos, enfriar y pesar. Calcular el porcentaje de grasa.

9.2 Curvas patrón utilizadas para los métodos espectrofotométricos

Curva patrón para Folin-Ciocalteu (Polifenoles totales), medida con una solución alcohólica de ácido gálico 0.354 mg/mL

Tabla A1. Absorbancias para la curva patrón

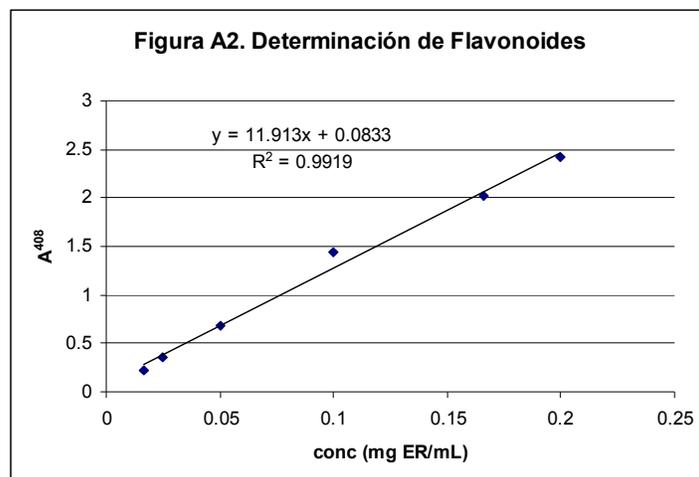
Concentración (mg/mL)	A ⁷⁵⁰
0.0354	0.1607
0.0354	0.1604
0.0354	0.1305
0.0708	0.2444
0.0708	0.2288
0.0708	0.2262
0.1062	0.3404
0.1062	0.3416
0.1062	0.3277
0.1416	0.4379
0.1416	0.4530
0.1416	0.4270
0.1770	0.5729
0.1770	0.5777
0.1770	0.5267
0.2124	0.6890
0.2124	0.7046
0.2124	0.6924
0.2478	0.7865
0.2478	0.8235
0.2478	0.8466
0.2832	0.9622
0.2832	0.9587
0.2832	0.9596
0.3186	1.0838
0.3186	1.1192
0.3186	1.0594
0.3540	1.1840
0.3540	1.1824
0.3540	1.1932



Curva patrón para la determinación de flavonoides con una solución etanólica del glucósido rutina 0.3 mg/mL

Tabla A2. Absorbancias para la curva patrón

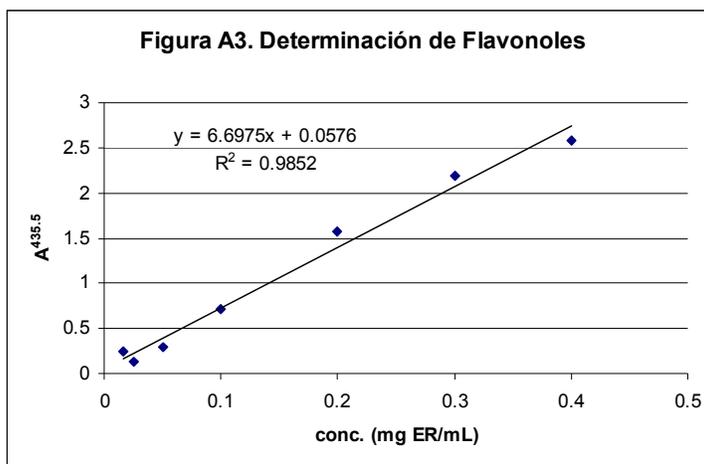
Concentración (mg/mL)	A ⁴⁰⁸
0.0166	0.2373
0.0166	0.2135
0.0166	0.2187
0.0250	0.3481
0.0250	0.3594
0.0250	0.3424
0.0500	0.6809
0.0500	0.6996
0.0500	0.6817
0.1000	1.4545
0.1000	1.4121
0.1000	1.4424
0.1660	1.9693
0.1660	2.0515
0.1660	2.0417
0.2000	2.3960
0.2000	2.4317
0.2000	2.4466
0.3000	2.6626
0.3000	2.6698
0.3000	2.6616



Curva patrón para la determinación de flavonoles con una solución etanólica del glucósido rutina 0.4 mg/mL

Tabla A3. Absorbancias para al curva patrón

Concentración (mg/mL)	A ^{435.5}
0.0166	0.1654
0.0166	0.2947
0.0166	0.2850
0.0250	0.1445
0.0250	0.1240
0.0250	0.1351
0.0500	0.3320
0.0500	0.3501
0.0500	0.1878
0.1000	0.6970
0.1000	0.7046
0.1000	0.7208
0.2000	1.5495
0.2000	1.5481
0.2000	1.6023
0.3000	2.1080
0.3000	2.2378
0.3000	2.1976
0.4000	2.5263
0.4000	2.6127
0.4000	2.6200



9.3 Gradientes utilizados en el ensayo de HPLC

Tabla A4. Gradiente 1: tiempo de corrida 76 minutos

TIEMPO (MIN)	% ÁCIDO FÓRMICO	% ACETONITRILO
0	95	5
1	95	5
21	85	15
26	70	30
56	50	50
66	0	100
76	95	5

Tabla A5. Gradiente 2: tiempo de corrida 56 minutos

TIEMPO (MIN)	% ÁCIDO FÓRMICO	% ACETONITRILO
0	95	5
1	95	5
21	85	15
26	70	30
36	50	50
46	0	100

Tabla A6: Gradiente 3: tiempo de corrida 81 minutos

TIEMPO (MIN)	% ÁCIDO FÓRMICO	% ACETONITRILO
0	100	0
1	100	0
46	85	15
61	70	30
66	50	50
71	0	100
81	100	0

Tabla A7. Gradiente 4: tiempo de corrida 96 minutos

TIEMPO (MIN)	% ÁCIDO FÓRMICO	% ACETONITRILO
0	100	0
1	100	0
46	85	15
76	70	30
61	50	50
86	0	100
96	100	0

9.4 Resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los extractos crudo e hidrolizado

Tabla A8. Cuantificación total de polifenoles en el extracto crudo Central.

t (días)	[Polifenoles totales] mg EAG/g chía desengrasada		
	T. Ambiente	4 °C	-18°C
0	0.71	0.71	0.71
5	0.62	0.56	0.57
7	0.64	0.59	0.59
12	0.69	0.60	0.61
14	0.62	0.60	0.57
16	0.62	0.60	0.58
19	0.63	0.60	0.59
26	0.62	0.59	0.60
34	0.63	0.62	0.62
40	0.65	0.62	0.64
54	0.60	0.56	0.56
69	0.62	0.58	0.59
80	0.61	0.58	0.57
98	0.64	0.62	0.62

Tabla A9. Determinación de la capacidad secuestrante en el extracto crudo Central

t (días)	T. Ambiente	% CS		
		4 °C	-18 °C	Trolox
0	85.74	85.74	85.74	99.6
7	71.1	71.34	68.68	79.85
15	72.96	73.09	68.58	77.7
20	70.82	65.39	61.64	77.7
26	66.57	64.68	63.8	77.7
35	80.82	52.97	66.37	77.7
39	68.22	59.54	63.65	77.7
51	57.36	56.95	50.88	77.7
66	62.11	61.24	63.14	75.66
79	65.43	63.16	65.38	75.66
97	65.56	63.59	56.64	75.66

Tabla A10. Cuantificación total de polifenoles en el extracto hidrolizado a 60 °C de la semilla Central

t (días)	[Polifenoles totales] mg EAG/ g chía desengrasada		
	T. Amb.	4 °C	-18 °C
0	2.40	2.41	2.40
6	2.45	2.43	2.41
11	2.54	2.52	2.44
13	2.50	2.51	2.36
18	2.60	2.44	2.47
20	2.46	2.35	2.36
22	2.57	2.42	2.48
25	2.62	2.54	2.55
32	2.54	2.53	2.41
40	2.53	2.51	2.45
46	2.54	2.50	2.53
60	2.32	2.23	2.29
75	2.44	2.33	2.35
86	2.38	2.34	2.29
104	2.39	2.43	2.34

Tabla A11. Determinación de la capacidad secuestrante en el extracto hidrolizado a 60 °C de la semilla de chía Central

t (días)	T. Ambiente	% CS		
		4 °C	-18 °C	Trolox
0	85.38	85.38	85.38	99.6
6	80.24	61.20	66.90	79.85
11	76.19	62.48	67.89	77.70
17	67.43	59.30	61.46	77.70
25	64.23	65.45	59.49	77.70
31	59.35	62.30	59.23	77.70
40	69.51	66.07	63.84	77.70
44	59.96	64.64	62.66	77.70
58	57.49	56.73	57.48	75.66
73	62.63	73.44	60.38	75.66
83	61.60	61.25	58.13	75.66
104	66.61	58.92	59.49	75.66

9.5 Análisis de varianza (ANOVA) realizadas

Primera etapa: Efecto del uso de diferentes muestras de chía en el rendimiento y actividad durante la extracción de polifenoles

1. Diferencia en Humedad para las cinco semillas de chía utilizadas.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	4	1.2573	0.3143	14.7189	3.63
Dentro de tratamientos	9	0.1922	0.0216		
Total	13	1.4495			

Existe diferencia significativa entre las semillas de chía utilizadas.

A. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales.

raíz = 0.0924

$t_{\text{student}} = 1.8331$

valor de DMS = 0.1694

	Sinaloa	Central	Portales	Nopalera	Iztapalapa
Sinaloa	nd	0.7167	0.0300	0.4833	0.5767
Central	nd	nd	0.7467	0.2333	0.1400
Portales	nd	nd	nd	0.51333	0.6067
Nopalera	nd	nd	nd	nd	0.0933
Iztapalapa	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

2. Diferencia en Cenizas para las cinco semillas de chía utilizadas. (de la tabla 3)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	4	1.6521	0.4130	481.4308	3.48
Dentro de tratamientos	10	0.0086	0.0008		
Total	14	1.6607			

Existe diferencia significativa entre las semillas de chía utilizadas

B. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales.

raíz = 0.0185

$t_{\text{student}} = 1.8125$

valor de DMS = 0.0337

	Sinaloa	Central	Portales	Nopalera	Iztapalapa
Sinaloa	nd	0.0699	0.0242	0.4506	0.5852
Central	nd	nd	0.04569	0.3807	0.6551
Portales	nd	nd	nd	0.4264	0.6094
Nopalera	nd	nd	nd	nd	1.0358
Iztapalapa	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

3. Diferencia en Proteína para las cinco semillas de chía utilizadas. (de la tabla 3)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	4	577.2032	144.3008	834.5257	3.48
Dentro de tratamientos	9	1.5562	0.1729		
Total	13	578.7594			

Existe diferencia significativa entre las semillas de chía utilizadas

C. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.2630 $t_{\text{student}} = 1.8125$ valor de DMS = 0.4767

	Sinaloa	Central	Portales	Nopalera	Iztapalapa
Sinaloa	nd	2.3638	16.3197	4.0446	12.8708
Central	nd	nd	13.9559	1.6808	10.5069
Portales	nd	nd	nd	12.2751	3.4489
Nopalera	nd	nd	nd	nd	8.8261
Iztapalapa	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

4. Diferencia en Grasa para las cinco semillas de chía utilizadas. (de la tabla 3)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	4	10.3081	2.5770	0.2266	4.12
Dentro de tratamientos	7	79.6112	11.3730		
Total	11	89.9193			

No existe diferencia significativa entre las semillas de chía utilizadas

5. Diferencia en el rendimiento del extracto crudo para las cinco semillas de chía.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	4	17.4170	4.3543	112.8241	3.48
Dentro de tratamientos	10	0.3859	0.0386		
Total	14	17.8030			

Existe diferencia significativa entre los rendimientos del extracto crudo

D. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.1243

$t_{\text{student}} = 1.8125$

valor de DMS = 0.2252

	Sinaloa	Central	Portales	Nopalera	Iztapalapa
Sinaloa	nd	1.94	0.4433	0.8100	1.1067
Central	nd	nd	2.3833	2.7500	3.0467
Portales	nd	nd	nd	0.3667	0.6633
Nopalera	nd	nd	nd	nd	0.2967
Iztapalapa	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

6. Diferencia en la cuantificación espectrofotométrica de los polifenoles en los cinco extractos crudos. (tabla 4)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	5	1.1795	0.2359	375.1972	3.03
Dentro de tratamientos	10	0.0063	0.0006		
Total	15	1.1858			

Existe diferencia significativa entre la concentración de polifenoles en los 5 extractos

E. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.0108

$t_{\text{student}} = 1.7823$

DMS = 0.0192

	Crudo	Portales	Nopalera	Iztapalapa	Sinaloa
Crudo	nd	0.4297	0.5649	0.5784	0.0306
Portales	nd	nd	0.1352	0.1486	0.4603
Nopalera	nd	nd	nd	0.0135	0.5955
Iztapalapa	nd	nd	nd	nd	0.6090
Sinaloa	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

7. Diferencia en la cuantificación espectrofotométrica de flavonoides de los extractos crudos. (tabla 4)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	5	0.0013	0.0003	910.3655	3.69
Dentro de tratamientos	8	2.34×10^{-6}	2.93×10^{-7}		
Total	13	0.0013			

Existe diferencia significativa entre los flavonoides de los extractos crudos

F. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.0002

$t_{\text{student}} = 1.8595$

DMS = 0.0004

	Portales	Nopalera	Iztapalapa	Sinaloa	Central
Portales	nd	0.0227	0.0237	0.0049	0.0146
Nopalera	nd	nd	0.0009	0.0178	0.0081
Iztapalapa	nd	nd	nd	0.0187	0.0090
Sinaloa	nd	nd	nd	nd	0.0097
Central	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

8. Diferencia en la cuantificación espectrofotométrica de flavonoles de los extractos crudos.

(tabla 4)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	5	0.0008	0.0002	783.1993	3.2
Dentro de tratamientos	8	1.69×10^{-6}	2.11×10^{-7}		
Total	13	0.0008			

Existe diferencia significativa en la concentración de flavonoles en los extractos

G. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.0002

$t_{\text{student}} = 1.7939$

DMS = 0.0003

	Portales	Nopalera	Iztapalapa	Sinaloa	Central
Portales	nd	0.0106	0.0105	0.0083	0.0050
Nopalera	nd	nd	0.0001	0.0189	0.0156
Iztapalapa	nd	nd	nd	0.0188	0.0155
Sinaloa	nd	nd	nd	nd	0.0033
Central	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

9. Diferencia en la capacidad secuestrante para los extractos crudos con DPPH•. (tabla 5)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	4	33484.5525	8371.1381	7624.9776	3.63
Error	9	9.8807	1.0978		
Total	13	33494.4332			

Existe diferencia significativa entre la capacidad secuestrante de los extractos

H. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.6627

$t_{\text{student}} = 1.8331$

DMS = 1.2147

	Trolox	Quercetina	Sinaloa	Central	Portales
Trolox	nd	1.7867	2.3900	6.4883	27.4367
Quercetina	nd	nd	0.6033	4.7017	25.6500
Sinaloa	nd	nd	nd	4.0983	25.0467
Central	nd	nd	nd	nd	20.9483
Portales	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

10. Diferencia en la capacidad secuestrante para los extractos crudos con ABTS^{•+}. (tabla 5)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	4	232.6236	58.1559	16.1457	3.26
Error	12	43.2232	3.6019		
Total	16	275.8468			

Existe diferencia significativa entre la capacidad secuestrante de los extractos utilizados

I. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 1.2003

$t_{\text{student}} = 1.7823$

DMS = 2.1393

	Trolox	Quercetina	Sinaloa	Central	Portales
Trolox	nd	0.0250	0.4067	0.5200	9.6933
Quercetina	nd	nd	0.3817	0.5450	9.7183
Sinaloa	nd	nd	nd	0.9267	10.1000
Central	nd	nd	nd	nd	9.1733
Portales	nd	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

11. Diferencia en el rendimiento del extracto hidrolizado de Sinaloa y Central.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	1	1.2150	1.2150	69.6275	7.71
Dentro de tratamientos	4	0.0698	0.0174		
Total	5	1.2848			

Existe diferencia significativa entre los rendimientos del extracto hidrolizado

12. Diferencia en la cuantificación de polifenoles totales en los extractos hidrolizados Central y Sinaloa. (tabla 8)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	1	0.0007	0.0007	0.6944	7.71
Dentro de tratamientos	4	0.0041	0.0010		
Total	5	0.0048			

No existe diferencia significativa entre los extractos de Sinaloa y Central

13. Diferencia en la cuantificación de flavonoides de los extractos hidrolizados Central y Sinaloa. (tabla 8)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	1	0.00044	0.0004	77.8091	7.71
Dentro de tratamientos	4	2.07×10^{-5}	5.18×10^{-6}		
Total	5	0.0004			

Existe diferencia significativa entre los flavonoides Sinaloa y Central

Segunda etapa: Efecto de la temperatura de hidrólisis en el rendimiento de los polifenoles presentes en la chía

14. Diferencia en la cuantificación de flavonoles de los extractos hidrolizados Central y Sinaloa. (tabla 8)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	1	3.04×10^{-5}	3.04×10^{-5}	0.3465	7.71
Dentro de tratamientos	4	0.0004	8.77×10^{-5}		
Total	5	0.0004			

No existe diferencia significativa entre los flavonoles Sinaloa y Central

15. Diferencia en la capacidad secuestrante para los extractos hidrolizados con DPPH.
(tabla 9)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	3	7.6739	2.5580	4.1053	4.07
Error	8	4.9847	0.6231		
Total	11	12.6586			

Existe diferencia significativa entre la capacidad secuestrante de los extractos hidrolizados

J. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.5582

$t_{\text{student}} = 1.8595$

DMS = 1.0379

	Trolox	Quercetina	Sinaloa	Central
Trolox	nd	1.7867	1.3433	2.0933
Quercetina	nd	nd	0.4433	0.3063
Sinaloa	nd	nd	nd	0.7500
Central	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

16. Diferencia en la capacidad secuestrante para los extractos hidrolizados con ABTS^{•+}.
(tabla 9)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	3	511.9332	170.6444	169.7701	3.71
Error	10	10.0515	1.0051		
Total	13	521.9847			

Existe diferencia significativa entre la capacidad secuestrante de los extractos hidrolizados

K. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.7089

$t_{\text{student}} = 1.8125$

DMS = 1.2849

	Trolox	Quercetina	Sinaloa	Central
Trolox	nd	0.0250	10.1600	13.7800
Quercetina	nd	nd	10.1850	13.8050
Sinaloa	nd	nd	nd	3.6200
Central	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

17. Diferencia en el rendimiento del extracto hidrolizado a 60 °C y 92 °C.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	1	0.0006	0.0006	0.2667	7.71
Dentro de tratamientos	4	0.0090	0.0022		
Total	5	0.0096			

No existe diferencia significativa entre los rendimientos del extracto hidrolizado

18. Diferencia en la cuantificación total por Folin de los extractos hidrolizados a diferentes temperaturas. (tabla 10)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	1	0.2152	0.2152	118.6527	7.71
Dentro de tratamientos	4	0.0073	0.0018		
Total	5	0.2225			

Existe diferencia significativa entre las dos Temperaturas utilizadas en la extracción

19. Diferencia en la cuantificación de flavonoides en los extractos hidrolizados a diferentes temperaturas. (tabla 10)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	1	7.35×10^{-7}	7.35×10^{-7}	0.0195	7.71
Dentro de tratamientos	4	1.51×10^{-4}	3.77×10^{-5}		
Total	5	1.51×10^{-4}			

No existe diferencia significativa en la concentración de flavonoides a dos temperaturas

20. Diferencia en la cuantificación de flavonoles en los extractos hidrolizados a diferentes temperaturas. (tabla 10)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Entre tratamientos	1	0.0105	0.0105	50.6496	7.71
Dentro de tratamientos	4	0.0008	0.0002		
Total	5	0.0113			

Existe diferencia significativa entre la concentración de flavonoles a dos temperaturas

21. Diferencia en la capacidad secuestrante para los extractos hidrolizados a diferentes temperaturas con DPPH•. (tabla 11)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	3	1023.3652	341.1217	606.3039	4.07
Error	8	4.5010	0.5626		
Total	11	1027.8662			

Existe diferencia significativa entre la CS de los extractos

L. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.5304

$t_{\text{student}} = 1.8595$

DMS = 0.9862

	Trolox	Quercetina	60°C	92°C
Trolox	nd	1.7867	22.5400	2.0933
Quercetina	nd	nd	20.7533	0.3067
60°C	nd	nd	nd	20.4467
92°C	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

22. Diferencia en la capacidad secuestrante para los extractos hidrolizados a diferentes temperaturas con ABTS•+. (tabla 11)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	3	0.5869	0.1956	4.3518	3.49
Error	12	0.5395	0.0450		
Total	15	1.1264			

Existe diferencia significativa entre la CS de los extractos

M. Prueba de DMS para ver las muestras estadísticamente iguales

raíz = 0.1499

$t_{\text{student}} = 1.7823$

DMS = 0.2672

	Trolox	Quercetina	92 °C	60 °C
Trolox	nd	0.0250	0.4425	0.2450
Quercetina	nd	nd	0.4675	0.2700
92°C	nd	nd	nd	0.1975
60°C	nd	nd	nd	nd

nd: No Determinado

Muestras estadísticamente iguales

Tercera etapa: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad de los polifenoles obtenidos de la chía

23. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la cuantificación de los polifenoles totales en el extracto crudo Central.

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	2	0.0075	0.0038	2.7084	3.23
Error	39	0.0542	0.0014		
Total	41	0.06174			

No existe diferencia significativa entre las Temperaturas de almacenamiento

24. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la capacidad secuestrante del extracto crudo Central.

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	2	155.6052	77.8026	1.0648	3.23
Error	30	2192.0364	73.0679		
Total	32	2347.6416			

No existe diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento

25. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la cuantificación de polifenoles totales en el extracto hidrolizado a 60 °C de la semilla de chía Central.

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	2	0.0458	0.0229	2.8344	3.23
Error	42	0.3398	0.0081		
Total	44	0.3856			

No existe diferencia significativa entre las Temperaturas de almacenamiento

26. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la capacidad secuestrante del extracto hidrolizado a 60 °C Central.

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	2	101.9840	50.9920	0.7783	3.23
Error	33	2162.1373	65.5193		
Total	35	2264.1213			

No existe diferencia significativa entre las Temperaturas de almacenamiento

27. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la cuantificación de ácido caféico por medio de HPLC. (Tabla 12)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	2	0.9732	0.4867	2.1103	3.63
Error	16	3.6894	0.2305		
Total	18	4.6626			

No existe diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento

28. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la cuantificación de quercetina por HPLC. (tabla 12)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	2	0.14479	0.0724	1.8268	3.63
Error	16	0.6338	0.0396		
Total	18	0.7785			

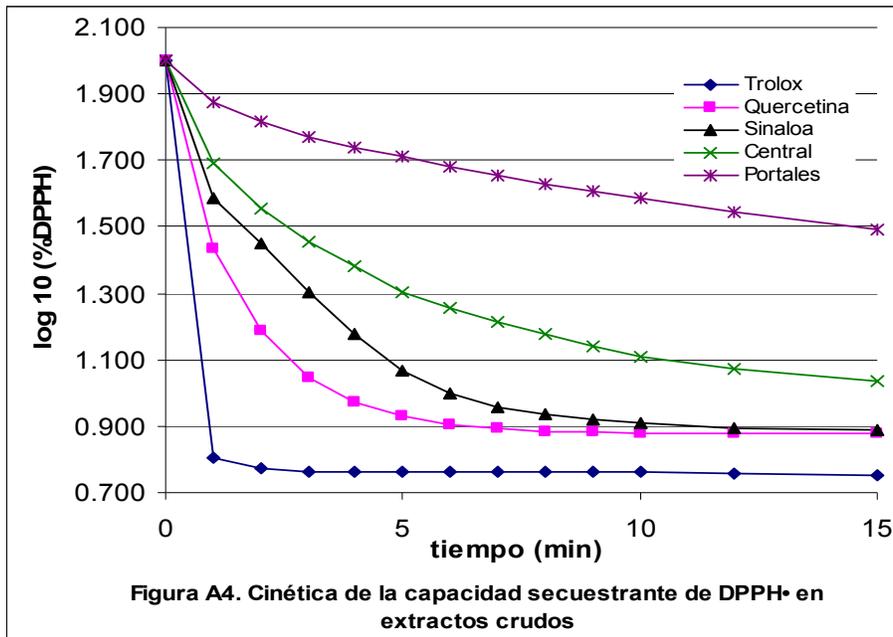
No existe diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento

29. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la cuantificación de kaempferol por HPLC. (tabla 12)

Fuente de Variación	G. L.	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F calc.	F teórica
Tratamiento	2	0.0277	0.0139	0.1265	3.63
Error	16	1.7530	0.1096		
Total	18	1.7808			

No existe diferencia significativa entre las temperaturas de almacenamiento

9.6 Figuras de la capacidad secuestrante (DPPH•, ABTS•⁺) en extractos.



Esta viene de la figura 12.

Pendientes obtenidas para la Figura A4 de acuerdo a la ecuación $y = mx + b$ donde:

y: $\log_{10} (\% \text{DPPH}\cdot)$

m: pendiente = Velocidad

x: \log_{10} tiempo (\log_{10} tiempo) (min)

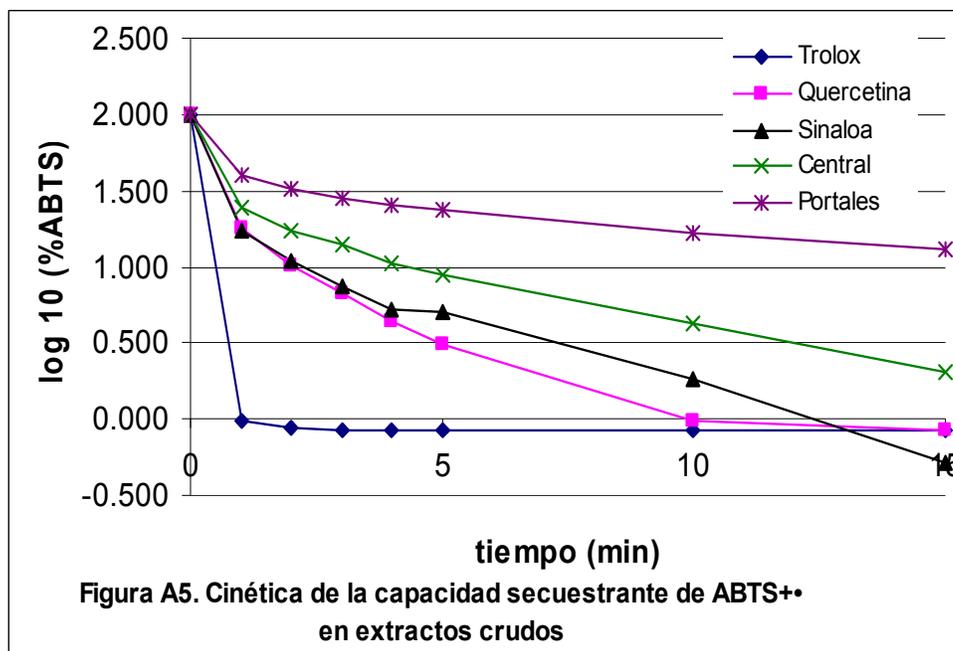
b: ordenada al origen (% DPPH•)

R²: Coeficiente de variación

Tabla A12. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la Figura A4.

	Trolox®	Quercetina	Sinaloa	Central	Portales
m*	-0.0023	-0.0296	-0.0482	-0.0453	-0.0264
Int	0.7826	1.1839	1.4194	1.5919	1.8562
R ²	0.5193	0.8143	0.9680	0.9623	0.9780

* Pendientes obtenidas sin el primer valor (tiempo cero)



Esta viene de la figura 13

Pendientes obtenidas para la Figura A5 de acuerdo a la ecuación $y = mx + b$ donde:

y: $\log_{10} (\% \text{DPPH}\cdot)$

m: pendiente = Velocidad

x: \log_{10} tiempo (\log_{10} tiempo) (min)

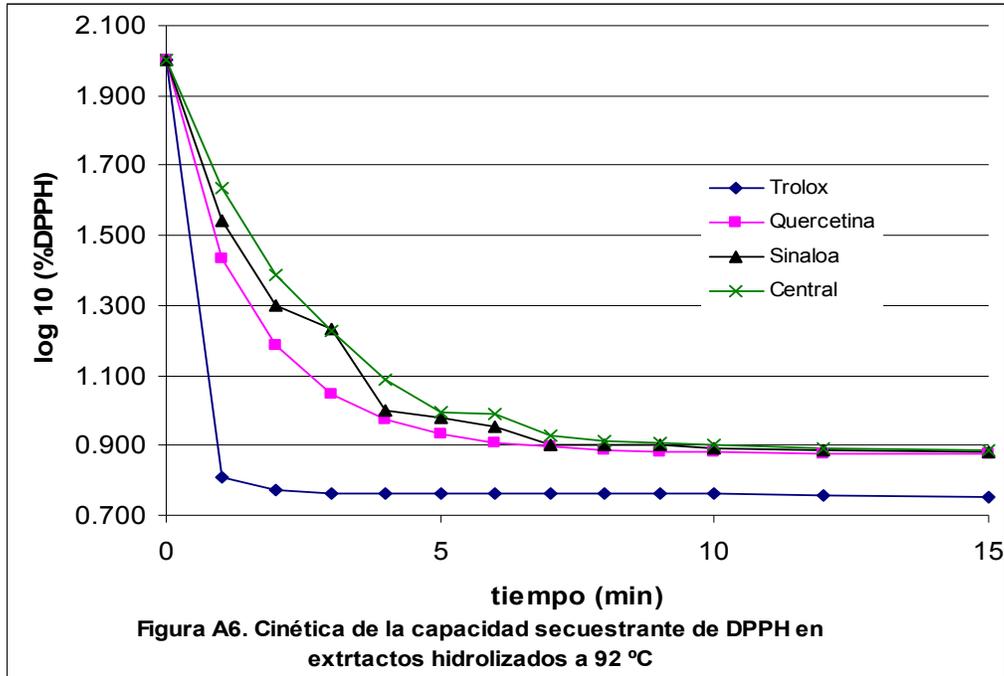
b: ordenada al origen (% DPPH•)

R2: Coeficiente de variación

Tabla A13. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la Figura A5.

	Trolox®	Quercetina	Sinaloa	Central	Portales
m*	-0.0028	-0.0933	-0.1013	-0.0730	-0.0316
b	-0.0509	1.1233	1.2259	1.3746	1.5616
R2	0.3486	0.8829	0.9815	0.9818	0.9476

* Pendientes obtenidas sin el valor de tiempo cero



Esta viene de la figura 16.

Pendientes obtenidas para la Figura A6 de acuerdo a la ecuación $y = mx + b$ donde:

y: $\log_{10} (\% \text{DPPH} \bullet)$

m: pendiente = Velocidad

x: \log_{10} tiempo (\log_{10} tiempo) (min)

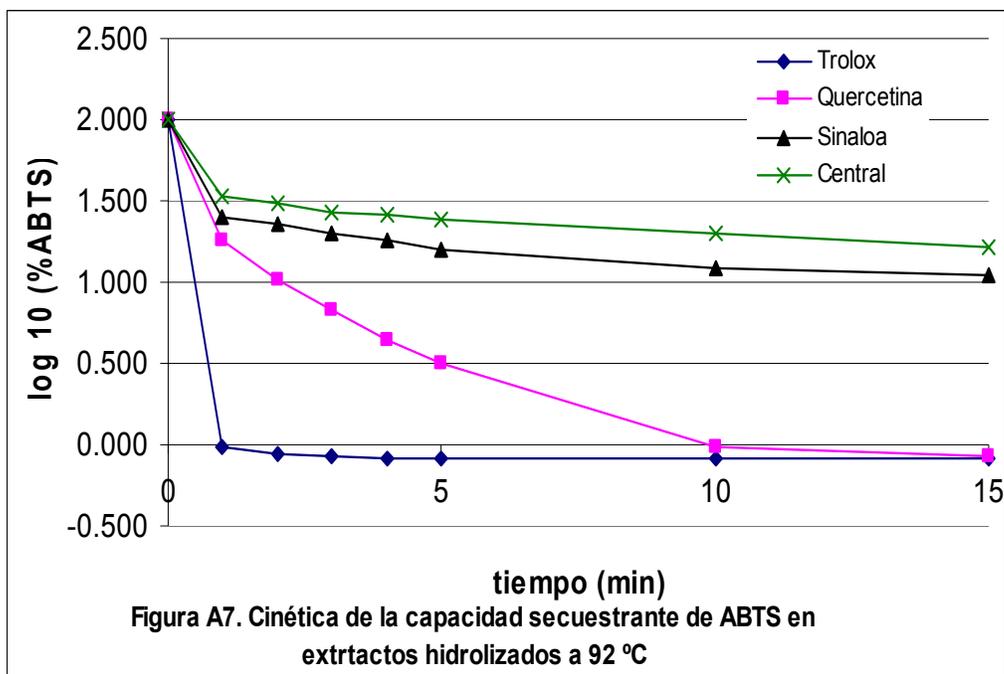
b: ordenada al origen (% DPPH•)

R2: Coeficiente de variación

Tabla A14. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la Figura A6.

	Trolox®	Quercetina	Sinaloa	Central
m*	-0.0025	-0.0399	-0.0524	-0.0599
Int	0.7836	1.2335	1.3640	1.4431
R2	0.4368	0.6281	0.7016	0.7331

* Pendientes obtenidas sin el valor de tiempo cero y quince min.



Esta viene de la figura 17

Pendientes obtenidas para la Figura A7 de acuerdo a la ecuación $y = mx + b$ donde:

y: $\log_{10} (\% \text{DPPH}\cdot)$

m: pendiente = Velocidad

x: \log_{10} tiempo (\log_{10} tiempo) (min)

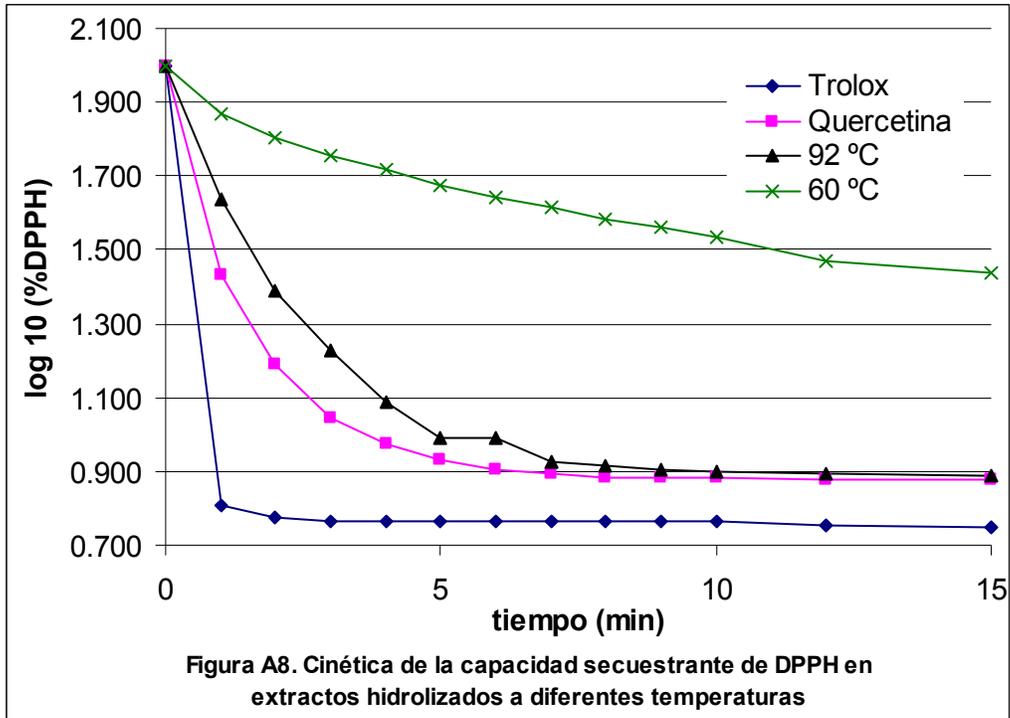
b: ordenada al origen (% DPPH \cdot)

R2: Coeficiente de variación

Tabla A15. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la Figura A7.

	Trolox®	Quercetina	Sinaloa	Central
m*	-0.0053	-0.1359	-0.0355	-0.0237
Int	-0.0425	1.2675	1.4145	1.5221
R2	0.4511	0.9634	0.9624	0.9338

* Pendientes obtenidas sin los valores de tiempo cero y quince min.



Esta viene de la figura 19.

Pendientes obtenidas para la Figura A8 de acuerdo a la ecuación $y = mx + b$ donde:

y: $\log_{10} (\%DPPH\bullet)$

m: pendiente = Velocidad

x: \log_{10} tiempo (\log_{10} tiempo) (min)

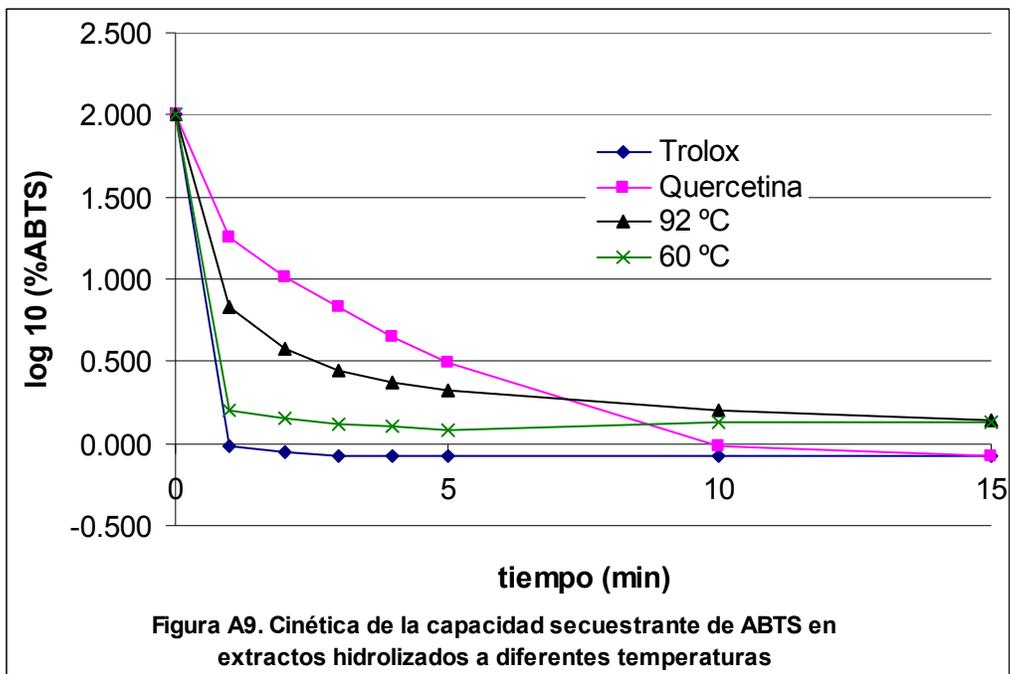
b: ordenada al origen (% DPPH•)

R²: Coeficiente de variación

Tabla A16. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la Figura A8.

	Trolox®	Quercetina	92 °C	60 °C
m*	-0.0025	-0.0399	-0.0599	-0.0347
Int	0.7836	1.2335	1.4431	1.8685
R ²	0.4368	0.6281	0.7331	0.9790

* Pendientes obtenidas sin los valores de tiempo cero y quince min.



Esta viene de la figura 20.

Pendientes obtenidas para la Figura A9 de acuerdo a la ecuación $y = mx + b$ donde:

y: $\log_{10} (\% \text{DPPH}\cdot)$

m: pendiente = Velocidad

x: \log_{10} tiempo (\log_{10} tiempo) (min)

b: ordenada al origen (% DPPH \cdot)

R2: Coeficiente de variación

Tabla A17. Resultados de las ecuaciones de las gráficas de la Figura A9.

	Trolox®	Quercetina	92 °C	60 °C
m*	-0.0053	-0.1359	-0.0601	-0.0053
Int	-0.0425	1.2675	0.7064	0.1533
R2	0.4511	0.9634	0.7300	0.1625

* Pendientes obtenidas sin los tiempos cero y quince min.