



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES (HUELLA DIGITAL) DE LAS
PROLAMINAS DE DIFERENTES VARIEDADES DE CHÍA POR ELECTROFORESIS
CAPILAR.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

PEDRO LAVIAS HERNÁNDEZ

ASESORA: DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Caracterización de los perfiles (huella digital) de las prolaminas de diferentes variedades de chíca por electroforesis capilar

Que presenta el pasante: **Pedro Lavias Hernández**
Con número de cuenta: **408090065** para obtener el Título de: **Químico**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Brigida del Carmen Camacho Enriquez	
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
SECRETARIO	Dr. Julio Cesar Botello Pozos	
1er. SUPLENTE	M. en C. Miriam Aide Castillo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	Q. Karla Paola Hernández Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco el financiamiento de esta investigación y la beca de apoyo recibida del Proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IN221412, titulado “Caracterización y cuantificación de los fenoles, prolaminas y ácidos grasos presentes en diferentes variedades de chía”.

A Dios, por permitirme vivir y conocer gente tan maravillosa que
se ha cruzado en mi camino.

A mis padres y hermano, porque siempre contaré con la dicha de
tener una gran familia.

A mis amigos, por sus enseñanzas y por compartir el largo camino
de una carrera.

A mis compañeros de laboratorio: Juan, Giovanni, Dulce, Miguel,
Yessy, Sandra, Gonzalo y Claudia, que además de su compañía y
enseñanzas, me recordaron lo amplio que es la química.

A mis profesores, de quienes obtuve los conocimientos infinitos de
esta ciencia.

Gracias a todos, ¡Hoy puedo sentirme Químico!

CONTENIDO.

AGRADECIMIENTOS.....	i
CONTENIDO.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. La chía (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	2
2.1.1. Origen e historia.....	2
2.1.2. Descripción botánica y evolución.....	4
2.1.3. Sustancias químicas de interés nutricional.....	8
2.1.4. Impacto económico.....	12
2.2. Proteínas.....	14
2.2.1. Generalidades.....	14
2.2.2. Las prolaminas y su uso como huella digital para identificar y clasificar las variedades y/o genotipos de especies de cereales y semillas.....	16
2.3. Electroforesis capilar.....	20
2.3.1. Breve historia.....	20
2.3.2. Fundamentos.....	21
2.3.3. Tipos de electroforesis.....	24
2.3.4. Aplicaciones.....	26
2.3.5. Instrumentación y electroforesis capilar de zona (ECZ).....	26
2.3.6. Parámetros de la separación en electroforesis capilar de zona (ECZ).....	28
2.3.7. Separación de proteínas mediante electroforesis capilar.....	32
3. HIPÓTESIS.....	34
4. OBJETIVOS.....	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1. Equipo y reactivos.....	35
5.2. Material biológico.....	36
5.3. Pretratamiento y obtención de la harina desgrasada.....	37
5.4. Determinación de aceites totales.....	38
5.5. Determinación de humedad en la harina desgrasada.....	38
5.6. Extracción de las prolaminas con el método de Osborne modificado (Bean, Bietz, & Lookhart, 1998). ..	38
5.7. Metodología para la medición de las muestras por electroforesis capilar.....	39

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	40
6.1. Comprobación del método reportado y evaluación de algunos factores que impactan en la separación de las prolaminas de la chíá (Optimización del método de separación).	40
6.1.1. <i>Influencia del tiempo de refrigeración.</i>	41
6.1.2. <i>Precisión intermedia.</i>	41
6.2. Obtención y comparación de la huella digital de las diferentes muestras.	53
7. CONCLUSIONES.	72
8. REFERENCIAS.	73
9. ANEXOS.	77
9.1. Comprobación del método reportado y evaluación de algunos factores que impactan en la separación de las prolaminas de la chíá (Optimización del método de separación).	77
9.1.1. <i>Variación de la concentración de ACN.</i>	77
9.1.2. <i>Variación de la concentración de IDA.</i>	79
9.1.3. <i>Análisis de varianza multifactorial para los datos de la tabla 6.5.</i>	81
9.2. Evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia del método de separación seleccionado.	82
9.2.1. <i>Tiempos de migración bajo las condiciones de lavado A.</i>	82
9.2.2. <i>Tiempos de migración bajo las condiciones de lavado B.</i>	86
9.2.3. <i>Análisis de la varianza multifactorial para los datos de la tabla 6.6.</i>	90
9.3. Análisis de las diferentes muestras.	91
9.3.1. <i>Análisis de la varianza multifactorial para evaluar la influencia de la localidad y el color de semilla a los picos diferenciales obtenidos del perfil de las prolaminas.</i>	91
9.3.2. <i>Análisis clúster para las muestras de chíá analizadas.</i>	92
9.3.3. <i>Análisis de la varianza multifactorial para la respuesta de porcentaje de aceite total.</i>	92
9.3.4. <i>Análisis de la varianza multifactorial para la respuesta de porcentaje de humedad.</i>	93

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%PG	Porcentaje de germinación
%RSD	Porcentaje de desviación estándar relativa
ACN	Acetonitrilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AGE	Ácidos grasos esenciales
RNA	Ácido ribonucleico
CEC	Electrocromatografía capilar
CGE	Electroforesis capilar en gel
CIEF	Enfoque isoelectrico capilar
CITP	Isotacoforesis capilar
cm	centímetros
ECZ	Electroforesis capilar de zona
DHA	Ácido docosahexanoico
DPA	Ácido docosapentanoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido eicosapentanoico
FEO	Flujo electroosmótico
g	gramos
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
IDA	Ácido iminodiacético
kV	Kilovoltios
LDL	Colesterol de baja densidad
MEKC	Cromatografía micelar electrocinética
min	minutos
mM	miliMolar
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoelectrico
TSN	Número de serie taxonómico
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-Visible

1. INTRODUCCIÓN.

La *Salvia hispanica* L. conocida comúnmente como chía, produce numerosas semillas pequeñas de forma oval, lisas, brillantes, de color grisáceo con manchas rojizas y posee entre 25-36% de aceite, del cual el ácido linolénico (omega 3) representa el 60% en la proporción del aceite, lo que hace a esta semilla la fuente vegetal con la más alta concentración de omega 3, además contiene entre 17-23% de proteína, es altamente rica en antioxidantes, provee todos los aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales, fibra y es libre de gluten.

En México su uso aún se encuentra limitado debido al desconocimiento de todas estas propiedades, en contraste de países como Argentina, Chile y Australia en donde su explotación es mayor principalmente en forma de aceite y semilla.

El conocimiento y caracterización de las proteínas de los granos, como en este caso las prolaminas de la chía, es de alto valor científico en muchas formas, por ejemplo, debido a la heterogeneidad de las proteínas de los granos y su expresión casi invariante, la medición del perfil de éstas se utiliza como huella digital que permite la clasificación de sus genotipos y variedades, por ejemplo, se han determinado perfiles electroforéticos en varias especies de trigo, avena, arroz, cebada y centeno (Bean & Lookhart, 2000). Esta habilidad de poder diferenciar entre variedades, es sumamente importante para su comercialización, utilización y en investigación. Mediante este perfil de las proteínas es posible asegurar y seleccionar la variedad y el genotipo a cultivar, asegurando de esta forma la pureza de la variedad que se pretende producir, de esta manera se pueden seleccionar líneas que confieran un retorno económico óptimo, mayor calidad, resistencia y adaptabilidad. México es el país con más diversidad de chías silvestres, por lo que la preservación y mejoramiento de líneas genéticas puede ser realizado, en comparación con otros países donde el cultivo incluye solo la variedad *Salvia hispanica* var. *Chionocalyx* Fernald que tomaron los extranjeros de nuestro país para comercializarla en otros países (Hernández Gómez & Miranda Colin, 2008).

De tal forma que la caracterización de las proteínas de la chía es muy importante en su identificación y la predicción de su calidad. El presente estudio tiene como objetivo impulsar el aprovechamiento de este alimento en nuestro país mediante la identificación varietal que proveerá información valiosa a productores para el mejoramiento en rendimiento y calidad de esta semilla.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. La chía (*Salvia hispanica* L.).

2.1.1. Origen e historia.

La palabra chía proviene de una adaptación española al término nahua *chian* o *chien* (plural), término que en náhuatl significa ‘semilla de la que se obtiene aceite’ (Watson, 1938), es un cultivo anual cuyo origen es probable del suroeste de nuestro país y noroeste de América Central. Los pueblos asentados en estas regiones la han consumido desde los tiempos precolombinos, siendo parte primordial de su alimentación diaria.

Existe evidencia de que esta semilla empezó a emplearse en la alimentación humana hace unos 3,500 años antes de Cristo, y entre los años 2,600-2,000 A. C. comenzó su cultivo en el Valle de México por las civilizaciones Teotihuacanas y Toltecas antes de que los Aztecas se establecieran en este territorio; entre los años 1,500-900 A. C. se empleó como moneda y se utilizaba en las comidas diarias mezclada con otros alimentos, emulsionada con agua como bebida refrescante, molida en harina para formar parte de medicinas, prensada para obtener su aceite y ser utilizado como base de pinturas cosméticas para el rostro y cuerpo e incluso en ofrendas a los Dioses. Durante las guerras, su consumo fue indispensable por su condición energizante, y se usó como pago de tributos anuales por parte de los pueblos conquistados por los aztecas, recibiendo entre 5000 y 15,000 toneladas de chía en su capital Tenochtitlán (Códice Mendoza, 1542).

En el códice Florentino, escrito por Fray Bernardino de Sahagún y que transcribe la “Historia general de las cosas de la Nueva España”, se detalla la importancia de esta semilla y describe aspectos de la producción, comercialización y uso por los Aztecas y Mayas (Figura 2.1), y aunque para éstos últimos no existe evidencia de que realizaban su cultivo, comerciaban intensamente con los centros Teotihuacanos, un hecho que duró por varios siglos y que hace suponer que la chía también era conocida por este pueblo precolombino, el cual ocupó una gran parte de México, Guatemala, Honduras y El Salvador (Ayerza & Coates, 2005).



Figura 2.1. Ilustración de la planta de chía presente en el Códice Florentino (Sahagún, 1579).

Con la llegada de los españoles, las tradiciones de los nativos fueron suprimidas y la mayor parte de su agricultura intensiva y de su sistema de comercialización destruidos. Muchos cultivos que habían tenido una gran importancia en las dietas precolombinas fueron prohibidos por los españoles debido a su estrecha relación con los cultos religiosos y reemplazados por especies como el trigo, cebada, arroz, entre otras. Así, de los cuatro cultivos básicos de la dieta azteca, maíz, frijol, chía y amaranto, los últimos dos pierden sus lugares privilegiados y casi desaparecen, siendo los efectos de la persecución española mayor sobre la chía. En el caso del amaranto, este fue uno de los principales cultivos del Imperio Inca, contemporánea de los aztecas, por lo que el desarrollo paralelo del cultivo en las dos civilizaciones indudablemente aumentó la supervivencia del amaranto. Otro factor que contribuyó a la persistencia del maíz, el frijol y el amaranto se relaciona con sus fotoperiodos (regulación de las funciones biológicas utilizando como parámetros los cambios de iluminación entre días y noches del año, así como su duración según las estaciones), siendo insensibles o poco sensibles a un fotoperiodo en particular pudiendo florecer y completar su ciclo de cultivo tanto en España como en otros países europeos. En cambio, la chía es una planta de día corto, cuya floración solo puede ser lograda en los países europeos durante el periodo de heladas o cercano a ellas, a las cuales no es tolerante. De este modo, el requerimiento fisiológico

impidió que la chía fuera cultivada en el Viejo Mundo, sin embargo, esta especie logró sobrevivir debido a la conservación de algunas tradiciones precolombinas por parte de pequeños grupos de descendientes de las naciones Nahuatl, permaneciendo aislados en el suroeste de nuestro país y las zonas montañosas de Guatemala (Ayerza & Coates, 2005).

Hoy, en su lugar nativo, la chía está limitada a unas pocas hectáreas con escasas posibilidades de incrementar el área sembrada debido a factores sociales y políticos. Sin embargo debido a sus propiedades nutrimentales se ha comenzado a cultivar en diferentes países de manera regular.

2.1.2. Descripción botánica y evolución.

De acuerdo con el Sistema Integrado de Información Taxonómica (2013), la chía tiene un número de serie taxonómico (TSN) 32718, y su clasificación es:

TSN	32718
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>
Infrareino	<i>Streptophyta</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Spermatophytina</i>
Infradivisión	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden	<i>Asteranae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Salvia hispanica</i> L.

La familia *Lamiaceae* cuenta con 236 géneros y alrededor de 7,173 especies (Martínez Gordillo, Fragoso Martínez, García Peña, & Montiel, 2013) de amplia distribución en regiones tropicales y templadas de nuestro país. Son hierbas anuales o arbustos perennes, que contienen

aceites esenciales en los pelos glandulares de sus hojas y tallos, motivo por el cual han sido domesticadas para ser utilizadas como condimentos y en la elaboración de perfumes.

Por su parte, el género *Salvia* incluye unas 900 especies y se distribuye extensamente en varias regiones del mundo, tales como Sudáfrica, Asia Sur-Oriental y América de norte a sur. Las plantas pueden ser herbáceas o leñosas, y sus flores son muy atractivas y de varios colores (Ixtaina, 2010).

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta que puede alcanzar una altura de 1.0 a 1.5 metros, los tallos son cuadrangulares, acanalados y pilosos. Las hojas se presentan opuestas con bordes aserrados y miden de 8.0-10.0 cm de longitud y 4.0-7.0 cm de ancho. Las flores, hermafroditas, se pueden presentar en forma de espigas terminales y según la variedad de chía, el color de los pétalos pueden variar del púrpura al blanco (CHIA CORP, 2014) y si bien no se conoce el mecanismo de polinización, algunos autores señalan que es entomófila (realizada por insectos), lo cual se ve favorecido por el color de los pétalos, la morfología floral y la presencia de néctar. La semilla que produce es oval de unos 2 mm de largo por 1.5 mm de ancho, de aspecto liso, brillante, y dependiendo de la variedad puede ser blanco o gris con un moteado o rayado de color negro (Figuras 2.2-2.4).



Figura 2.2. Fotografía de *Salvia hispanica* L.



Figura 2.3. Floración inicial del cultivo.



Figura 2.4. Semillas de chía pinta.

Esta especie requiere de condiciones climáticas tropicales a subtropicales, con temperaturas medias aproximadas de 17 °C, siendo intolerante a las heladas en ningún estado de desarrollo. En cuanto a condiciones de suelo, se adapta a prácticamente cualquier tipo que cuente con buen drenaje, sin embargo se adecua mejor a suelos livianos (Zúñiga Sáez, 2012).

La domesticación es un proceso evolutivo bajo la influencia de actividades humanas. Varios autores han definido los cambios morfológicos asociados con la domesticación de algunas especies vegetales, y aunque se desconocen los orígenes del cultivo de chía y su domesticación, la selección humana ha sido una fuerza importante durante su evolución, debido a ello es probable que exista una amplia diversificación entre poblaciones silvestres de chía con respecto a la mayoría de las especies cultivadas (Cahill, 2004).

Las características morfológicas y fenológicas que diferencian a las variedades domesticadas de las silvestres de *Salvia hispanica* L. son: cálices cerrados (envoltura externa de las flores constituida por sépalos), semillas de mayor tamaño, inflorescencias más compactas (disposición de las flores sobre las ramas o la extremidad del tallo, su límite está determinado por una hoja normal), flores más largas, presencia de dominancia apical (tendencia a un mayor crecimiento en las puntas principales de la planta) y uniformidad en los periodos de floración y maduración (Ixtaina, 2010). Como en la mayoría de las plantas cultivadas, en la chía ha existido una pérdida de variabilidad genética en el proceso de domesticación en donde la alteración de su hábitat natural y la migración de los residentes originarios en donde prosperan las poblaciones silvestres han contribuido a dicho deterioro.

De acuerdo con Rovati, Escobar y Prado (2012) se ha corroborado la presencia de tipos diferentes de esta planta en base al color de la semilla, que puede ser negra, blanca o café, concluyendo que en los cultivos analizados, alrededor del 83% corresponde a semillas negras mientras que el 9% son blancas; así mismo analizaron el peso de las semillas con el que se observó que las de color café presenta un menor peso, esto debido a que son semillas vacías, en contraste a las semillas blancas y negras que tienen un peso similar y mayor. En cuanto al mucilago formado al hidratar las semillas, las blancas y negras formaron mayor cantidad respecto a las cafés, y al realizar el estudio de porcentaje de germinación (%PG) encontraron que sólo las semillas de color negro y blanco germinaron con un 87.75% y 82.5% respectivamente.

Como nota adicional, si una semilla de chía negra es sembrada, se producirán semillas de color negro, por otro lado, si es sembrada una semilla blanca, entonces se obtendrán semillas blancas, y de acuerdo con Cahill y Provance (2002), estas últimas son una característica rara en poblaciones silvestres y su expresión genética está controlada por un gen recesivo, lo que refuerza la idea de la intervención del hombre en el proceso evolutivo de esta semilla. En la actualidad, los esfuerzos se han dirigido hacia la selección de plantas domesticadas, a partir de una porción pequeña del total de la diversidad genética (Cahill, 2004).

2.1.3. Sustancias químicas de interés nutricional.

A continuación se muestra un comparativo de composición de esta semilla respecto a los cinco cereales de mayor importancia a nivel mundial, en el que se puede ver que el contenido de proteínas, lípidos, fibra y energía es mayor en la semilla de chía.

Tabla 2.1. Energía y composición centesimal correspondiente a diversos granos (Ixtaina, 2010).						
Grano	Energía (kcal/100g)	%				
		Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas
Arroz	358.0	6.5	0.5	79.1	2.8	0.5
Cebada	354.0	12.5	2.3	73.5	17.3	2.3
Avena	389.0	16.9	6.9	66.3	10.6	1.7
Trigo	339.0	13.7	2.5	71.1	12.2	1.8
Maíz	365.0	9.4	4.7	74.3	3.3	1.2
Chía	550.0	19-23	30-35	9-41	18-30	4-6

Del contenido de aceite presente en la semilla de chía, alrededor del 60% corresponde a ácido α -linolénico (omega 3, precursor de los ácidos grasos DHA ácido docosahexanoico y EPA o ácido eicoisapentanoico) y el 20% es ácido linoléico, lo que la hace la fuente vegetal con mayor contenido de ácidos grasos esenciales (AGE). Actualmente se disponen en el mercado de cuatro fuentes de ácidos grasos omega 3. Las dos más importantes en volumen de producción son el pez menhaden (*Brevoortia tyrannus*) y la semilla de lino, mientras que las fuentes minoritarias son la semilla de chía y las algas marinas. En la tabla 2.2 se muestra un comparativo del perfil de ácidos grasos para dichas fuentes pudiendo observar que el lino y la chía son las fuentes con mayor contenido de ácido α -linolénico.

Tabla 2.2. Comparativo de diversas fuentes de ácidos grasos ricos en omega 3 (Ixtaina, 2010).

Aceite	Ácido graso (% del total de ácidos grasos)										
	Mirístico	Palmítico	Palmitoleico	Estearico	Oleico	Linoléico	α -linoléico	Araquidónico	EPA	DPA	DHA
Menhaden	8.0	15.2	10.5	7.8	14.5	2.1	1.5	1.2	13.2	4.9	8.6
Algas	4.2	14.5	27.6	0.8	5.4	2.3	1.7	4.7	27.7	-	-
Chía	-	6.9	-	2.8	6.6	19.0	83.8	-	-	-	-
Lino	-	5.5	-	1.4	19.5	15.0	57.5	-	-	-	-

Los AGE son muy importantes para la nutrición humana puesto que nuestro organismo no puede sintetizarlos y deben ser incorporados con la dieta. Se debe tener en cuenta, que al ser la chía una fuente vegetal, no contiene colesterol, mientras que otras fuentes como el pescado, lo contienen en conjunto a ácidos grasos saturados.

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en los países industrializados, junto con el cáncer y las complicaciones causadas por la diabetes. Estudios epidemiológicos demuestran la relación específica entre una alimentación deficiente en AGE, en especial los omega 3, y el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatorias crónicas. Los omega 3 disminuyen el nivel de triglicéridos y colesterol malo (LDL) en sangre, ya que inhiben su síntesis a nivel hepático, además ayudan en la emulsión y absorción de vitaminas liposolubles como A, D, E y K, regulan la coagulación de la sangre, disminuyen ligeramente la presión arterial e incluso proporcionan un control de la diabetes.

Además del buen perfil lipídico, las semillas de chía contienen entre 19 y 23% de proteínas (Tabla 2.1) de muy fácil digestión y de rápida absorción, con lo que llegan rápido para nutrir a células y tejidos. El contenido de proteínas es mayor que en los cereales tradicionales, además es libre de gluten por lo que los celíacos (personas alérgicas al gluten) pueden consumirla sin problemas.

Los aminoácidos que contiene esta semilla son:

Tabla 2.3. Contenido de aminoácidos correspondientes a hidrolizados de proteínas de semillas de chía (Ayerza & Coates, 2005).			
Aminoácido	g/16g N	Aminoácido	g/16g N
Ácido aspártico	7.64	<i>Isoleucina</i>	3.21
<i>Treonina</i>	3.43	<i>Leucina</i>	5.89
Serina	4.86	<i>Triptófano</i>	-
Ácido glutámico	12.4	Tirosina	2.75
Glicina	4.22	<i>Fenilalanina</i>	4.73
Alanina	4.31	<i>Lisina</i>	4.44
<i>Valina</i>	5.1	<i>Histidina</i>	2.57
Cisteína	1.47	<i>Arginina</i>	8.9
<i>Metionina</i>	0.36	Prolina	4.4

De acuerdo a la tabla anterior, se destaca un buen balance de aminoácidos esenciales (marcados en cursiva), entre ellos lisina, metionina y cisteína, cuyos contenidos son mayores respecto a otras semillas de oleaginosas.

Salvia hispanica L. también es una buena fuente de vitaminas B. Investigaciones recientes muestran que el bajo nivel de vitamina B en sangre está asociado a un aumento en el riesgo de padecer una enfermedad cardiocoronaria y apoplejía (American Heart Association, 1999). Al comparar el contenido de vitaminas de la chía con respecto a la de otros cultivos tradicionales, se encuentra que el nivel de niacina es mayor que el presente en maíz, soya, arroz y cártamo, mientras que para la vitamina A su contenido es inferior al del maíz. Por otro lado, las concentraciones de tiamina y riboflavina son similares a las del arroz y el maíz, aunque menores que las de soya y de cártamo (Ayerza & Coates, 2005).

En la tabla siguiente se muestra el contenido de vitaminas y minerales en la semilla de chía entera y en la harina desgrasada, cabe mencionar que es una excelente fuente de calcio, potasio, magnesio, fósforo, hierro, zinc y cobre. Al comparar el contenido de calcio, fósforo y potasio se encontró que contiene respectivamente entre 13-35, 2-12, y 1.6-9 veces más respecto al trigo, arroz, cebada, avena y maíz. Así mismo al compararla con la leche, esta semilla presenta 6 veces más calcio, el doble de fósforo y 4.6 veces más de potasio (United States Department of Agriculture (USDA), 2002).

Tabla 2.4. Contenido de vitaminas y minerales.			
Nutrientes		Semilla de chía	
		Entera	Harina desgrasada
		mg/100g	
Macroelementos	Calcio	714	1180
	Potasio	700	1100
	Magnesio	390	500
	Fósforo	1067	1170
Microelementos	Aluminio	2	4.3
	Boro	-	1.4
	Cobre	0.2	2.6
	Hierro	16.4	20.4
	Manganeso	2.3	6.8
	Molibdeno	0.2	-
	Sodio	-	2.9
	Zinc	3.7	8.5
Vitaminas	Niacina	6.13	11.3
	Tiamina	0.18	0.79
	Riboflavina	0.04	0.46
	Vitamina A	44 IU	-

En cuanto a la fibra, su contenido es de 18-30% (Tabla 2.1), el cual al ser comparado con otros cereales como la cebada, trigo, avena, maíz y arroz, la chía tiene un contenido de 1.6, 2.3, 2.6, 8.3 y 9.8 veces más respectivamente. Cuando la harina de chía es desgrasada, el contenido de fibra puede alcanzar hasta un 40%, del cual el 5% corresponde a fibra hidrosoluble, también llamada como mucilago, el cual tiene efectos metabólicos positivos ya que al entrar en contacto con los ácidos del estómago, se forma una barrera física entre los carbohidratos consumidos y las enzimas digestivas, provocando una digestión más lenta, liberando en forma gradual y sostenida a la glucosa, lo cual resulta benéfico en el tratamiento de la diabetes, ya que evita elevaciones bruscas del nivel de glucosa en sangre después de comer. Este mucilago también tiene importancia en la industria alimentaria al ser utilizado como agente espesante (Ixtaina, 2010).

Por último, pero no menos importante, es el contenido de antioxidantes (compuestos polifenólicos) en el que su actividad tiene un valor similar al reportado para el salvado de sorgo con un alto contenido de taninos, e incluso mayor que el de algunos granos de trigo y la mitad que el informado para el vino tinto, el cual presenta uno de los niveles más altos de actividad antioxidante (Ixtaina, 2010).

Tabla 2.5. Contenido de antioxidantes.		
Compuesto		g/kg semilla
Extracto sin hidrolizar	Ácido cafeico	6.60E-03
	Ácido clorogénico	7.10E-03
Extracto hidrolizado	Mircetina	3.10E-03
	Quercetina	2.00E-04
	Kaempferol	1.10E-03
	Ácido cafeico	1.35E-02

2.1.4. Impacto económico.

De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la producción Nacional de semilla de chía en los últimos años ha ido en aumento, aunque claramente se observa que el rendimiento por hectárea sembrada ha decrecido (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Producción agrícola de chía por año.						
Año	Superficie Sembrada	Superficie Cosechada	Producción	Rendimiento	Precio Medio Rural (PMR)	Valor Producción
	(ha)	(ha)	(t)	(t/ha)	(\$/t)	(Miles de Pesos)
2012	5,096.60	5,096.60	2,060.16	0.40	65,777.88	135,512.96
2011	2,750.00	2,750.00	3,448.60	1.25	16,086.96	55,477.50
2010	2,329.00	2,329.00	2,913.50	1.25	19,646.47	57,240.00
2009	45	34	33.6	0.99	5,291.67	177.8
2008	20	20	60	3	5,200.00	312
2007	37	22	45.8	2.08	7,500.00	343.5
2006	15	15	37.5	2.5	7,800.00	292.5

Actualmente el Estado con la mayor producción es Jalisco, principalmente en el Municipio de Acatic, seguido por Puebla y su Municipio de Atzitzihuacán (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Producción agrícola de semilla de chía por año y municipio.								
Año	Estado	Municipio	Sup. Sembrada	Sup. Cosechada	Producción	Rendimiento	PMR	Valor Producción
			(ha)	(ha)	(t)	(t/ha)	(\$/t)	(Miles de Pesos)
2012	Jalisco	Cuquío	1,800.00	1,800.00	810	0.45	80,000.00	64,800.00
		Acatic	2,181.60	2,181.60	763.56	0.35	46,185.24	35,265.20
		Ixtlahuacan del Río	410	410	184.5	0.45	80,000.00	14,760.00
		Zapotlanejo	405	405	170.1	0.42	76,062.08	12,938.16
		Tomatlán	270	270	108	0.4	65,000.00	7,020.00
	Puebla	Atzitzihuacán	30	30	24	0.8	30,400.00	729.6
	TOTAL		5,096.60	5,096.60	2,060.16	0.4	65,777.88	135,512.96
2011	Jalisco	Acatic	2,160.00	2,160.00	3,240.00	1.5	15,000.00	48,600.00
		Zapotlanejo	455	455	159.25	0.35	33,000.00	5,255.25
		Cuquío	105	105	28.35	0.27	35,000.00	992.25
	Puebla	Atzitzihuacán	30	30	21	0.7	30,000.00	630
	TOTAL		2,750.00	2,750.00	3,448.60	1.25	16,086.96	55,477.50
2010	Jalisco	Acatic	1,800.00	1,800.00	2,340.00	1.3	19,500.00	45,630.00
		Zapotlanejo	400	400	500	1.25	19,800.00	9,900.00
		Cuquío	99	99	49.5	0.5	20,000.00	990
	Puebla	Atzitzihuacán	30	30	24	0.8	30,000.00	720
	TOTAL		2,329.00	2,329.00	2,913.50	1.25	19,646.47	57,240.00
2009	Jalisco	Acatic	20	14	19.6	1.4	5,500.00	107.8
	Puebla	Atzitzihuacán	20	20	14	0.7	5,000.00	70
	Jalisco	Yahualica de González Gallo	5	0	0	0	0	0
	TOTAL		45	34	33.6	0.99	5,291.67	177.8
2008	Jalisco	Acatic	20	20	60	3	5,200.00	312
	TOTAL		20	20	60	3	5,200.00	312
2007	Jalisco	ACATIC	20	20	42	2.1	7,500.00	315
		Yahualica de González Gallo	2	2	3.8	1.9	7,500.00	28.5
		Tuxcacuesco	15	0	0	0	0	0
	TOTAL		37	22	45.8	2.08	7,500.00	343.5
2006	Jalisco	Acatic	15	15	37.5	2.5	7,800.00	292.5
	TOTAL		15	15	37.5	2.5	7,800.00	292.5

La importancia de este trabajo radica en ser utilizado como un medio para proporcionar información a los productores acerca de las diferentes variedades de chía, para que en un futuro pueda mejorarse dicha semilla en su rendimiento y calidad, además de impulsar su cultivo, fomentar su consumo en la población mexicana, dar a conocer sus beneficios y con ello elevar gradualmente la calidad de vida de consumidores y productores.

2.2. Proteínas.

2.2.1. Generalidades.

Todas las biomoléculas son importantes, sin embargo, los ácidos nucleicos (DNA Y RNA) y proteínas lo son en particular, ya que ambos tipos de biomoléculas proporcionan información, es decir, almacenan en su estructura química las instrucciones que determinan lo que ocurre en una célula. De forma general, el DNA es el encargado de almacenar dichas instrucciones (información genética), y dependiendo de las necesidades de la célula esa información puede ser transcrita en forma de RNA para su posterior traducción a proteínas.

Las proteínas (Figura 2.5), cuya importancia en la dieta humana, es fungir como fuente principal de aminoácidos, son biomoléculas compuestas por residuos de L-aminoácidos unidos por enlace peptídico (este enlace se forma por eliminación de los elementos del agua del grupo α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino de otro); su peso es superior a 10,000 Dalton y dado que cada proteína es única por su estructura y, en consecuencia, única por su función, éstas determinan la individualidad de la célula y de un organismo entero. De acuerdo a su función biológica, las proteínas pueden ser clasificadas como (Bohinsky, 1998):

- Catalíticas (enzimas).
- Estructurales.
- Contráctiles.
- De defensa natural.
- Digestivas
- De transporte.
- De la sangre.
- Hormonales.
- Como factores de crecimiento.
- De transferencia de electrones.
- Del DNA.
- Cromosómicas.
- Membránicas receptoras.
- Ribosómicas.
- De reserva.
- Tóxicas (toxinas).
- De la visión.

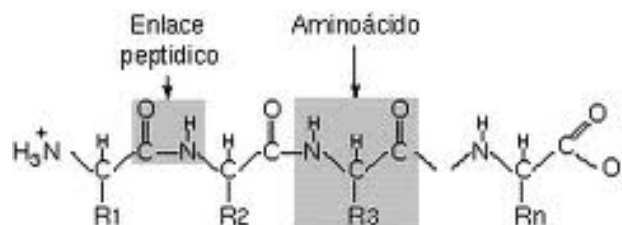


Figura 2.5. Estructura química general de una proteína.

Dentro de sus características físicas y químicas podemos encontrar (Nelson & Cox, 2001):

- Vida media de alrededor de 7 años en condiciones intracelulares.
- Los grupos carboxilo y amino terminales se ionizan de la misma forma que en los aminoácidos libres, aunque las constantes de ionización son diferentes porque estos grupos ya no son parte de un único aminoácido, debido a ello tienen capacidad amortiguadora.
- Los grupos amino y carboxilo no terminales (unidos covalentemente por enlace peptídico) no se ionizan, y por tanto no contribuyen al comportamiento total ácido-base de las proteínas.
- Si algunos grupos R puedan ionizarse, entonces contribuirán al comportamiento ácido-base global.
- Su solubilidad en agua depende de la conformación fibrosa o globular, siendo esta última la de mayor solubilidad.
- Su función biológica se ve disminuida o eliminada (desnaturalización) al perder su estructura terciaria por algún cambio en el medio (Temperatura, pH, salinidad, composición, radiaciones, etc.).
- Poseen un punto isoeléctrico, es decir, un valor de pH en el que la carga neta de la molécula es nula. Esta propiedad se aprovecha para separar proteínas de una mezcla mediante electroforesis.
- Pueden hidrolizarse para generar los aminoácidos que constituyen a la proteína bajo las siguientes condiciones: HCl 6M, 90°C durante 18h.

En base a su solubilidad, las proteínas pueden ser clasificadas como (Osborne, 1907):

- Albúminas: Solubles en agua o en disoluciones salinas diluidas.
- Globulinas: Requieren concentraciones salinas más elevadas para permanecer en disolución.
- Prolaminas: Solubles en disoluciones alcohol-agua.
- Glutelinas: Solo se disuelven en disoluciones ácidas o básicas.

2.2.2. *Las prolaminas y su uso como huella digital para identificar y clasificar las variedades y/o genotipos de especies de cereales y semillas.*

Una población es el conjunto de individuos de una misma especie, y mediante la evolución y los cambios que esto conlleva, una sola población puede originar distintas poblaciones, que si bien fueron originadas a partir de un ancestro común, presentan significativas diferencias. Los cambios y el proceso evolutivo ocurren en toda la población y no así en unos cuantos individuos puesto que todos ellos están expuestos a las mismas condiciones que inducen su transformación.

El fenómeno de variabilidad poblacional es posible gracias a la dotación genética que permite la transformación y mutación, determinando la capacidad de adaptación o extinción de una población según la magnitud y características del medio influyente, tal como la distribución geográfica el cual es un factor importante debido a que el aislamiento geográfico de una población induce a un cambio obligatorio para adaptarse al nuevo medio debido a la dinámica biológica de cada ecosistema (Fontúrbel Rada, Achá Cordero, & Mondaca Gutiérrez, 2007); en el cultivo de plantas la variabilidad se ve afectada por diversos factores extrínsecos relacionados con el clima. Su crecimiento y desarrollo se ven afectados por la temperatura, lluvia, orientación, duración del día (incluyendo la calidad de la luz) y altitud. Todos estos factores han sido estudiados mediante el cultivo de determinadas plantas en diversas áreas climáticas y la observación de sus variaciones (Osorio Durango, 2009):

- Temperatura: Factor que afecta el control del desarrollo y metabolismo de las plantas.
- Lluvia: Este factor debe ser considerado en relación a las lluvias anuales y su distribución a través del año, su efecto en la humedad y en las propiedades de retención del agua del suelo. Una lluvia continua puede generar una pérdida de sustancias hidrosolubles de hojas y raíces.
- Duración del día y características de las radiaciones: Las plantas varían mucho de acuerdo a sus necesidades, tanto a la cantidad como la intensidad de luz requerida. Este factor influye, por ejemplo, en la síntesis y cantidad de alcaloides.
- Altitud: Para el cultivo exitoso de plantas es necesario estudiar las condiciones en las cuales florece la planta en estado salvaje o espontáneo y reproducir o mejorar dichas condiciones.

En botánica sistemática, se suele usar diferentes fuentes y ciencias para la clasificación y filogenia de una planta, tal como morfología comparada, anatomía comparada, embriología, citología, palinología, paleobotánica, quimiosistemática, fitogeografía, etnobotánica, entre otras.

La quimiosistemática es la aplicación de los datos químicos a los problemas taxonómicos, este campo interdisciplinario se ha expandido con rapidez y hace referencia al uso de los constituyentes químicos para explicar las relaciones entre las plantas e inferir su filogenia. Las plantas producen diferentes tipos de productos naturales y con frecuencia las rutas biosintéticas por las que se producen estos compuestos difieren de un grupo taxonómico a otro, de ahí la importancia de utilizar a estos compuestos y sus rutas para confirmar, descartar o reconsiderar las clasificaciones. Existen dos categorías de compuestos químicos útiles en la clasificación (Benítez de Rojas, y otros, 2006):

- a) Metabolitos secundarios: tal como alcaloides, betalaínas, antocianinas, glicosilatos, glicósidos cianogénicos, flavonoides, terpenoides, etc., cuyas funciones aparentemente no son esenciales en las plantas.
- b) Moléculas que contienen información: DNA, RNA y proteínas.

Debido a su abundancia, importancia económica y alimentaria, las proteínas de reserva fueron las primeras que se caracterizaron en las semillas; en cereales y semillas, las proteínas pueden ser de tres tipos:

- Proteínas de almacenamiento o reserva.
- Estructurales.
- Metabólicas.

Las albuminas, globulinas y prolaminas son conocidas como proteínas de reserva o de almacenamiento en cereales y semillas (Shewry & Halford, 2002). Estas proteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático durante el desarrollo de la misma y son almacenadas en cuerpos proteicos de las células del endospermo (Figura 2.6); posteriormente estas proteínas son hidrolizadas durante la maduración y germinación de la semilla, proporcionando una fuente principal de carbono, nitrógeno y azufre para el subsecuente crecimiento y desarrollo (Jiménez, Alché, & Rodríguez García, 2007).

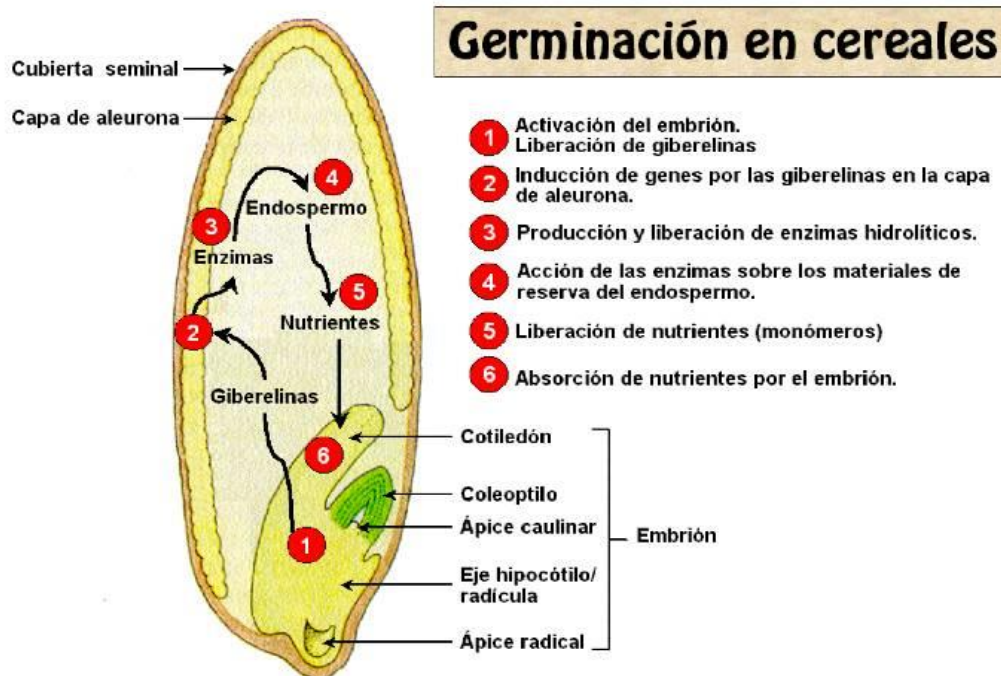


Figura 2.6. Proceso de la germinación en cereales y localización del endospermo.

Las albuminas están constituidas en su mayoría por proteínas que presentan actividad catalítica (llevan a cabo la degradación proteínica durante la germinación) o como defensa de la planta (inhibidores de tripsina y lectinas); están formadas principalmente por aminoácidos básicos, son solubles en soluciones salinas diluidas y agua, y precipitan con sulfato de amonio al 50% (Ibañez-Carranza, 1991). En la mayoría de las semillas de las leguminosas, estas proteínas de reserva son una buena fuente de lisina y de aminoácidos azufrados, principalmente la metionina (Peralta Flores, 2004).

En cuanto a las globulinas, están constituidas en su mayoría por ácido glutámico, ácido aspártico, leucina, aminoácidos básicos y amidas (proporcionando un alto contenido en nitrógeno), encontrándose en mayor proporción en leguminosas y contribuyendo tanto a la calidad nutricional y a las propiedades funcionales de éstas. Estas proteínas son las que más se han estudiado y han sido clasificadas de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación en dos grupos: globulinas 7S o vicilinas y 11S o leguminas (Derbyshire, Wrigt, & Bouter, 1976).

Las prolaminas, las cuales son proteínas monoméricas compactas y presentes en agregados enlazados por puentes disulfuro, son conocidas principalmente por su solubilidad en mezclas alcohol-agua y por sus altos niveles de prolina y glutamina, conteniendo bajos niveles de

aminoácidos básicos, poseen un peso molecular muy variado (desde 10 hasta varios millones de kDa), además constituyen la fracción proteínica principal en cereales como maíz y trigo (Peralta Flores, 2004) y hasta el momento solo se conoce la función de servir como reserva (Pérez Xochipa, 2009).

Las prolaminas reciben diferentes nombres dependiendo de la fuente, en el trigo son llamadas gliadinas, mientras que en otros cereales toman su nombre derivado del latín, por ejemplo, zeínas para el maíz (*Zea mays*), hordeína de cebada (*Hordeum vulgare*) y secalina de centeno (*Secale cereale*) (Ramírez Milla, 2011).

El estudio de este tipo de proteínas, permite distinguir entre cultivares, identificar y asegurar la calidad, pureza y variedad de cereales mediante la comparación de perfiles electroforéticos (Bean & Lookhart, 2000). En trigo (gluteninas y gliadinas), permiten determinar la calidad de la pasta elaborada utilizando la relación gluteninas/gliadinas (Rubianes Manzano, 2007), además de proporcionar información del consumo libre de gluten de este cereal, conocer propiedades funcionales y desarrollar tecnologías en panificación. En otras semillas y cereales, en las que el contenido de prolaminas no es tan significativo como en el trigo, se puede relacionar el contenido de estas proteínas con el contenido de fenoles, actividad antioxidante y contenido de aceite (González Jiménez, 2010).

Cabe hacer mención que la semilla de chía tiene un contenido proteico aproximado del 19 al 23 % (Ayerza R. , 2000) y que Sandoval Oliveros (2012) lo reporta en 35 semillas a las que se les extrajo previamente el mucílago, además de que las fracciones de Osborne cuantificadas son las siguientes.

Muestra	Proteína (g/100g base seca)
Harina desgrasada sin mucílago	35.5 ± 0.6
Albúminas	17.3 ± 0.8
Globulinas	52.0 ± 1.0
Prolaminas	12.7 ± 0.2
Glutelinas	14.5 ± 0.2
Pastilla	3.4 ± 0.6

Se puede observar que las prolaminas son la fracción minoritaria de las proteínas de reserva presentes en *Salvia hispanica* L. Aun así, se propone la utilización de su perfil como marcador de la variabilidad de la semilla con respecto a su localidad de origen.

2.3. Electroforesis capilar.

2.3.1. Breve historia.

Los primeros estudios relacionados con los fundamentos de la electroforesis fueron sobre el desplazamiento de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico, citado por Ferdinand Frederic Reuss en 1809 en las memorias de la Sociedad Imperial Natural de Moscow. El experimento consistió en hacer pasar una corriente eléctrica mediante dos tubos que contienen electrodos de una batería a un recipiente de vidrio con agua y un lecho de arena fina, lo que se observó es el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena hacia las proximidades del ánodo, evidenciando por primera vez la polarización negativa del dióxido de silicio (arena) (Figura 2.7), el cual es utilizado en la actualidad para la fabricación de los capilares utilizados en esta técnica.

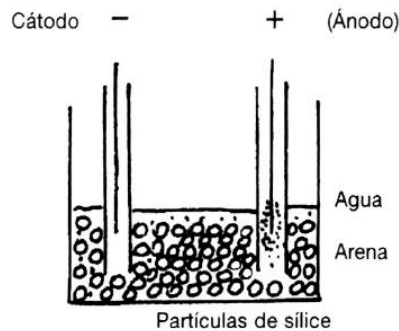


Figura 2.7. Migración de partículas de sílice hacia el ánodo.

Años más tarde, en 1816, se observó el transporte de agua debido a la polarización negativa del capilar que une a los recipientes electródicos, provocando la polarización positiva del agua, este fenómeno es conocido como flujo electroosmótico (FEO) (Figura 2.8)

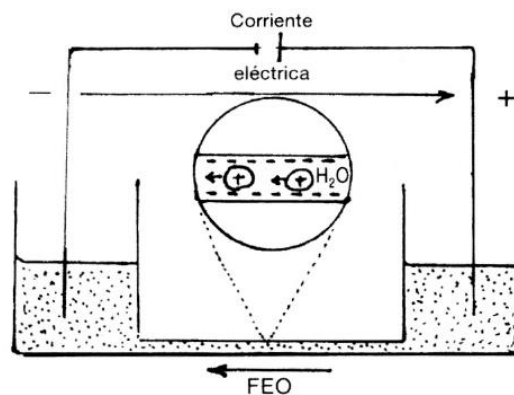


Figura 2.8. Polarización positiva del agua y flujo electroosmótico.

En 1937, Anie Tiselius desarrolló la electroforesis en solución en medios libres sin elementos soportes, pudiendo resolver mezclas de proteínas, por lo que fue acreedora al Premio Nobel de Química. Dentro de los problemas experimentales que se presentaron fueron los de difusión térmica y convección lo que provoca resultados no reproducibles; para evitar esto, se hace uso de geles de poliacrilamida o de agarosa, y aunque son medios anticonvectivos, en esa época se sufría de tiempos de análisis largos, bajos rendimientos y serias dificultades en la detección, el análisis cuantitativo y la automatización.

En 1942, los trabajos de Martin que incluyen la separación de cloruro, aspartato y glutamato mediante isotacoforesis, así como los de Konstantinov, Oshukova en 1963 y los de Everast en su tesis de graduación en el año de 1964, fueron los precursores en el uso de capilares y absorción UV para obtener los espectros característicos de la separación. En el año de 1967, surgió una alternativa a los medios disipadores de calor que separaban las moléculas por tamaño, ideada por Hjerten, quien usaba un tubo de cristal milimétrico que eran rotados a través de su sección longitudinal; años más tarde, en 1979, Virtanen y Mikkers desarrollaron separaciones utilizando capilares de vidrio y teflón respectivamente con 200nm de diámetro interno, pero no fue hasta 1980, que Jorgenson y Lukacs emplearon técnicas avanzadas en la obtención de capilares de sílica fundida con un diámetro interno de 75 μm y Jorgenson, además clarifica teóricamente las relaciones entre los parámetros operacionales y las cualidades de la separación, revelando el gran potencial de esta técnica.

El uso de capilares de diámetro interno tan pequeño y recubiertos con poliiimida para proporcionarle flexibilidad, ha permitido mejorar por mucho la disipación del calor debido a la elevada relación superficie-volumen, por lo que se pueden aplicar campo eléctricos de hasta 30,000 voltios, evitando el sobrecalentamiento y problemas de reproducibilidad, así como disminución de los tiempos de análisis, aumento de resolución, detección en línea de analitos y el aprovechamiento de la no absorción de luz UV-VIS de la sílice.

2.3.2. *Fundamentos.*

La electroforesis es una técnica de separación que se basa en la migración diferencial (en sentido y velocidad) de partículas cargadas (analitos) en un campo eléctrico establecido al efecto, es decir, en un gradiente de potencial (Landers, 1997). Estas partículas cargadas pueden ser muy variadas: iones simples o complejos, macromoléculas, coloides o materia corpuscular.

El gradiente de potencial aplicado impulsa a los iones de la muestra a migrar hacia uno u otro de los electrodos: las moléculas con una carga neta negativa se desplazarán hacia el ánodo (electrodo positivo) y las moléculas con una carga neta positiva migrarán hacia el cátodo (electrodo negativo). La velocidad de migración de un ión (v) en el seno de un campo eléctrico, medida en cm s^{-1} , es (Curtis A. & Robert T., 1994):

$$v = \mu_e E$$

Siendo μ_e la movilidad electroforética del ión, medida en $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, y E la intensidad del campo eléctrico medida en Vcm^{-1} . La movilidad electroforética de un ión es directamente proporcional a la fuerza eléctrica del ión (F_e) e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento (F_f). La fuerza de retardo por rozamiento se determina en un ión a partir de su tamaño o radio del ión solvatado (r_i) y de la viscosidad del medio en el que migra (η), siendo Q la carga iónica de la sustancia.

$$F_e = -F_f \quad \text{Si } F_e = EQ \text{ y } F_f = 6\pi\eta r_i v_i \quad \text{Entonces:}$$

$$v_i = \frac{Q}{6\pi\eta r_i} E \quad \mu_e = \frac{Q}{6\pi\eta r_i}$$

Las separaciones por tanto se basan en las diferencias en la relación carga-tamaño entre los diferentes analitos presentes en la muestra; cuanto mayor sea esta relación más rápido migrará el ión en el seno del campo eléctrico. Para iones del mismo tamaño, el de mayor carga eléctrica migrará más rápidamente. Para iones con la misma carga migrará más aquel de menor tamaño, ya que tendrá una fuerza de retardo por rozamiento de menor valor. La resistencia del medio al paso del ión también influirá en su movilidad electroforética, siendo ésta mayor cuanto mayor sea la viscosidad del medio. Para hacer una separación efectiva es necesario mantener constantes las cargas de cada especie de iones, de manera que la relación carga-tamaño (y por tanto la velocidad de migración) permanezcan en el intervalo más estrecho posible. Asegurar que la carga se mantiene igual sobre cualquier ácido o base quiere decir que las separaciones electroforéticas requieren disoluciones tampón (Castanon, Steyertha, & Castagnino, 1996) los cuales deben de reunir una serie de requisitos:

- Alta capacidad reguladora en el intervalo elegido de pH.
- Baja respuesta en el detector utilizado.
- Baja movilidad (baja concentración iónica) para minimizar la generación de corriente.

- Alta pureza química.
- Bajo coeficiente de temperatura.

Al igual que en las separaciones cromatográficas, la eficiencia de la separación puede ser expresada por el número de platos teóricos (N). En el caso de la electroforesis capilar, N está relacionado con el voltaje (V), con la movilidad (μ) y con el coeficiente de difusión del soluto (D), de acuerdo con la siguiente ecuación (Jorgenson & Lukacs, 1981):

$$N = \mu V / 2D$$

De la ecuación anterior se deduce fácilmente que la aplicación de altos voltajes favorece la eficiencia de la separación, sin embargo esto está limitado debido al calentamiento por efecto Joule, que tiene lugar cuando una corriente eléctrica pasa a través de un medio. La aplicación de altos voltajes será adecuado cuando el calor producido pueda ser disipado eficientemente, minimizando procesos de convección térmica, ebullición del buffer y formación de burbujas dentro del capilar. Lo anterior puede ser controlado con el uso de capilares con diámetros internos del orden de micrómetros, así como el uso de líquidos refrigerantes que controlen la temperatura de análisis.

Otro de los factores para obtener una buena eficiencia y resolución en las señales, es controlar el flujo electroosmótico, el cual es generado al aplicar un campo eléctrico que genera una doble capa eléctrica entre la solución y la pared del capilar. A valores de pH mayores a 3.0, se ha observado que la superficie del capilar está cargada negativamente, de tal manera que se forma sobre ella una primera capa fina e inmóvil de cationes provenientes de la polarización positiva del agua o los analitos, en seguida se forma una segunda capa difusa que está compuesta en su mayoría por cationes, mientras que en el seno de la disolución se encuentran iones positivos y negativos en igual proporción (Figura 2.9). En el momento de aplicar el campo eléctrico, los cationes de la capa fija no se mueven, mientras que los de la capa difusa y del seno de la disolución se mueven hacia el extremo de la capa opuesta, produciendo un exceso de cationes en la capa difusa y estableciendo un flujo neto de la disolución hacia el cátodo que da como resultado un perfil de flujo plano denominado electroósmosis (Figura 2.10). Un perfil de este tipo resulta de un sistema de alta eficiencia y se presenta debido a que las fuerzas inductoras del flujo están distribuidas uniformemente (Morante Zarcero, Sierra Alonso, & Hierro Morales, 2007).

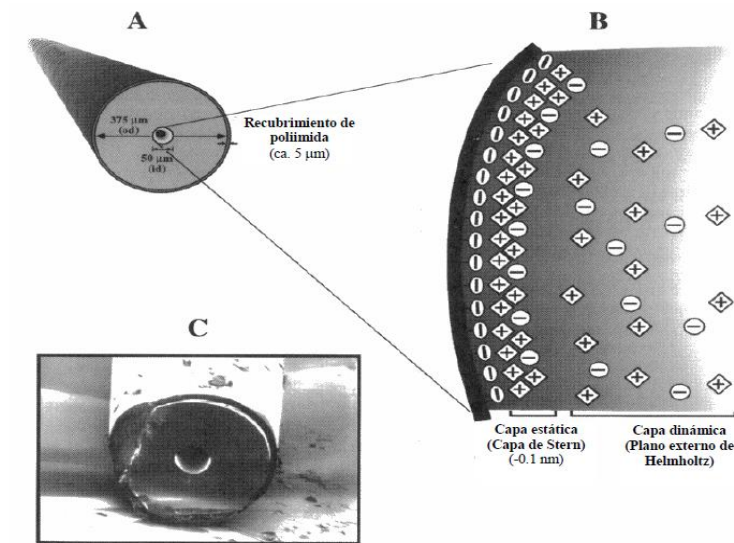


Figura 2.9. A. Diagrama de la estructura del capilar. B. Ilustración de la doble capa iónica. C. Microfotografía del capilar por microscopía electrónica (x170) (Albillos García, 2003).

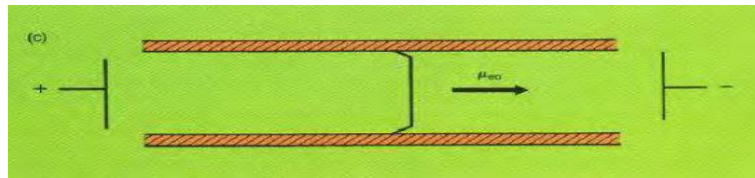


Figura 2.10. Representación del perfil de flujo resultado del flujo electroosmótico en capilares.

2.3.3. Tipos de electroforesis.

Dependiendo del tipo de capilar y los electrolitos empleados, la tecnología de electroforesis capilar puede ser clasificada en varias técnicas de separación, algunos ejemplos son (Morante Zarcero, Sierra Alonso, & Hierro Morales, 2007) (Ewing, Wallingfird, & Olefirowicz, 1989):

- Electroforesis capilar de zona (ECZ). También es conocida como electroforesis de solución libre. Es la forma más simple de la electroforesis capilar. El mecanismo de separación se basa en la diferente movilidad de los analitos producida por las relaciones carga/masa de los analitos. La muestra se inyecta en un extremo del capilar lleno de regulador y cuando se aplica el voltaje los solutos migran a lo largo del capilar en función de sus movilidades electroforética y electroosmótica formando diferentes zonas o bandas que al pasar por el detector dan lugar a diferentes picos. El flujo electroosmótico se dirige

hacia el cátodo acarreando a todas las sustancias en esta dirección, por lo tanto, un detector se coloca en este lugar. La inyección de la muestra se realiza del lado del ánodo ya sea por electromigración o flujo hidrodinámico (Morante Zarcero, Sierra Alonso, & Hierro Morales, 2007).

- Electroforesis capilar en gel (CGE). Es una adaptación de la electroforesis en gel tradicional usando polímeros en solución para crear un tamiz molecular dentro del capilar. Los analitos tienen una relación carga/masa similar que pueden separarse por tamaño. La separación se hace en capilares neutros con un diámetro interno amplio. El uso del capilar neutro permite eliminar el flujo electroosmótico que puede ser perjudicial en esta separación por peso molecular (Ewing, Wallingfird, & Olefirowicz, 1989).

- Enfoque Isoeléctrico capilar (CIEF). Permite la separación de analitos anfóteros, como las proteínas, en función de sus diferencias en el punto isoeléctrico, mediante gradiente de pH formado entre el cátodo y el ánodo. Los componentes migrarán hasta la región en la que se encuentren sin carga. En el punto isoeléctrico del analito, la migración se detiene y la muestra es enfocada en una zona estrecha. Este proceso se llama enfoque y tras él, es necesario movilizar o eluir el contenido del capilar para que cada componente pase por el detector (Morante Zarcero, Sierra Alonso, & Hierro Morales, 2007).

- Isotacoforesis capilar (CITP). Es una técnica de separación electroforética en la que la muestra se introduce entre un regulador líder y otro terminal, de manera que sus componentes se separan en zonas entre ambos reguladores que se mueven a la misma velocidad.

- Cromatografía capilar micelar electrocinética (MEKC). Es una familia de técnicas electroforéticas que incluye electroosmósis, electroforesis y cromatografía. Se puede realizar separación quiral de compuestos, es decir, análisis de enantiómeros.

- Electro cromatografía capilar (CEC). Parecida a HPLC, sin embargo es más eficiente que HPLC debido al perfil plano del disolvente.

2.3.4. Aplicaciones.

El gran avance de la electroforesis capilar se ha extendido al área biomédica, en el campo de las proteínas y péptidos, DNA, análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de drogas, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas, de abuso y pericias forenses. En el área biofarmacéutica, para el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterápicos y de estructura quiral. En el área de alimentos, se le aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes. En el área de control ambiental, permite la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos. Como todo desarrollo de un área analítica nueva, la incorporación de técnicas acopladas como la espectroscopia de masa, fluorescencia inducida por láser y otras variantes permiten augurar un futuro prometedor para esta técnica (Castagnino, 1999).

2.3.5. Instrumentación y electroforesis capilar de zona (ECZ).

En la figura 2.11 se presenta un diagrama de un instrumento de electroforesis capilar. Los componentes básicos son una fuente de poder (0-60 kV), un capilar recubierto de poliimida con un diámetro interno que va de 25 a 100 μm , dos recipientes para el buffer que se pueden acoplar con el capilar, los electrodos conectados a la fuente de poder y el detector.

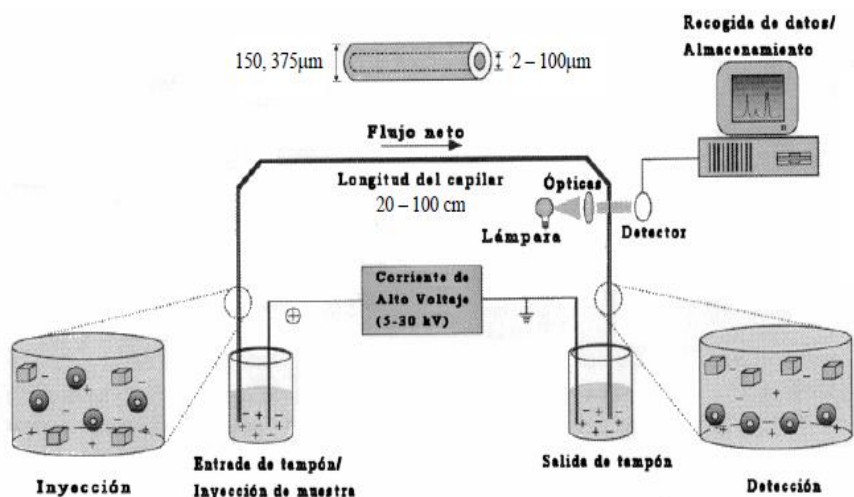


Figura 2.11. Diagrama general de un equipo de electroforesis capilar.

Para obtener un mejor funcionamiento y reproducibilidad en las separaciones, es necesario que el sistema presente un mecanismo para mantener la temperatura del capilar, para ello se puede utilizar mangueras llenas de un líquido refrigerante que contengan al capilar.

En ECZ, el capilar es rellenado con un buffer de separación apropiado al pH deseado y la muestra es introducida en la entrada del mismo. Ambos extremos del capilar y los electrodos de la fuente de poder se sitúan en los recipientes con tampón y se aplican hasta de 30,000 V al sistema. Las especies cargadas (analitos) migran y eventualmente pasan al detector donde la respuesta generada se recoge y almacena en un sistema de adquisición y análisis de datos (software).

La polaridad normal en ECZ se considera del ánodo al cátodo, por lo que los iones (cationes, neutros y aniones) migrarán hacia el cátodo pasando por el detector; el hecho de que bajo ciertas condiciones, todas estas especies puedan ser detectadas, implica que el flujo electroosmótico juega un papel importante en las separaciones, por lo que dependiendo del análisis a realizar se puede sacar ventaja de ello (Figura 2.12).

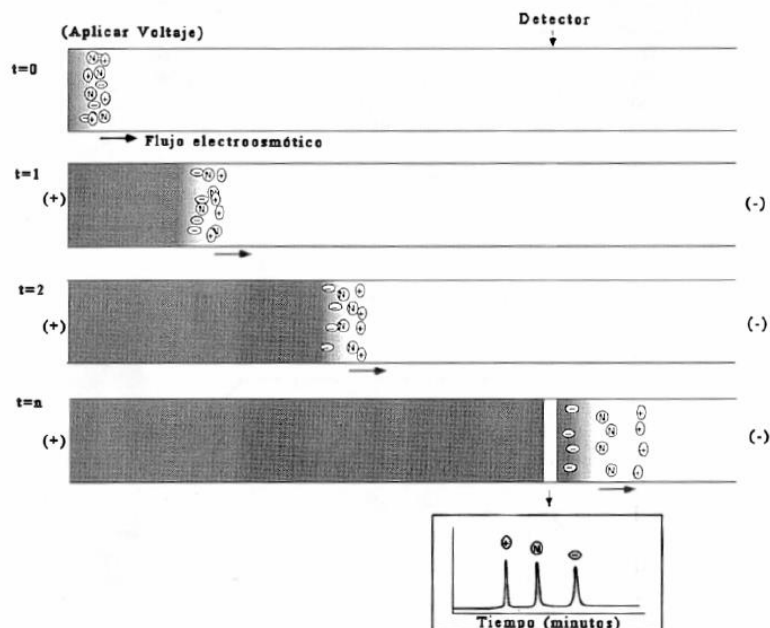


Figura 2.12. Movilidad de las moléculas cargadas y neutras por efecto del campo eléctrico y flujo electroosmótico.

Como se ha mencionado antes, el FEO es dependiente del pH, y a medida que se incrementa éste, también lo hará la fuerza del FEO. Suponiendo que el FEO es el adecuado pero no demasiado fuerte, las respectivas movilidades electroforéticas de los analitos llevarán a la formación de zonas discretas en el momento que pasan por delante del detector obteniéndose señales simétricas y con mayor resolución. Si el FEO es demasiado débil, el fenómeno de difusión se encarga de que las zonas de los analitos se ensanchen con pérdida de simetría y resolución e incluso que algunos analitos no pasen por el detector en tiempos razonables. Por el contrario si el FEO es demasiado fuerte, los analitos pueden no separarse en zonas discretas, provocando el traslape de señales.

2.3.6. *Parámetros de la separación en electroforesis capilar de zona (ECZ).*

En cualquier análisis por esta modalidad, es importante considerar algunos parámetros que afectan a la separación, tanto en tiempo de análisis como la resolución de las señales obtenidas.

- Voltaje.

Un incremento en el voltaje provoca varios efectos: aumenta la migración de la muestra y el flujo electroosmótico, acorta el tiempo de análisis, produce picos más agudos y mejora la resolución; sin embargo, estas ventajas se pueden perder si la fuerza iónica de la matriz de la muestra es mucho mayor que la del regulador de separación, de manera que el efecto Joule (generación de calor por efecto de movimiento de cargas) no se puede disipar efectivamente. El calentamiento por efecto Joule hace que disminuya la viscosidad de la solución lo que produce un aumento del FEO, de la movilidad de los iones y la difusión de los analitos, lo que resulta finalmente en un ensanchamiento de la señal (McLaughlin, y otros, 1992).

- Temperatura del capilar.

En general, las separaciones se deben realizar a temperatura ambiente. Sin embargo, se puede aumentar sin que haya un aumento en la corriente generada por el regulador utilizado. Cuando se aumenta la temperatura usando el mismo voltaje, la viscosidad del regulador disminuye y esto provoca un aumento de la movilidad electroforética de los analitos, disminuyendo los tiempos de separación. Dentro de los efectos no deseados de esta práctica están los cambios de pH

del regulador, ensanchamientos de las señales debido al incremento de la difusión y posible desnaturalización térmica de la muestra.

- Longitud del capilar.

Es recomendable comenzar las separaciones con capilares cortos (20-50 cm) para obtener tiempos breves de análisis. El incremento de la longitud puede traer consigo el aumento en la resolución, especialmente con analitos que tienen diferencias muy pequeñas en sus movilidades electroforéticas; también es posible el aumento del voltaje de separación, ya que la fuerza del campo eléctrico a un voltaje constante se ve disminuida.

- Soluciones reguladoras.

Uno de los factores importantes para la separación de analitos, es la elección de una solución reguladora de pH. Se pueden utilizar una gran variedad de electrolitos dependiendo del análisis a realizar, así, para separaciones a pH bajo, se suelen utilizar soluciones de fosfato, acetato y formiato, mientras que para pH alto se suele usar tris, tricina y borato.

El tipo de regulador utilizado viene condicionado por el pH, pero a igualdad de pH y concentración, la elección del regulador puede variar drásticamente la resolución.

En cuanto a la concentración de los reguladores, ésta se encuentra restringida por la longitud del capilar y su diámetro interno, el campo eléctrico aplicado y la eficiencia del sistema de refrigeración del capilar. En lo general, el uso de reguladores de fuerza iónica alta es deseable para suprimir efectos de intercambio iónico entre los iones del analito con los grupos silanol de la pared capilar.

En ocasiones se pueden añadir a los reguladores diversos aditivos, con la finalidad de potenciar la selectividad de la separación. Los aditivos (Tabla 2.9) suelen tener diversas funciones, ya que no sólo suprimen las interacciones analito-pared capilar, sino que también afectan a la solubilidad del analito.

Tabla 2.9. Aditivos comunes en electroforesis capilar y sus efectos (Oda & Landers, 1997).

Aditivo	Ejemplo	Función
Sales inorgánicas	NaCl, CaCl ₂ , K ₂ SO ₄	Modificación del FEO, cambios conformacionales en proteínas, hidratación de proteínas
Disolventes orgánicos	Metanol, acetonitrilo, etilenglicol	Modificación del FEO, solubilización de analitos, solvatación de los analitos.
Aditivos orgánicos	Urea	Modificación del FEO, solubilización de proteínas, desnaturalización de oligonucleótidos.
Ácidos sulfónicos	Hexano, heptano, octano o análogos del nonano	Emparejamiento de los iones analito, interacciones hidrofóbicas
Aminas divalentes	Diaminoalcanos, bromuro de hexametonio	Modificación del FEO, neutralización de carga, interacción de analitos.
Surfactantes catiónicos	Bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTBA)	Inversión de carga en pared capilar, interacción hidrofóbica.
Derivados de celulosa	Hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa	Reducción del FEO, aporte de medio tamiz.

Un incremento en la fuerza iónica del tampón produce un aumento en el grosor de la doble capa iónica y tiene como efecto la disminución del FEO, por tanto hay un aumento en el tiempo de análisis. Una ventaja de aumentar la fuerza iónica (además de mejorar la capacidad reguladora) es que logra disminuir las interacciones analito-pared capilar y analito-analito (Landers, Oda, & Spelsberg, 1993). El efecto neto en la separación es una mejora en la resolución siempre y cuando se pueda controlar la temperatura y no se produzca la disociación de analitos. Una forma de

aumentar la fuerza iónica sin aumentar el efecto Joule es utilizando aditivos zwiteriónicos (Bushey & Jorgenson, 1989).

El recubrimiento dinámico de la pared del capilar mediante materiales que alteran la viscosidad de la solución en la pared trae consigo la modificación del FEO, de tal manera que la fuerza del FEO es inversamente proporcional a la viscosidad de la solución en la doble capa (Hjertén, 1985). Así, polímeros que se adsorben a la pared del capilar, reducen o eliminan el FEO y evitan que algunos analitos como por ejemplo las proteínas se adsorban ya que se bloquea el acceso a los grupos silanol reactivos.

- Inyección de la muestra en el capilar.

Las modalidades para la introducción de pequeños volúmenes (nanolitros) de la muestra al capilar pueden ser las siguientes:

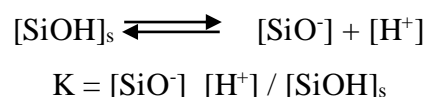
- Inyección hidrodinámica por presión. Se opera por inmersión de la entrada del capilar en un vial que contiene la muestra y se aplica presión a dicho vial.
- Inyección hidrodinámica por gravedad. Se basa en el efecto sifón de la muestra hacia el capilar cuando se eleva el extremo de entrada del capilar con respecto al de salida.
- Inyección hidrodinámica por vacío. Consiste en la succión de la muestra contenida en uno de los extremos del capilar mediante la aplicación de vacío en el vial de salida colocado en el extremo opuesto.
- Inyección electrocinética. El extremo de entrada del capilar se sumerge en la muestra, mientras que el otro extremo se sumerge en un vial que contiene al regulador de separación. En seguida se aplica un voltaje bajo (1-10 kV) durante 1-99 segundos dependiendo de la longitud del capilar y su diámetro interno. Este método tiene como

inconveniente que la cantidad de muestra introducida depende de varios parámetros, tal como la movilidad electroforética de los componentes de la muestra y el FEO, el regulador (tipo, fuerza iónica y pH) y la matriz de la muestra. Esta forma de inyección se recomienda cuando el analito de interés está en pequeño porcentaje en la muestra y tiene una alta movilidad respecto a los demás componentes de la muestra.

2.3.7. Separación de proteínas mediante electroforesis capilar.

En la actualidad no hay forma de predecir con exactitud la movilidad electroforética de las proteínas, ya que están involucradas muchas interacciones proteína-pared del capilar. Esta es la razón por la que los factores que contribuyen a la migración proteica sean desconocidos. Sin embargo es razonable concluir que la movilidad electroforética de una proteína es función de su tamaño molecular y de su carga neta y ambos parámetros son función de la estructura tridimensional de la misma.

Para un capilar de sílice fundida se cumple el siguiente equilibrio:



Donde s representa a los grupos silanol sólidos. La ecuación muestra la desprotonación de la superficie del capilar para formar iones silicato. El pK_a de este equilibrio esta entre 4.5 y 5.0 dependiendo de las condiciones de la superficie del capilar y del tampón empleado (Tsuda, 1994).

Así por debajo de valores de pH 4, los silanoles estarán protonados y muchas proteínas no se adherirán a las paredes del capilar electrostáticamente, sin embargo, puede tener lugar la adsorción hidrofóbica, lo cual depende de la proteína analizada y del regulador utilizado.

A valores por encima de 8, las proteínas catiónicas se adsorberán iónicamente, y para valores de pH entre 4 y 8, el FEO varía considerablemente y esto influirá en los tiempos de migración de las proteínas (Tsuda, 1994).

Para la separación de proteínas, los reguladores juegan un papel esencial, ya que tienen influencia sobre las formas, tamaños y cargas de estas moléculas, así como sus interacciones. Para el análisis de estas biomoléculas suele emplearse con frecuencia aditivos que disminuyan las

interacciones proteína-pared del capilar o entre proteínas, o incluso mantener o aumentar la solubilidad proteica. Muchos aditivos se adsorben a la pared del capilar y modifican el FEO. Se suele usar surfactantes, sustancias zwitteriónicas, polímeros hidrofílicos, modificadores orgánicos, selectores quirales, iones metálicos, sustancias que potencien los puentes de hidrógenos, agentes complejantes y aminas cuaternarias.

La ECZ ha sido empleada para el análisis de proteínas de reserva, específicamente las prolaminas, de diferentes cereales y semillas como, trigo, avena, arroz, maíz, sorgo, cacahuete, entre otros. Las primeras metodologías se basaron en reguladores de fosfatos acidificados que empleaban capilares de diámetro pequeño (20 o 25 μm) (Bean & Lookhart, 2000; Siriamornpun, Onanong, Wantana, Naris, & Naret, 2010).

El uso de ácido iminodiacético (IDA) como buffer y electrolito soporte fue reportado por primera vez por Bossi y Righetti en 1997 para la separación de péptidos. El IDA tiene un pI aparente de ~ 2.33 y un intervalo de pH de 2.2 – 2.7 (dependiendo de la concentración y los aditivos), lo que puede ser aprovechado para que el capilar de sílice se encuentre en forma de silanoles, con ello se evita que las partes hidrofílicas de las proteínas interactúen con el capilar, ya que de otra manera hay alteraciones locales en el FEO y esto puede provocar baja reproducibilidad en la separación; bajo estas condiciones puede haber precipitación proteica debida a la interacción de las partes hidrofóbicas de las proteínas con el capilar que no presenta carga, para ello es necesario recubrir el capilar con alguna sustancia que evite dicha precipitación y/o aumente la solubilidad. También se encontró que el IDA tiene una buena solubilidad en soluciones que contienen un disolvente orgánico (Bean & Lookhart, 2000; Bossi & Righetti, 1997).

Para proporcionar un medio tamiz que recubra de manera dinámica el capilar y evitar que las proteínas se adhieran a éste, se puede utilizar hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), que además disminuye el FEO y aumenta la viscosidad del buffer obteniendo una mayor separación.

Para la solubilización de proteínas, se ha demostrado que el acetonitrilo (ACN) es igual de efectivo que la urea, además de presentar muy baja absorbancia en la región de ultravioleta (UV), no cristalizar y tener baja viscosidad, haciéndolo un excelente aditivo en los reguladores (Bean & Lookhart, 2000).

3. HIPÓTESIS.

Si existen referencias de la obtención de perfiles específicos de algunos tipos de proteínas como las prolaminas, presentes en granos como trigo, maíz y arroz por electroforesis capilar, con las cuales se han podido caracterizar sus variedades, entonces, los perfiles que podríamos obtener de la separación de las prolaminas de la chía nos pueden ser de gran utilidad para que con esta huella digital se puedan caracterizar perfiles específicos para identificar y clasificar diferentes variedades de ésta.

4. OBJETIVOS.

General.

Desarrollar una metodología para obtener el perfil electroforético de las prolaminas de la chía (*Salvia hispanica* L.) cultivada en diversas localidades de la República Mexicana, con la finalidad de caracterizar y clasificar las posibles variedades de chía en base al color de la semilla y ubicación geográfica, al no poder contar con una clasificación botánica completa.

Particulares.

Aplicar la metodología a la obtención del perfil electroforético de la chía cultivada de diversas localidades del país.

Realizar el estudio de los factores que influyen en la separación de las prolaminas de la chía por electroforesis capilar, con la finalidad de obtener las condiciones óptimas para la medición de éstas fracciones de proteínas y obtener la huella digital característica de la variedad.

Evaluar la precisión (repetibilidad y precisión intermedia) del método desarrollado para la medición de los perfiles de las prolaminas de la chía.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Equipo y reactivos.

Tabla 5.1. Equipo y reactivos utilizados.	
Equipo	Marca
Balanza analítica digital	Boeco
Centrifuga Allegra 21	Beckman Coulter
Desionizador Mili-Q, Direct-Q	Millipore
Equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System	Beckman Coulter
Parrilla con agitación digital	Thermolyne
pH-metro sensION + PH31	Hach
Tamiz No. 20	Cole-Parmer
Vortex Maxi Mix II	Thermolyne
Reactivo	Marca
Acetonitrilo Grado HPLC	J. T. Baker
Ácido etilendiamintetraacético	J. T. Baker
Ácido iminodiacético	Fluka Analytical
Agua desionizada	
Cloruro de potasio	Mallinckrodt
Etanol Grado HPLC	Fermont
Hexano (mezcla de isómeros)	Hycel
Hidróxido de sodio	Fermont
Hidroxipropilmetilcelulosa	Sigma
Tris(hidroximetil)amino-metano	Sigma

El análisis estadístico (%RSD y ANOVA) se realizó con el Software Statgraphics Centurion XVI®. El análisis clúster se realizó con el software estadístico Minitab® v16.1.0.0.

5.2. Material biológico.

Tabla 5.2. Semillas de chía analizadas*.			
ID	Color	Estado	Localidad
P.COL.DESC	Pinta	Colima	Desconocida.
P. JAL.ARE, ZAP	Pinta	Jalisco	La Arena, Zapotlanejo.
B.JAL.ARE, ZAP	Blanca	Jalisco	La Arena, Zapotlanejo.
P.JAL.TIE, ARA	Pinta	Jalisco	Tierra Roja, Arandas.
B.JAL.TIE, ARA	Blanca	Jalisco	Tierra Roja, Arandas.
P.JAL.TLA	Pinta	Jalisco	Tlajomulco de Zúñiga.
P.JAL.ACA	Pinta	Jalisco	Acatic.
P.JAL.DESC	Pinta	Jalisco	Desconocida.
P.MICH.MOR.M1	Pinta	Michoacán	Morelia. Mercado Santo Niño. M1.
P.MICH.MOR.M2	Pinta	Michoacán	Morelia. Mercado Independencia. M2.
P.MICH.MOR.M3	Pinta	Michoacán	Morelia. Mercado San Juan. M3.
P.OAX.OAX.M4	Pinta	Oaxaca	Oaxaca de Juárez. Mercado Benito Juárez. M4.
P.OAX.DESC.M5	Pinta	Oaxaca	Desconocida. M5.
P.PUE.MAT, ATZ	Pinta	Puebla	San Mateo Coatepec, Atzitzihuacán.
P.PUE.PUE	Pinta	Puebla	Puebla.
N.PUE.ATL	Negra	Puebla	Atlixco.
B.PUE.ATL	Blanca	Puebla	Atlixco.
P.PUE.ATL	Pinta	Puebla	Atlixco.
N.MOR.CUE	Negra	Morelos	Cuernavaca.
P.MOR.CUE	Pinta	Morelos	Cuernavaca.
B.MEX.TUL	Blanca	México	San Mateo, Tultitlán**.

*Todas las semillas fueron de origen doméstico (cultivadas).

**Sembradío a partir de semilla blanca de Tierra Roja, Arandas, Jalisco. (Siembra: Marzo 2013, Cosecha: Agosto 2013).



Figura 5.1. Semillas de chía. Esquina superior izquierda semilla negra, esquina superior derecha semilla pinta, abajo y al centro semilla blanca.

5.3. Pretratamiento y obtención de la harina desgrasada.

Para la obtención de la harina desgrasada de cada material biológico, se pesaron 100 g de semilla de chía y se molieron en un mezclador casero (licuadora) por 40 s a velocidad 2, enseguida se tamizó la harina integral por una malla del número 20 y de ésta se tomaron 10g para extraer el aceite utilizando un equipo Soxhlet, empleando como disolvente hexano (mezcla de isómeros) a 60 °C durante 5 horas en un proporción 1:13.

Adicionalmente se determinó humedad y aceites totales.

5.4. Determinación de aceites totales.

Se colocó el aceite extraído en cajas Petri (previamente llevadas a peso constante) y se lavó por duplicado el matraz bola con 5 a 10 mL de hexano, dicho disolvente se trasvaso en la caja de Petri respectiva; enseguida se evaporó durante 24h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se procedió a pesar la caja con el aceite, y por diferencia de peso se obtuvieron los gramos de aceite total contenido en la semilla de chífa analizada.

5.5. Determinación de humedad en la harina desgrasada.

Se utilizó como referencia el procedimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008 y se adecuó al material y equipo disponible en el laboratorio: Se pesaron 2 g de harina desgrasada en una caja de aluminio la cual previamente fue secada durante una hora a 120 ± 2 °C y enfriada en desecador durante una hora, obteniendo su peso constante. Enseguida se colocó la caja con la muestra dentro de la estufa y se secó a 120 ± 2 °C durante una hora, se tapó la caja y se llevó al desecador para enfriarla hasta temperatura ambiente durante una hora. A continuación se pesó y por diferencia de peso se obtuvo la humedad de la harina y el residuo como sólidos totales.

5.6. Extracción de las prolaminas con el método de Osborne modificado (Bean, Bietz, & Lookhart, 1998).

Se colocaron 0.7 g de harina desgrasada y 5 mL de una solución compuesta por hidrócloruro de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 50 mM, EDTA sódico 5 mM y cloruro de potasio 50 mM en tubos para centrifuga, se agitó continuamente durante 5 min en vórtex, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante el cual contenía albúminas y globulinas. Para enjuagar el pellet formado, se agregaron 3 mL de agua desionizada a cada tubo, se agitó durante 1 min, se centrifugó por segunda vez y se eliminó el sobrenadante. Para la extracción de prolaminas, se agregaron 5 mL de etanol al 70%, se agitó continuamente durante 10 min, se procedió a una última centrifugación, se recolectó el sobrenadante y se filtró mediante un acrodisco de 0.45 μ m.

5.7. Metodología para la medición de las muestras por electroforesis capilar.

La electroforesis se efectuó por triplicado para cada día de experimentación, con capilares de sílice fundida con recubrimiento externo de poliimididas bajo las condiciones mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 5.3. Condiciones de separación.	
Diámetro interno de 50 μm .	El buffer de separación estaba constituido por ácido iminodiacético (IDA) 75mM, acetonitrilo (ACN) 20% v/v e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) 0.05% p/v.
Longitud total del capilar de 32.0 cm.	
Longitud al detector de 21.5 cm.	
La detección se realizó a 200 nm.	pH=2.2-2.4
Las corrientes obtenidas oscilaron entre 18-20 μA .	Temperatura de 40 °C
Apertura del número 2.	Presión de 25 psi

El acondicionamiento del capilar al inicio del día, se realizó a una temperatura de 25°C con los siguientes lavados:

1. Lavado con agua desionizada durante 3 minutos.
2. Lavado con hidróxido de sodio de concentración 0.2 M durante 10 minutos.
3. Lavado con agua desionizada durante 5 minutos.
4. Lavado con buffer de separación durante 40 min.

Entre corridas se lavó el capilar con buffer de separación durante 15min.

Al finalizar el día, el capilar se lavó con agua desionizada durante 5 minutos.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

6.1. Comprobación del método reportado y evaluación de algunos factores que impactan en la separación de las prolaminas de la chía (Optimización del método de separación).

Se comprobó el método de separación reportado por Ramírez Milla (2011) en el que se utilizó un buffer con las siguientes características: IDA 50 mM, ACN 20% e HPMC al 0.05% (Buffer Referencia); el voltaje de separación fue de 15 kV y la apertura utilizada fue 8. Para esta experimentación se utilizó el material biológico proveniente del Estado de Colima (P.COL.DESC) y se analizó adicionalmente la influencia que tienen los días de refrigeración de las prolaminas sobre la obtención de su perfil electroforético. Para su estudio se realizaron tres experimentos: uno consistió en obtener el perfil de las prolaminas el mismo día de su extracción, mientras que en los otros dos se obtuvieron después de tres y siete días de refrigeración de la muestra utilizando un refrigerador convencional a 4 °C.

A continuación se muestra el perfil electroforético reportado por Ramírez Milla (2011) para las prolaminas de las semillas de chía pinta provenientes del Estado de Colima.

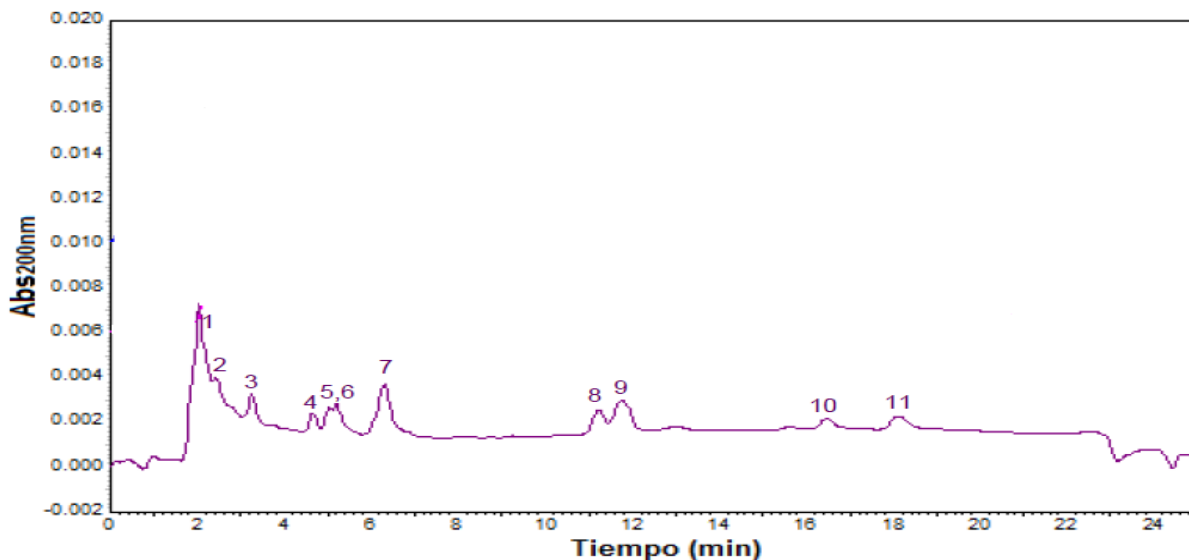


Figura 6.1. Perfil electroforético en el que se identifican once picos. Condiciones de separación: Regulador de IDA 50 mM, ACN 20% y HPMC al 0.05%, pH=2.2-2.3, 15 kV y 40 °C en un capilar de 50 µm d. i. x 31.5 cm. La detección se realizó a 200 nm.

6.1.1. Influencia del tiempo de refrigeración.

Al comenzar con la obtención de perfiles electroforéticos de las prolaminas, se observó que éste variaba con el tiempo de refrigeración, por lo que se realizó un estudio de este factor, comparándolo con muestras frescas, como se observa en la figura 6.2.

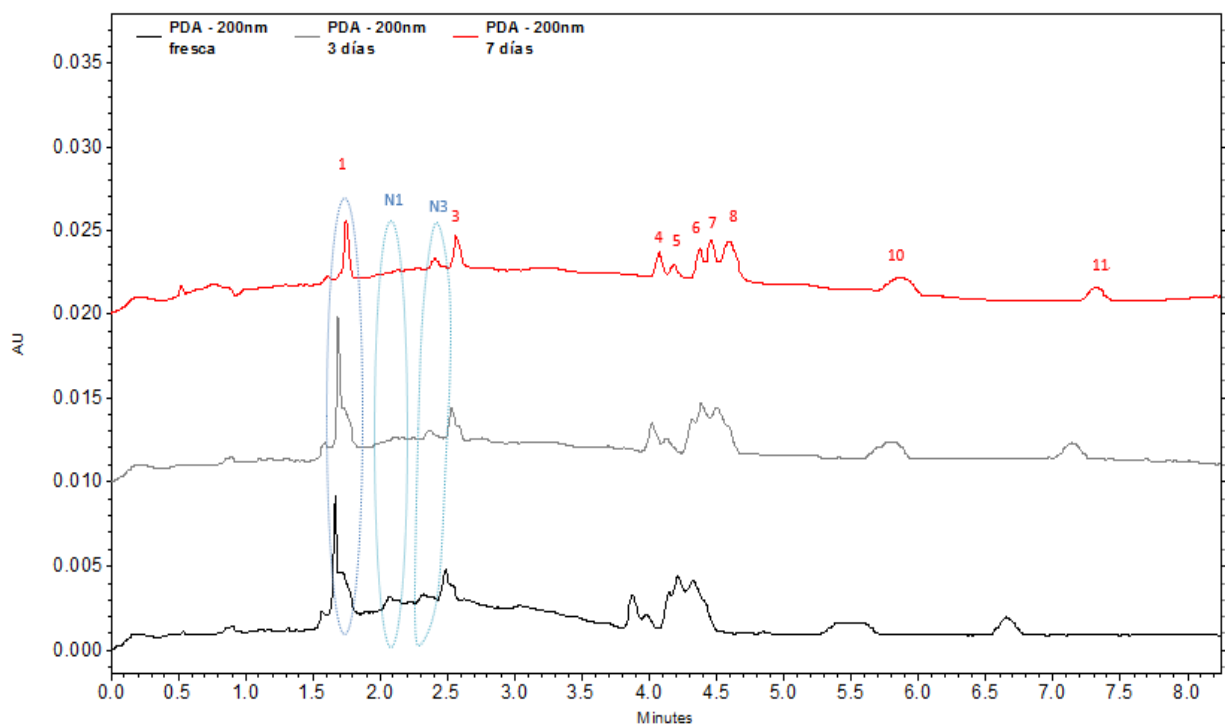


Figura 6.2. Comparativo de perfiles electroforéticos para muestra fresca (traza negra), 3 días de refrigeración (traza gris) y 7 días de refrigeración (traza roja).

Al analizar el electroforegrama anterior, y compararlo con el obtenido por Ramírez Milla (2011), se observó que los picos 2 y 9 no se detectan, además, aparecieron dos picos nuevos (N1 y N3) los cuales disminuyeron su señal al igual que el pico 1, posiblemente a la degradación de las prolaminas con el tiempo de su extracción. Esto es un factor importante ya que provoca perfiles incompletos o cierta incertidumbre en la identificación de picos; en base a esto se decidió utilizar muestras frescas en todas las experimentaciones siguientes.

6.1.2. Precisión intermedia.

Para la comprobación de la precisión intermedia del método reportado, se obtuvo el perfil electroforético en tres días diferentes (Figura 6.3).

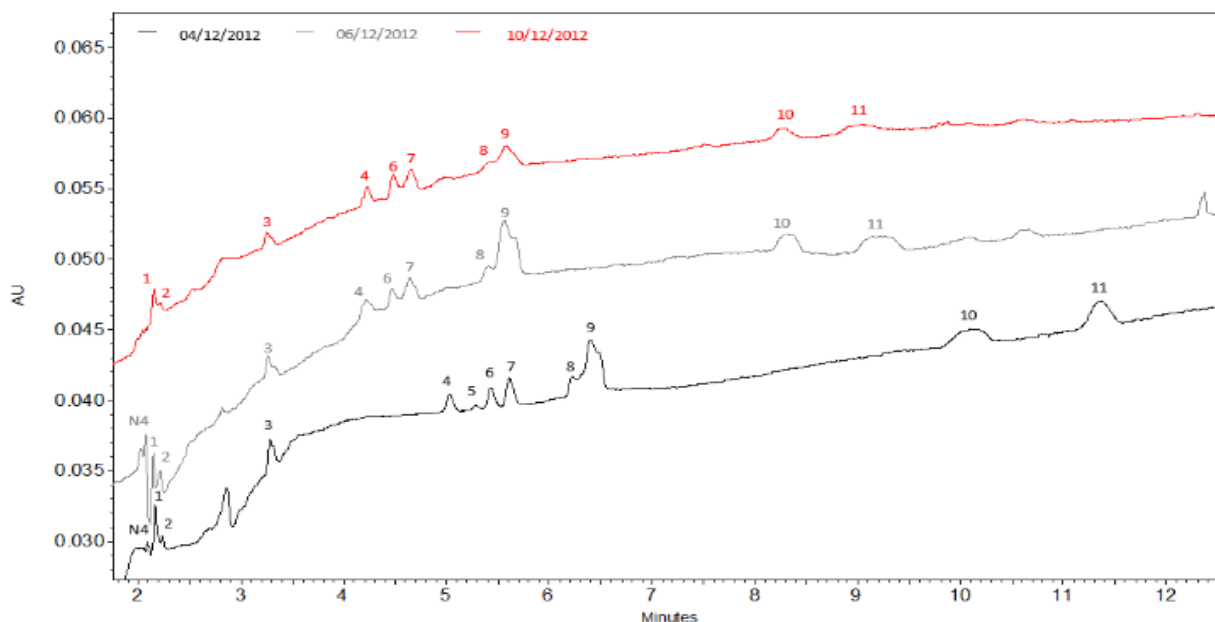


Figura 6.3. Comprobación de la precisión intermedia del método. Día uno (traza negra), día dos (traza gris) y día tres (traza roja).

A continuación se muestra una tabla que recopila los tiempos de migración de los picos obtenidos y sus respectivos porcentajes de desviación estándar relativa cuyo valor debe ser menor al 5% en sistemas biológicos para ser considerado como preciso.

Tabla 6.1. Tiempos de migración (min) bajo las condiciones reportadas por Ramírez Milla (2011) (15 kV y apertura 8).							
Picos/Corrida	A	B	C	D	E	F	%RSD*
1	2.18	2.18	2.18	2.18	2.14	2.15	0.85%
2	2.25	2.25	2.23	2.23	2.21	2.2	0.92%
3	3.29	3.29	3.39	3.31	3.25	3.25	1.57%
4	5.83	5.83	4.38	4.28	4.21	4.23	16.80%
5	5.3	5.28					0.27%
6	5.43	5.43	4.65	4.54	4.47	4.48	9.65%
7	5.62	5.62	4.83	4.72	4.62	4.64	9.57%
8	6.22	6.22	5.73	5.54	5.41	5.42	6.55%
9	6.4	6.4	5.91	5.73	5.56	5.58	6.49%
10	10.08	10.08	9.04	8.61	8.32	8.3	9.10%
11	11.33	11.35	10.24	9.68	9.21	9.1	9.90%
N4	2.1	2.1	2.13	2.05			1.58%

*En verde se muestran los picos repetibles y que además aparecen en todas las experimentaciones.

*En rojo se muestran los picos no repetibles.

En base a la tabla anterior, se observó que los tiempos de migración son menores respecto a los obtenidos por Ramírez Milla (2011), además de que solo se obtuvieron tres picos repetibles (1, 2 y 3). Debido a esto, se optimizó el método de separación, cuya primer modificación consistió en disminuir el voltaje a 10 kV, sin embargo no se obtuvo una mejora, y aun cuando los tiempos de migración obtenidos se acercan a los de referencia (debido a la disminución en la movilidad de las prolaminas), únicamente los picos 1, 2 y 3 fueron repetibles, así mismo los picos 5, 8 y N4 no aparecieron en algunas corridas (Figura 6.4 y Tabla 6.2).

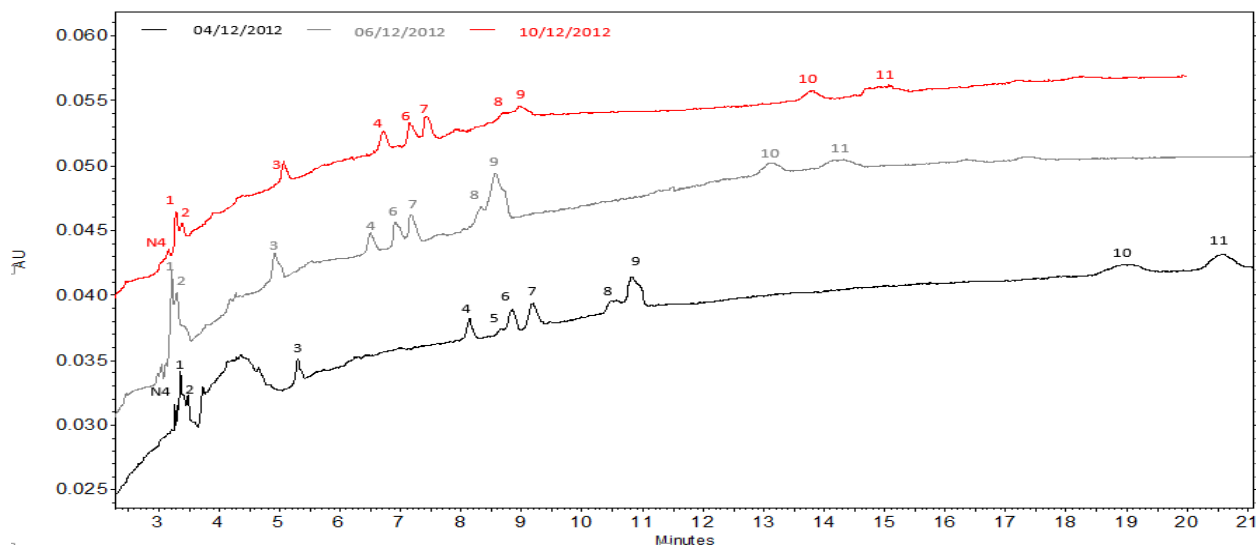


Figura 6.4. Separación a 10 kV. Día uno (traza negra), día dos (traza gris) y día tres (traza roja).

Tabla 6.2. Tiempos de migración (min) utilizando el buffer de referencia (10 kV y apertura 8).

Picos/Corrida	Día uno			Día dos			Día tres			%RSD*
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	3.41	3.35	3.35	3.21	3.21	3.21	3.22	3.22	3.29	2.38%
2	3.49	3.43	3.43	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.37	2.08%
3	5.33	5.29	5.29	4.89	4.89	4.89	4.92	4.99	5.05	3.76%
4	8.19	8.13	8.13	6.33	6.41	6.58	6.37	6.58	6.7	11.86%
5	8.73	8.69	8.63							0.58%
6	8.91	8.85	8.81	6.69	6.8	6.95	6.78	6.95	7.14	13.18%
7	9.26	9.18	9.16	6.95	7.04	7.19	7.05	7.24	7.42	13.21%
8	10.52	10.46	10.46	8.07	8.17	8.35				13.43%
9	10.89	10.83	10.79	8.3	8.43	8.56	8.44	8.71	8.96	12.34%
10	19.22	18.99	18.85	12.47	12.72	13.13	12.43	13.14	13.76	20.49%
11	20.81	20.58	20.48	13.71	13.99	14.16	13.53	14.23	14.93	20.22%
N4	3.34	3.31	3.31					3.12	3.16	3.09%

Al comparar los porcentajes de desviación estándar relativa (%RSD) para los dos voltajes utilizados (Tabla 6.3), se encontró que a 10 kV disminuye la precisión de la separación ya que aumenta el valor del porcentaje de desviación estándar relativa. Esto es provocado muy probablemente debido a la permanencia de las prolaminas durante más tiempo dentro del capilar, causando que los picos se ensanchen con una consecuente disminución de la eficiencia de separación (probablemente debido a procesos de adsorción), por lo que la precisión mejora a menores tiempos de migración, en este caso utilizando 15 kV.

Tabla 6.3. Porcentajes de desviación estándar relativa (%RSD) para el buffer de referencia.

Picos/Voltaje	15 kV	10 kV
1	0.85%	2.38%
2	0.92%	2.08%
3	1.57%	3.76%
4	16.80%	11.86%
5	0.27%	0.58%
6	9.65%	13.18%
7	9.57%	13.21%
8	6.55%	13.43%
9	6.49%	12.34%
10	9.10%	20.49%
11	9.90%	20.22%
N4	1.58%	3.09%

Una vez establecido el voltaje de separación a 15 kV, se decidió variar el tamaño de la apertura del haz incidente de ocho y dos al realizar la detección, así como modificar la concentración de ACN e IDA, quedando las siguientes combinaciones (Tabla 6.4, Figura 6.5 y 6.6).

Tabla 6.4. Condiciones para la optimización del método de separación.*						
Buffer	Apertura	Voltaje (kV)	[IDA] (mM)	% ACN (v/v)	% HPMC (p/v)	
Referencia	8	15	50	20	0.05	
	2					
R1	8					
	2					
R2	8					
	2					
R3	8			75		20
	2					
R4	8	100	20			
	2					

*El aumento de la concentración de ACN aumenta la solubilidad de las prolaminas y el aumento en la concentración de IDA proporciona una disminución en la adsorción de las mismas en el capilar.

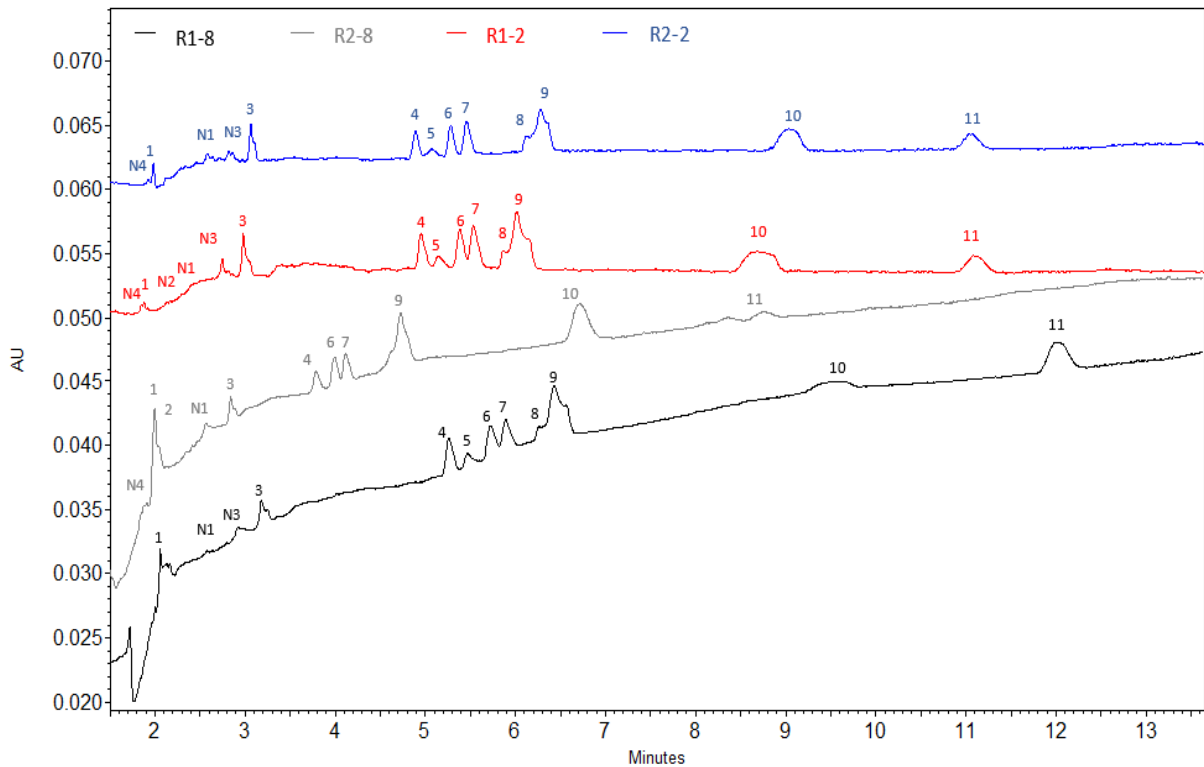


Figura 6.5. Efecto del ACN. En negro y rojo se muestra el perfil electroforético para R1 con apertura 8 y 2 respectivamente; en gris y azul se muestra R2 con apertura 8 y 2 respectivamente.

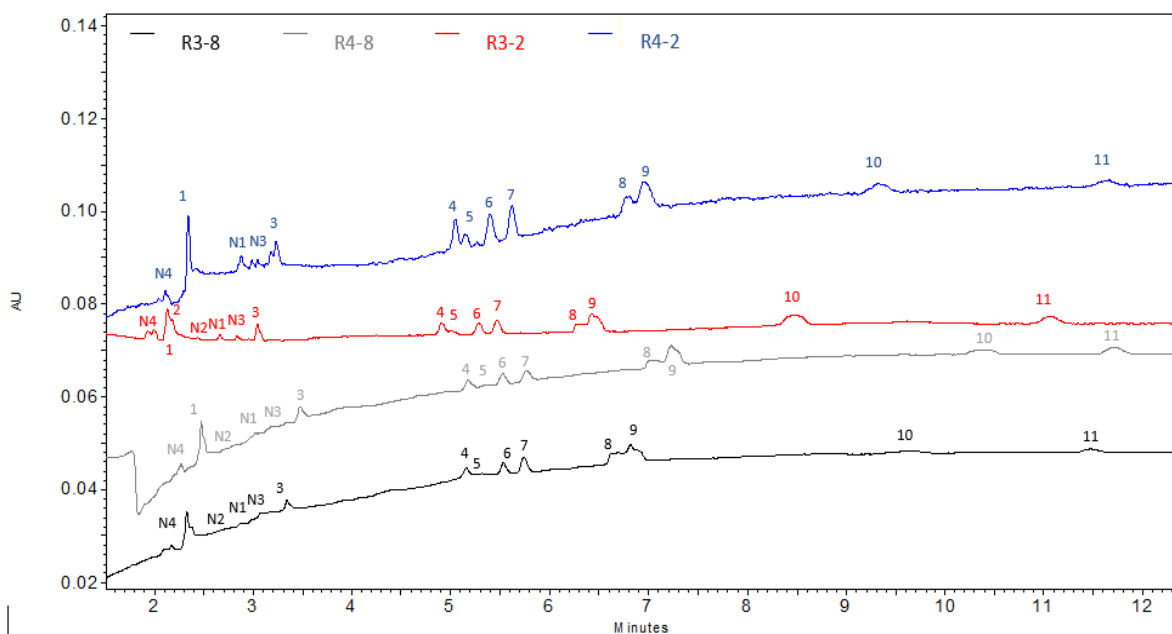


Figura 6.6. Efecto del IDA. En negro y rojo se muestra el perfil obtenido para R3 con apertura 8 y 2 respectivamente; en gris y azul se muestra el perfil para R4 con apertura 8 y 2 respectivamente.

Tabla 6.5. Porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) para los diferentes reguladores.*										
Apertura	8					2				
Voltaje (kV)	15									
Picos/Buffer	Referencia	R1	R2	R3	R4	Referencia	R1	R2	R3	R4
1	0.85%	9.72%	6.33%	3.79%	2.32%	5.73%	1.95%	0.27%	5.87%	5.55%
2	0.92%					6.42%			1.82%	
3	1.57%	11.48%	8.49%	2.49%	5.48%	7.88%	0.59%	1.04%	1.61%	2.49%
4	16.80%	8.56%	3.54%	5.90%	0.76%	12.31%	1.60%	6.65%	0.82%	0.54%
5	0.27%	9.48%		1.61%	0.18%		1.71%	0.40%	1.03%	0.00%
6	9.65%	8.55%	3.46%	7.03%	1.42%	12.99%	1.73%	7.54%	0.80%	0.63%
7	9.57%	8.86%	3.58%	7.09%	1.15%	13.46%	1.93%	7.90%	0.93%	0.73%
8	6.55%	10.69%		6.98%	0.84%	15.26%	2.14%	0.33%	0.98%	1.84%
9	6.49%	10.60%	5.08%	7.08%	1.04%	15.70%	2.30%	0.37%	1.39%	1.21%
10	9.10%	15.45%	5.40%	0.76%	3.71%	28.63%	3.65%	10.88%	3.36%	4.66%
11	9.90%	9.97%	5.04%	2.66%	2.25%	27.92%	4.46%	13.31%	1.74%	1.47%
N1		0.85%	5.70%	4.29%	3.90%	7.16%	0.00%	0.00%	3.38%	0.31%
N2				1.86%	0.00%		0.00%		5.43%	
N3		1.49%		2.07%	3.89%	7.29%	0.00%	0.00%	3.08%	1.71%
N4	1.58%		3.20%	3.97%	1.48%	6.78%	2.80%	0.00%	1.09%	2.49%

*La recopilación de los tiempos de migración se encuentra en los anexos, tablas A1-A4.

Realizando el análisis de varianza multifactorial de los datos (Ver tabla AN.1 en los anexos), podemos concluir que los factores que influyen de forma significativa en el aumento de %RSD (disminución de la precisión) son la concentración de IDA y el porcentaje de ACN, mientras que el tamaño de la apertura no influyen significativamente.

Al aumentar la proporción de ACN (Fig. 6.5, R2) se detectó un menor número de picos en comparación a los picos detectados al disminuir dicha proporción (Fig. 6.5, R1), esto puede ser debido a la modificación de polaridad del buffer, causando una menor diferencia entre los valores de movilidad de las diferentes prolaminas y por tanto una menor resolución en las señales; al aumentar la concentración de IDA (Fig. 6.6, R3 y R4) se observó una mayor cantidad de picos debido a un aumento en la resolución de las señales causada probablemente por la disminución del flujo electroosmótico y a una disminución en la adsorción de las prolaminas en el capilar por la limitación de interacciones iónicas; el uso de la apertura dos (aunque no influye significativamente de acuerdo al ANOVA multifactorial) únicamente tuvo utilidad en los buffer R1-R4 (Fig. 6.5 y 6.6), obteniéndose una mayor detección de picos y con mayor resolución debido a que el haz de luz es más delgado, disminuyendo la probabilidad de traslape de señales.

De acuerdo con el análisis anterior y al tomar en cuenta el mayor número de picos presentes y su precisión, se determinó que el buffer R3 (75 mM de IDA, 20% ACN), apertura 2, y voltaje de 15 kV son las condiciones más favorables para la separación de las prolaminas de la chíá por lo que a continuación se muestra un estudio de la precisión intermedia de dicho método utilizando dos lavados iniciales diferentes (acondicionamiento del capilar).

De acuerdo con Albillos García (2003) quién analizó, entre otras cosas, el lavado inicial del capilar con NaOH a diferentes concentraciones para el análisis de caseínas en productos lácteos y determinando que dicho lavado no tiene una influencia sobre la separación, se decidió realizar el estudio de la repetibilidad y precisión intermedia llevando a cabo lavados iniciales con y sin NaOH (Lavado A y B respectivamente).

Condiciones de lavado A: (25psi y T=25°C).

1. Lavado con agua durante 3 minutos.
2. Lavado con [NaOH]=0.2M durante 10 minutos.
3. Lavado con agua durante 5 minutos.
4. Lavado con regulador durante 40 minutos.
 - a. Entre corridas se lavó el capilar con regulador durante 15 minutos.

Condiciones de lavado B (25psi y T=25°C).

1. Lavado con regulador durante 40 minutos.
 - a. Entre corridas se lavó el capilar con regulador durante 15 minutos.

Para ambos lavados se llevaron a cabo 30 corridas de manera continua durante dos días.

Los resultados se muestran a continuación.

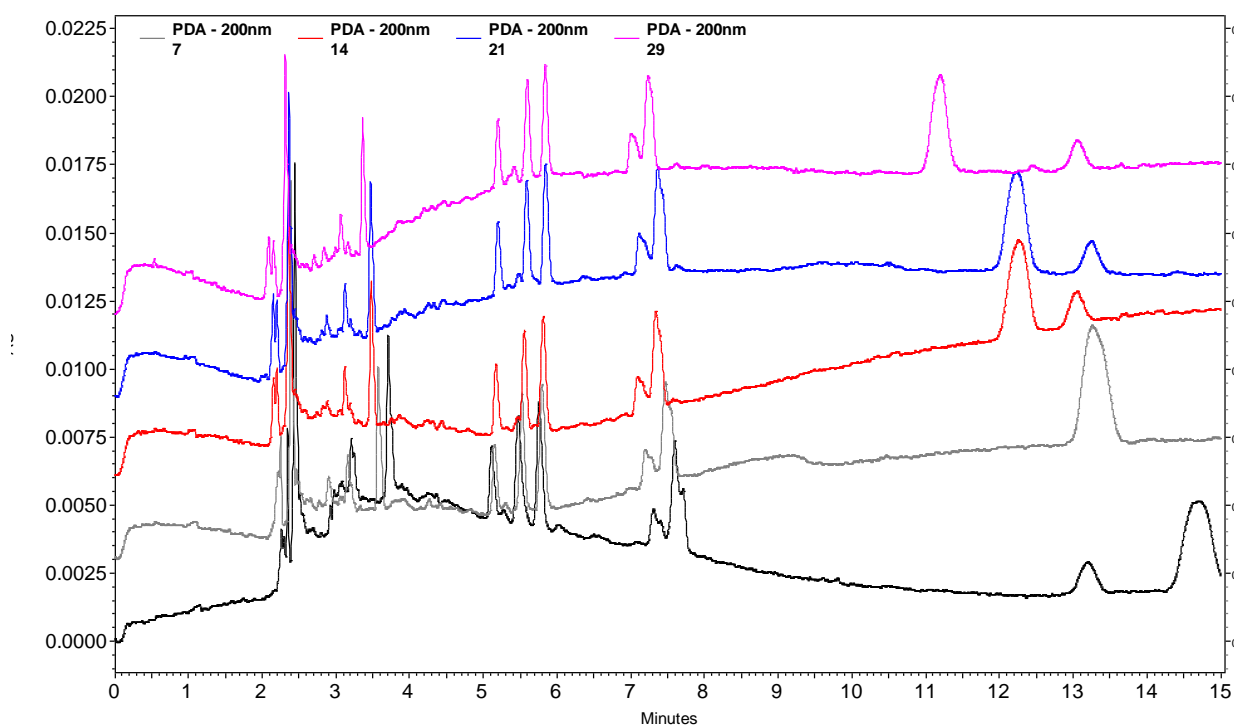


Figura 6.7. Repetibilidad día uno con lavado inicial A. De abajo hacia arriba se muestran las corridas 1, 8, 15, 22 y 30.

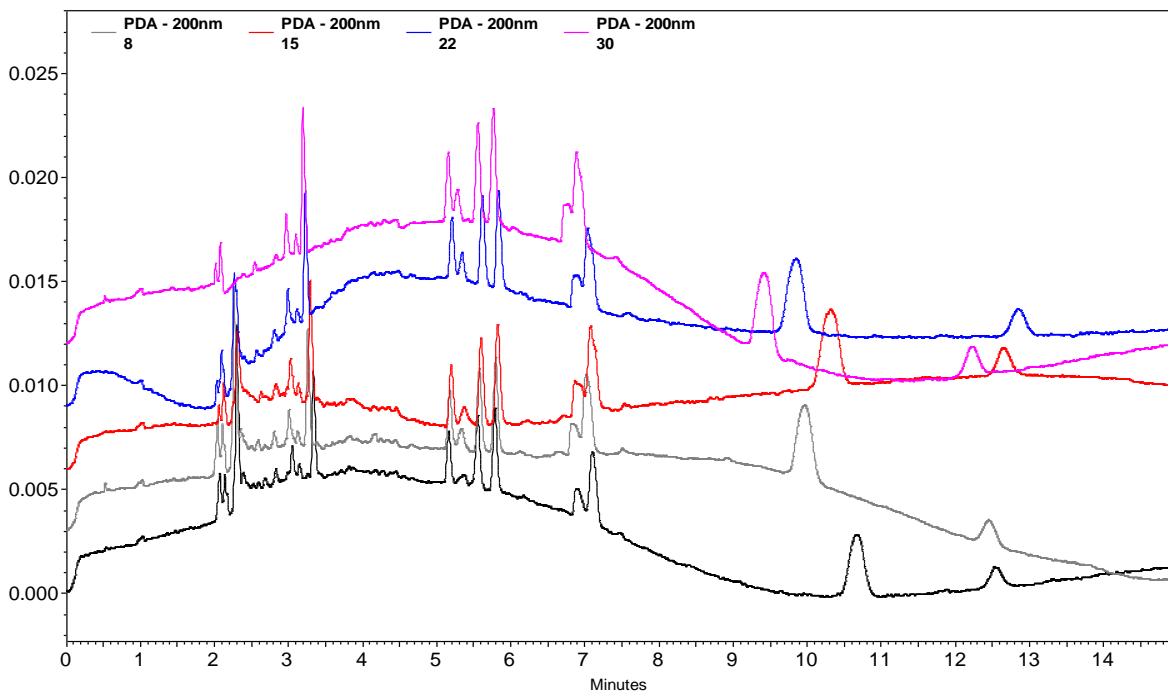


Figura 6.8. Repetibilidad día dos con lavado inicial A. De abajo hacia arriba se muestran las corridas 1, 8, 15, 22 y 30.

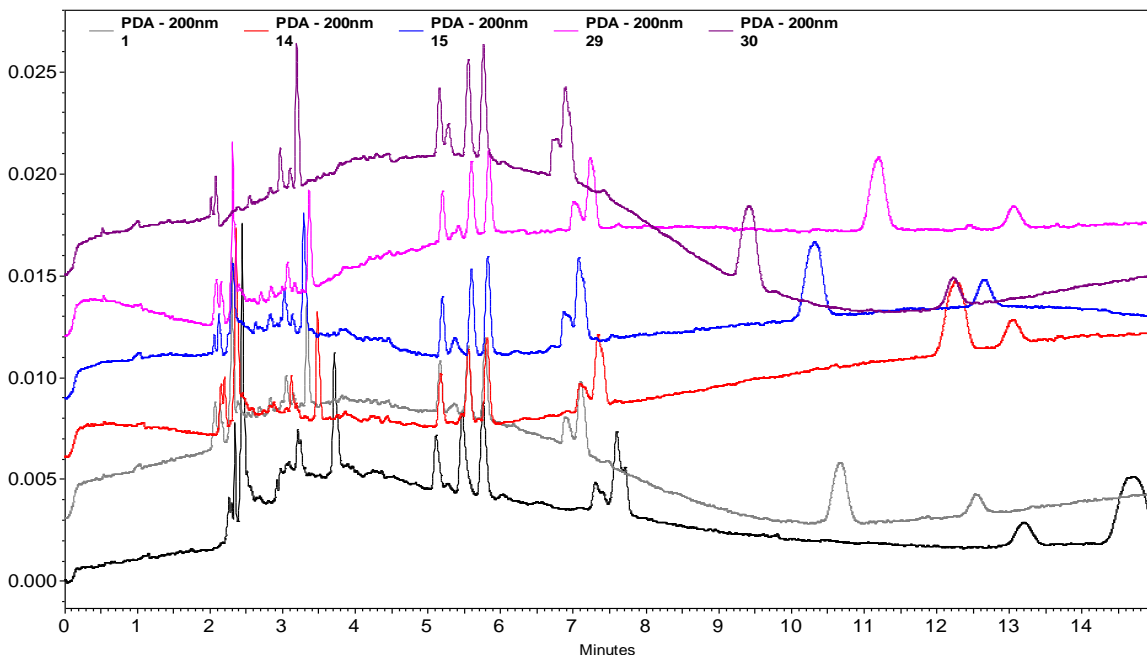


Figura 6.9. Precisión intermedia con lavado inicial A. De abajo hacia arriba se muestran las corridas 1, 15 y 30 para ambos días.

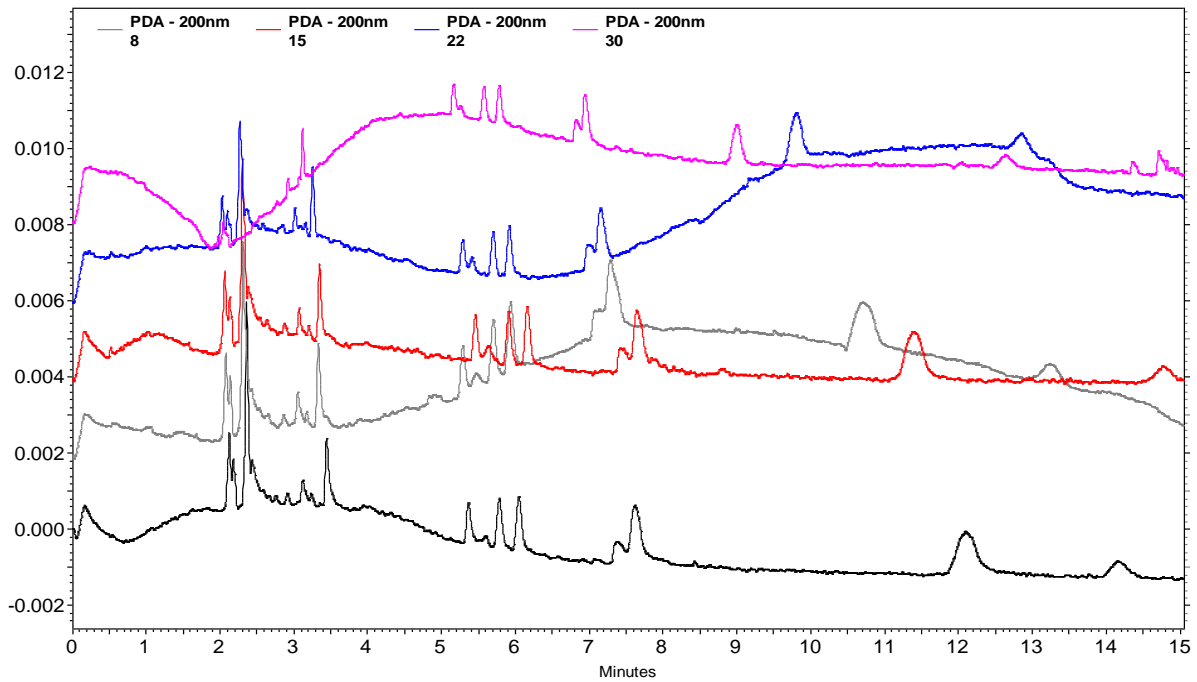


Figura 6.10. Repetibilidad día uno con lavado inicial B. De abajo hacia arriba se muestran las corridas 1, 8, 15, 22 y 30.

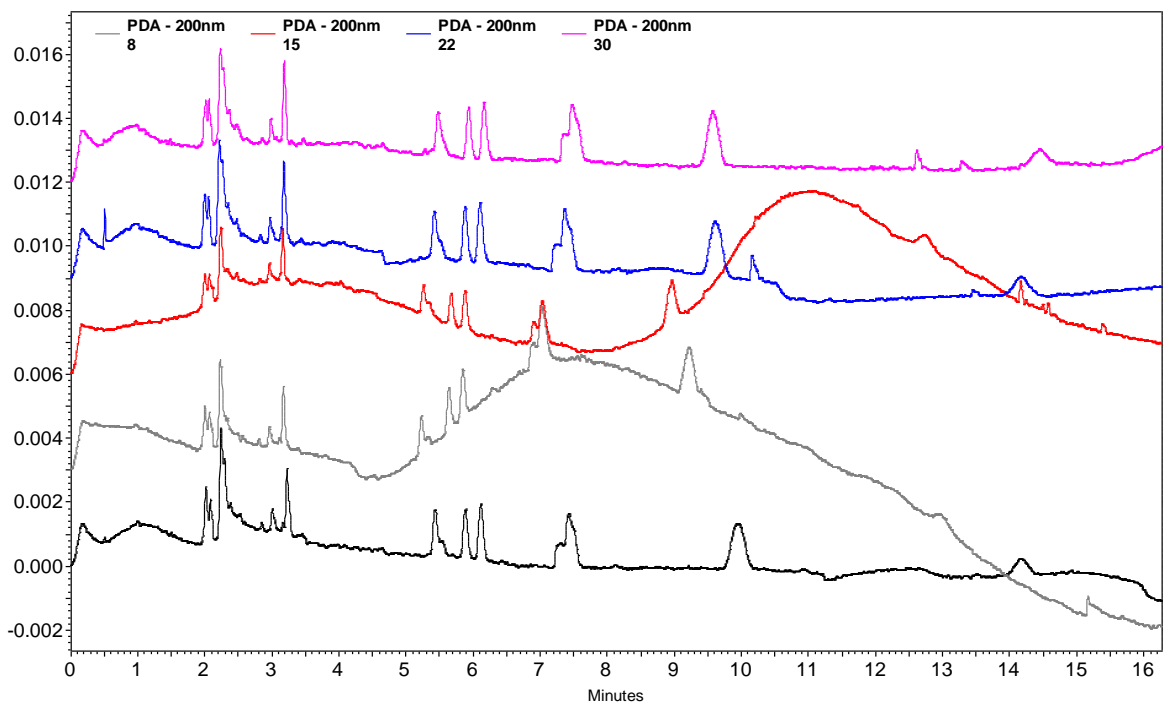


Figura 6.11. Repetibilidad día dos con lavado inicial B. De abajo hacia arriba se muestran las corridas 1, 8, 15, 22 y 30.

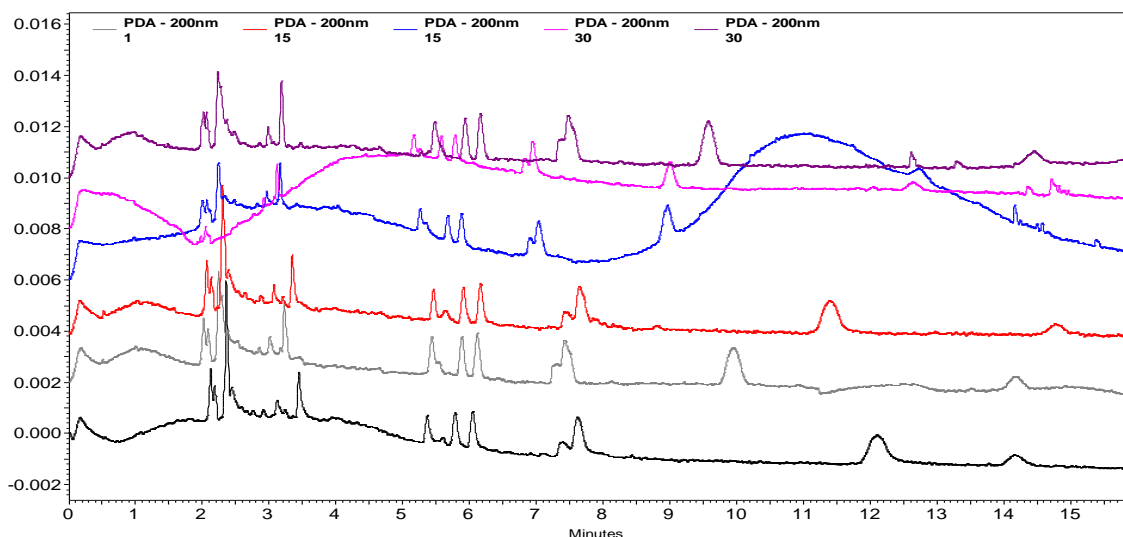


Figura 6.12. Precisión intermedia con lavado inicial B. De abajo hacia arriba se muestran las corridas 1, 15 y 30 para ambos días.

En la siguiente tabla se muestra el análisis de precisión intermedia para ambas condiciones de lavado, y para cada una de ellas se muestra el conteo de corridas en las que se identificó cada uno de los picos, sus porcentajes de desviación estándar relativa (%RSD) y tiempos de migración promedio.

Tabla 6.6. Repetibilidad y precisión intermedia en función del tipo de lavado inicial.						
Picos/Condición	Lavado A			Lavado B		
	Día 1	Día 2	Precisión intermedia	Día 1	Día 2	Precisión intermedia
1	1.72%	3.56%	3.99%	1.63%	0.34%	2.00%
2	2.04%	3.71%	4.56%	1.23%	1.75%	2.62%
3	3.04%	1.44%	4.65%	3.21%	0.75%	2.94%
4	0.67%	0.39%	0.57%	2.17%	1.82%	2.04%
5	1.51%	0.45%	1.19%	2.87%	2.09%	2.64%
6	0.82%	0.47%	0.75%	2.26%	2.03%	2.20%
7	0.53%	0.43%	0.48%	2.51%	2.09%	2.33%
8	1.32%	0.62%	2.38%	3.46%	2.63%	3.05%
9	1.52%	0.82%	2.93%	3.95%	2.53%	3.32%
10	5.49%	3.91%	11.48%	10.23%	2.69%	9.65%
11	4.34%	1.41%	4.56%	6.18%	4.66%	5.41%
N1	0.75%	1.32%	1.70%	1.64%	1.55%	1.61%
N2	1.67%	2.04%	2.59%	2.52%	0.89%	3.78%
N3	1.60%	2.76%	2.90%	2.19%	3.26%	3.03%
N4	2.95%	2.04%	4.09%	2.11%	0.54%	1.99%

Con el lavado inicial A, se determinó que para cada día de experimentación (Figura 6.7 y 6.8) se obtienen picos repetibles a excepción del número 10, el cual tiene un %RSD de 5.49% el primer día y no así para el segundo cuyo %RSD es de 3.91% (Ver anexos, Tablas A5 y A6). Al realizar un análisis de la precisión intermedia del sistema (Figura 6.9 y Tabla 6.6), se notó que nuevamente este pico tiene un %RSD muy superior al 5% probablemente debido a la baja carga, forma, gran tamaño y viscosidad de dicha prolamina, lo que causa que haya variaciones en su velocidad y que incluso pueda haber diferencias en la fuerza de fricción entre dicha prolamina y las paredes del capilar provocando modificaciones en su tiempos de migración.

Bajo las condiciones de lavado B, se halló que para cada día de experimentación (Figura 6.10 y 6.11) se obtienen picos repetibles a excepción de los picos 10 y 11, los cuales tienen un %RSD de 10.23% y 6.18% respectivamente en el primer día, mientras que en el segundo día se consideran repetibles (Ver anexos, Tablas A7 y A8). Al realizar un análisis de la precisión intermedia del sistema (Figura 6.12 y Tabla 6.6), se percató nuevamente que ambos picos tienen un %RSD superior al 5% y al igual que en el lavado A, es probable que esta diferencia en los tiempos de migración se deba a la misma causa.

Tomando en cuenta los resultados del ANOVA de una vía para los datos anteriores (Ver anexo, Tabla AN.2), se determinó que no existe una influencia significativa del tipo de lavado (A o B) en los %RSD obtenidos, por lo que se puede utilizar cualquiera de los dos lavados y se obtendrán %RSD similares, aunque, es importante recalcar que con el lavado B, hubo problemas en la estabilidad de la línea base, ruido y fluctuaciones en la corriente generada, causado posiblemente a la acumulación de material adsorbido dentro del capilar. Por tal motivo se seleccionó el lavado A para realizar las mediciones posteriores.

La importancia de la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia del método de separación, radica en conocer la variación de los tiempos de migración, ya que al obtener el perfil electroforético de las diferentes semillas de chíá, se debe tener certeza en la identificación de señales para poder compararlos. En el caso de los picos 10 y 11, se observó que sus tiempos de migración en las muestras son poco precisos, lo que causa que su detección sea a diferentes tiempos e incluso pudiéndose traslapar las señales en algunas corridas.

6.2. Obtención y comparación de la huella digital de las diferentes muestras.

La obtención de perfiles se realizó por triplicado y en tres días diferentes para corroborar la repetibilidad de las mediciones. Para la asignación de picos previamente identificados, así como de algunos nuevos, se utilizó los tiempos de migración y la forma de los picos. A continuación se muestra una tabla que recopila los picos presentes en cada una de las muestras. En rojo se indican los picos que son comunes a todas las muestras, los demás se consideran picos diferenciales al estar o no presentes en algunas muestras.

Tabla 6.7. Picos presentes en las diferentes semillas de chía.																																									
Color*	Estado	Localidad	Picos																																						
			N4B	N4A	N4	1	2	2A	N2	N2A	N1	N1A	N3	N3A	3	3A	3B	3C	3D	4	5	6	7	7A	7A1	7B	8	8A	9	9A	9B	9C	10	11							
P	Col.	Desconocida		x	x	x	x				x		x	x	x	x			x	x	x	x	x									x	x								
P	Jalisco	La Arena, Zapotlanejo		x	x	x	x		x		x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x									x	x								
B		La Arena, Zapotlanejo		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x				x	x	x	x										x	x							
P		Tierra Roja, Arandas		x	x	x	x		x		x		x	x	x	x				x	x	x	x	x										x	x						
B		Tierra Roja, Arandas		x	x	x	x	x	x		x		x	x	x	x				x		x	x	x											x	x					
P		Tlajomulco de Zúñiga		x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x												x	x				
P		Acatic		x	x	x	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x													x	x				
P		Desconocida		x	x	x	x		x		x		x	x	x	x	x				x	x	x	x	x											x	x				
P	Mich.	Morelia. M1.		x	x	x	x		x		x		x	x	x					x	x	x	x	x												x	x				
P		Morelia. M2.		x	x	x	x		x		x		x	x	x					x	x	x	x	x													x	x			
P		Morelia. M3.		x	x	x	x		x		x		x	x	x					x	x	x	x	x														x	x		
P	Oax.	Oaxaca de Juárez. M4.		x	x	x			x		x		x	x	x					x	x	x	x														x	x			
P		Desconocida. M5.		x	x	x	x		x		x		x	x	x	x	x				x	x	x	x														x	x		
P	Puebla	San Mateo Coatepec, Atzizihuacán	x	x	x	x					x	x	x		x	x	x			x	x	x	x	x														x	x		
P		Puebla		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x															x	x	
N		Atlixco		x	x	x	x		x		x		x	x	x			x	x	x	x	x	x		x	x														x	x
B		Atlixco		x	x	x	x		x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																	x
P	Atlixco		x	x	x	x		x		x		x		x						x		x	x																	x	x
N	Mor.	Cuernavaca			x	x	x		x		x		x		x		x			x	x	x	x																x	x	
P		Cuernavaca		x	x	x	x		x		x		x		x		x	x	x	x	x	x	x																		x

*Color de la semilla. B: Blanca. N: Negra. P: Pinta.

Al realizar el análisis ANOVA multifactorial de la cantidad de picos diferenciales (Ver anexo, Tabla AN.3), se determinó que no existe una influencia significativa de la localidad de origen y el color de semilla sobre la cantidad de picos diferenciales, esto indica que las semillas de chíá analizadas no son variedades diferentes o cultivares diferentes provenientes de una variedad (aunque serían necesarios otros estudios y ciencias para confirmar o descartar este hecho, tal como morfología comparada, anatomía comparada, embriología, citología, palinología, paleobotánica, fitogeografía, etnobotánica, entre otras). Sin embargo, es posible diferenciar entre todas las muestras analizadas, puesto que existen picos que aparecen en solo algunas de las semillas (Tabla 6.7),

En la actualidad, los términos ‘variedad’ o ‘variedad botánica’ y ‘cultivar’ o ‘variedad cultivada’ son utilizados como sinónimos, aunque botánicamente tienen significados diferentes. Una variedad es parte de una especie, prospera espontáneamente (sin intervención del ser humano) y es el resultado de un proceso evolutivo; en contraste, un cultivar es una especie que prospera gracias a la intervención del hombre, no es el producto de un proceso evolutivo espontáneo (Benítez de Rojas, y otros, 2006), es genéticamente homogénea, comparte características de relevancia agrícola que permite distinguir claramente a una población de las demás poblaciones de la especie y traspasa esas características de generación en generación (Infoagro Systems, S.L., 2014).

De acuerdo con Bean y Lookhart (2010) es posible diferenciar mediante electroforesis capilar y en condiciones de separación similares a las utilizadas en este trabajo, cereales como el trigo, avena, arroz y cebada, utilizando las prolaminas contenidas en los granos.

Para comprobar si los cambios en los picos están determinados por las condiciones de crecimiento (ubicación geográfica), se sembró semilla de chíá blanca en San Mateo, Tultitlán, Edo. de México a partir de semilla blanca proveniente de la localidad de Tierra Roja, Arandas, Jalisco y se obtuvo el siguiente perfil.

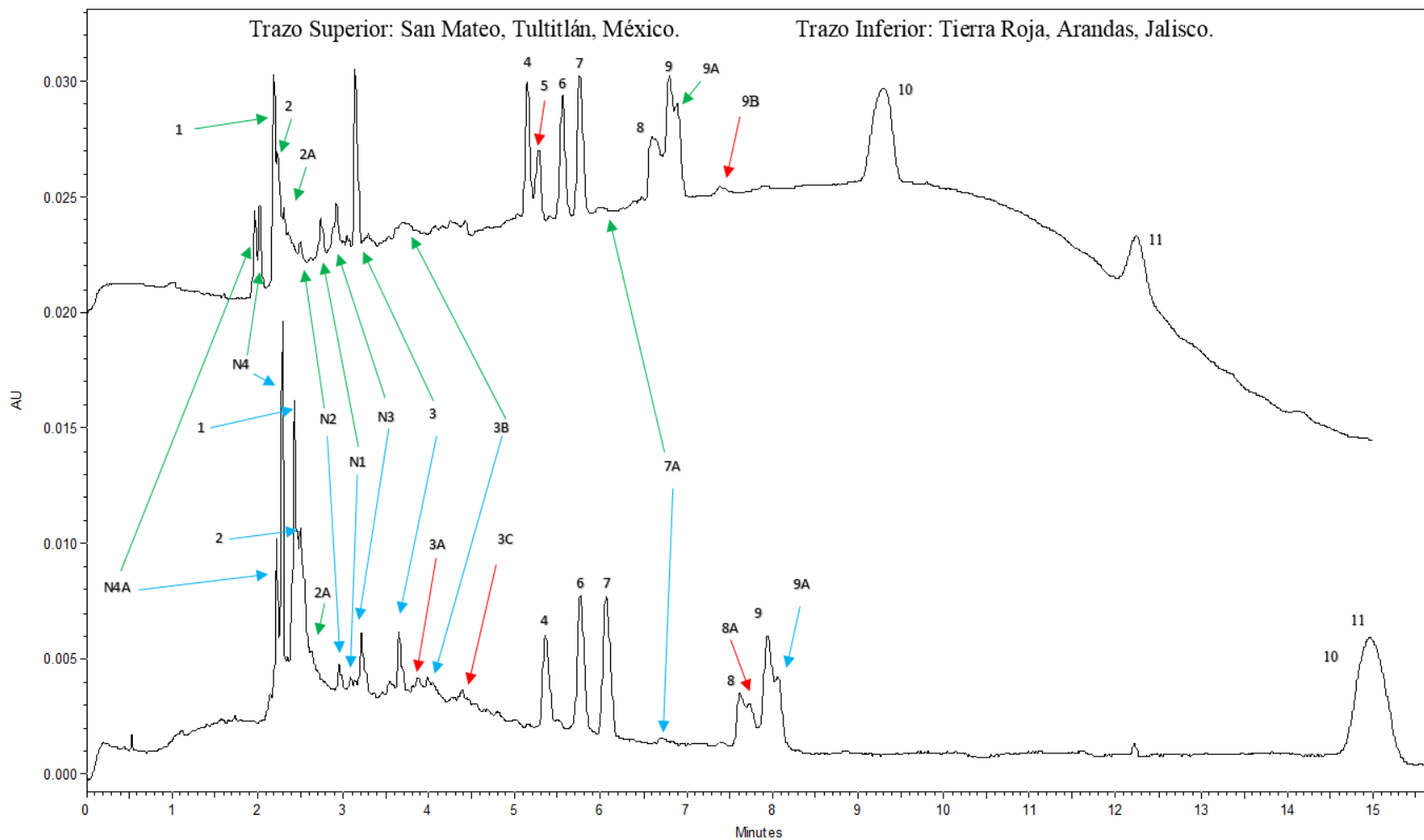


Figura 6.13. San Mateo, Tultitlán, México vs Tierra Roja, Arandas, Jalisco. Semilla blanca.

En azul se muestran los picos de las semillas cultivadas en Tierra Roja, Arandas, Jalisco (Nota: Los picos 10 y 11 se han traslapado); en verde los picos identificados para las semillas de San Mateo, Tultitlán, México, y en rojo los picos diferenciales.

Al comparar ambos perfiles se observó que los picos característicos para las semillas cultivadas en San Mateo fueron los 5 y 9B, en contraste a los picos 3A, 3C y 8A correspondientes a la semilla originaria de Tierra Roja.

A continuación se muestran algunas de las características geográficas de ambas localidades en la siguiente tabla (INAFED Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Secretaría de Gobernación., 2010):

Tabla 6.8. Características geográficas para las localidades de San Mateo (Méx.) y Tierra Roja (Jal.)		
Geografía	Tierra Roja, Arandas, Jalisco	San Mateo, Tultitlán, México
Latitud Norte	20°36'30"	19°37'3"
Longitud Oeste	102°37'00"	99°8'40"
Altitud (msnm)	2000	2288
Suelo	Planosol Eútrico	Feozem
Clima	Semiseco con invierno seco y semicálido, sin cambio térmico invernal bien definido.	Subtropical de altura o semiseco templado y sin cambio térmico invernal bien definido.
Temperatura Media (°C)	19.0	15.7
Régimen de lluvias	Julio-Septiembre	Mayo-Octubre
Precipitación (mm)	888.1	700

El suelo Planosol Eútrico es un suelo plano el cual ha sido generalmente desarrollado en relieves planos que en alguna parte del año se inunda. Posee un subsuelo arcilloso que disminuye el drenaje considerablemente, además de ser pobre en nutrientes.

En cuanto al suelo Feozem, éste es una tierra parda el cual posee una capa superficial oscura, rica en materia orgánica y nutrientes. Es un suelo que tolera el exceso de agua, con buen drenaje y de fertilidad moderada.

Con esto, se demuestra que los cambios en los perfiles electroforéticos están determinados por las condiciones de crecimiento para una misma semilla.

Para determinar si hay alguna similitud entre las semillas de chíá analizadas provenientes de diferentes regiones de la República Mexicana, se realizó un análisis de conglomerados, en donde la medida de similitud fue la distancia euclidiana cuadrada y la medida de agrupación jerárquica fue la distancia de Ward (Anexo 9.3.2); se utilizó como variables a los picos detectados y el valor que tomaron dichas variables fue de cero para indicar ausencia y de uno para indicar la presencia del pico. A continuación se muestra el dendrograma obtenido.

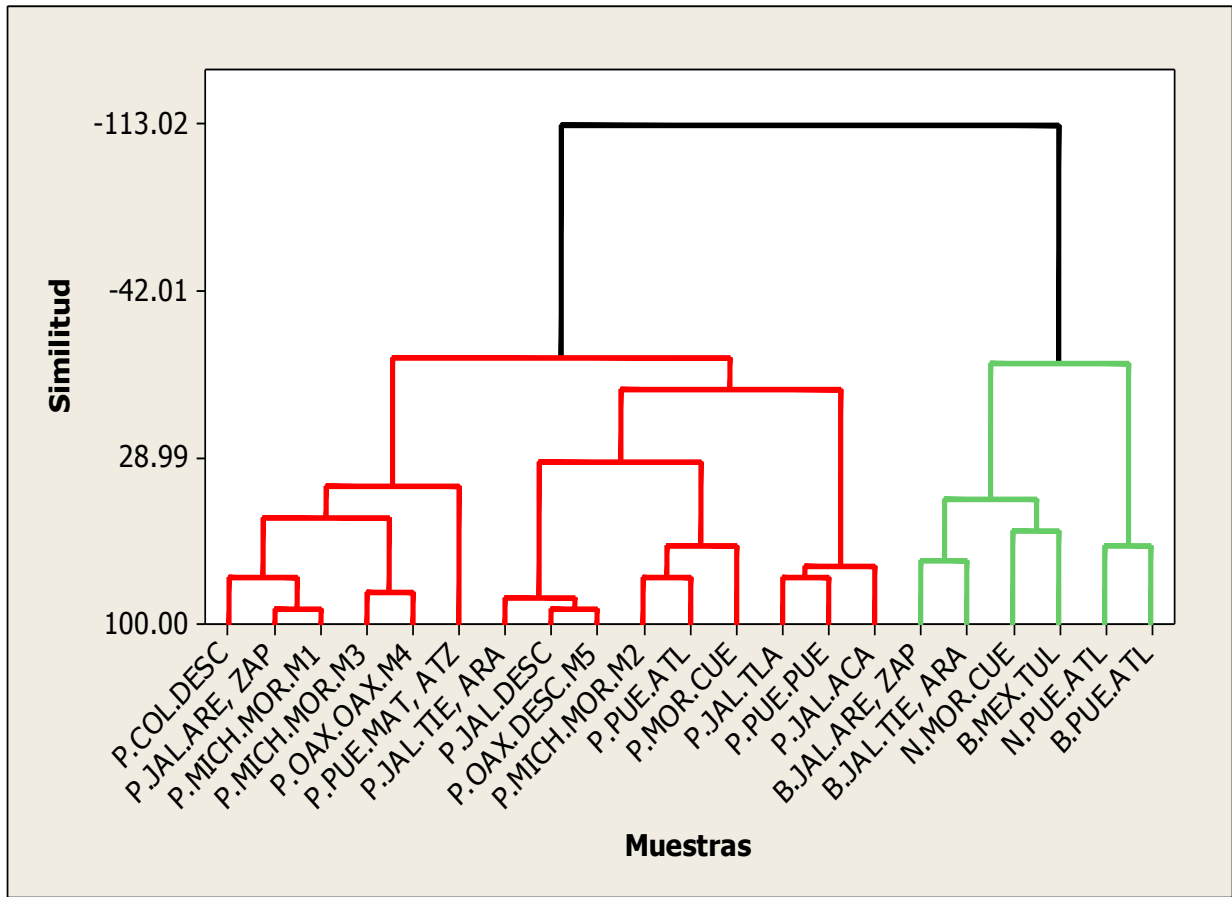


Figura 6.14. Dendrograma para las muestras de chíá analizada.

Al analizar el dendrograma, se observó que las semillas se agrupan en dos grupos diferentes, por un lado aquellas semillas que son pintas y que tienen una mayor similitud entre sí (trazo rojo), y en el otro grupo aquellas semillas blancas y negras que también guardan una similitud entre sí (trazo verde); con esto se comprueba que las semillas blancas son producto de la domesticación y selección física por el hombre, tal como lo reporta Cahill y Provance (2002), quienes indican que el color blanco no se presenta con frecuencia entre poblaciones silvestres. En cuanto a las semillas negras provenientes de Cuernavaca, Morelos y Atlixco, Puebla, al parecer también han sido manipuladas para preservar el color negro como carácter recesivo, aunque en general existen reportes de esta manipulación, pero para la chíá blanca (CHIABLANCA S. C. de R. L., 2014).

Al realizar un corte al dendrograma de la figura 6.14 en similitud=0 (Figura 6.15), se obtuvieron cinco grupos.

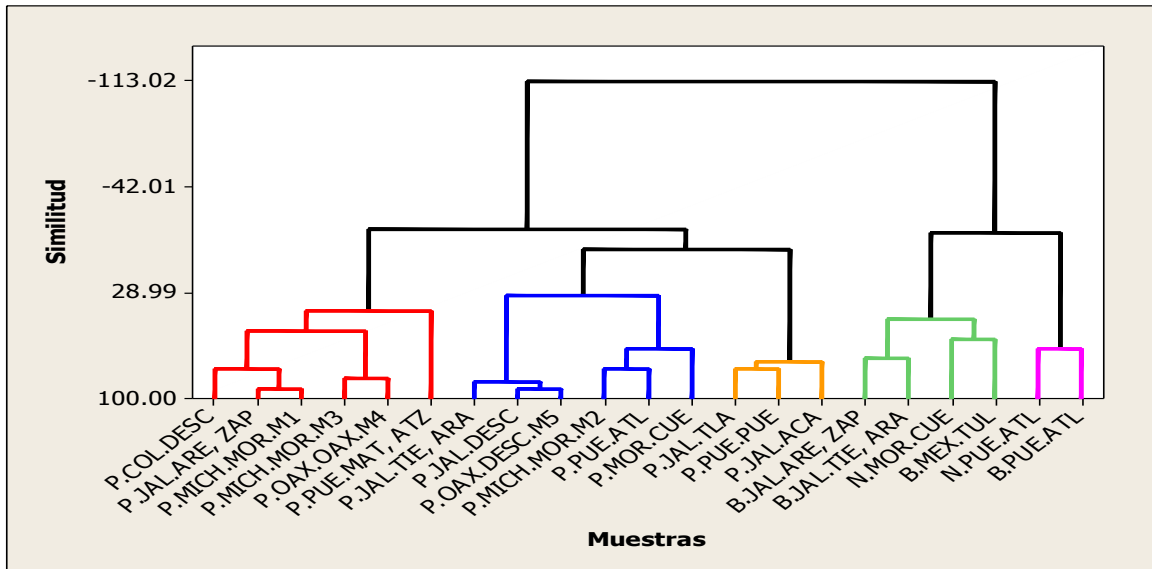


Figura 6.15. Dendrograma para las muestras de chíá analizada.

En el dendrograma anterior, es posible observar que la semilla blanca cultivada en San Mateo, Tultitlan, Estado de México (B.MEX.TUL) y su semilla de origen proveniente de Tierra Roja, Arandas, Jalisco (B.JAL.TIE, ARA) se encuentran en el mismo grupo (traza verde), esto confirma que aun cuando las condiciones geográficas para ambas semillas son diferentes, el origen es el mismo; adicionalmente se observó que estas dos semillas comparten similitudes con la semilla blanca originaria de La Arena, Zapotlanejo, Jalisco (B.JAL.ARE, ZAP) y la semilla negra de Cuernavaca, Morelos (N.MOR.CUE). En el mismo grupo de semillas blancas y negras, se identificó un conglomerado (traza rosa) que muestra la similitud entre la semilla negra (N.PUE.ATL) y blanca (B.PUE.ATL) proveniente de Atlixco, Puebla; en este caso la diferencia para las semillas es el color ya que la ubicación geográfica es la misma.

Al analizar el grupo de semillas pintas, se observaron tres agrupaciones (Traza roja, azul y amarilla) en los cuales al menos hay una semilla proveniente del estado de Jalisco; con lo anterior se refuerza la idea de que todas las semillas cultivadas en las distintas partes de la República Mexicana (y el mundo) tienen su origen en Jalisco (CHIABLANCA S. C. de R. L., 2014).

Si bien el análisis ANOVA multifactorial no mostró diferencias significativas entre las semillas analizadas, el análisis de conglomerados y el dendrograma muestran la posibilidad de agrupar y clasificar a las semillas en diferentes grupos.

En las páginas siguientes se muestra una comparación de los cultivares de chíá por Estado, localidad (para un mismo estado) y color de semilla (para una misma localidad) con el objetivo de mostrar la utilidad de los perfiles electroforéticos como comparativos.

En los electroforegramas de esta sección se muestran con flechas azules los picos del trazo inferior, en anaranjado los del trazo central, en verde los del trazo superior, en rojo aquellos picos que sólo aparecen en una de las dos o tres muestras comparadas y en morado aquellos picos que se encuentran en dos de las tres muestras analizadas.

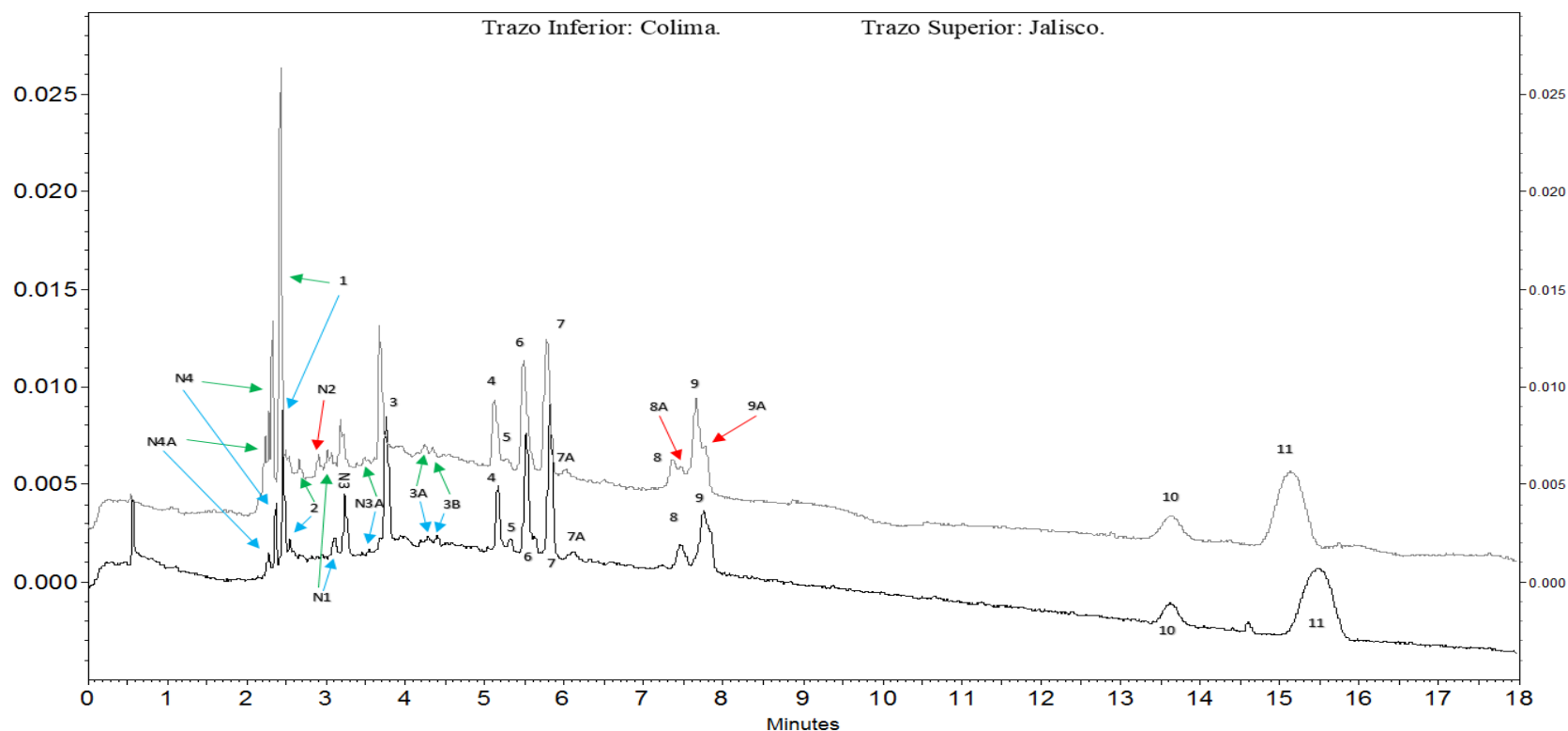


Figura 6.16. Colima vs Jalisco (localidades desconocidas). Semilla pinta.

Al comparar la semilla pinta proveniente de dos estados diferentes (localidades desconocidas), se encontró que la semilla de Jalisco presenta los picos N2, 8A y 9A como característicos, ya que estos no se encontraron en la semilla proveniente de Colima. Con este resultado se afirma la posibilidad de diferenciar entre un mismo color de semilla de chíá proveniente de estados diferentes, por lo que a continuación se muestra la comparación para localidades distintas de un mismo estado y un mismo color de semilla.

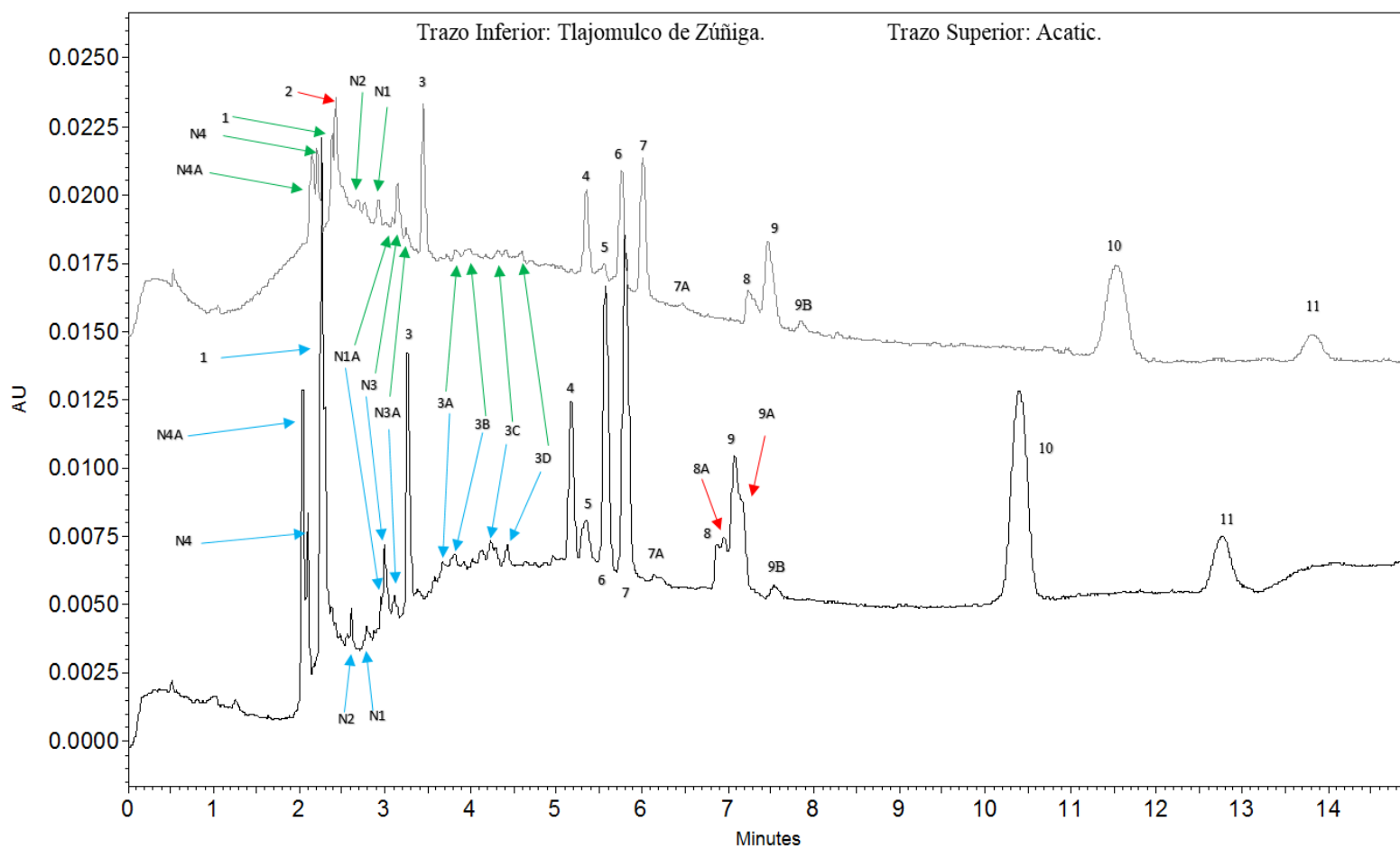


Figura 6.17. Jalisco. Tlajomulco de Zúñiga vs Acatic. Semilla pinta.

La chía proveniente de Acatic mostró el pico 2 como característico frente a la semilla originaria de Tlajomulco de Zúñiga, la cual presentó los picos 8A y 9A. Las siguientes dos comparaciones consistieron en diferenciar dos semillas provenientes de una misma localidad (mismo estado) pero diferente color de semilla.

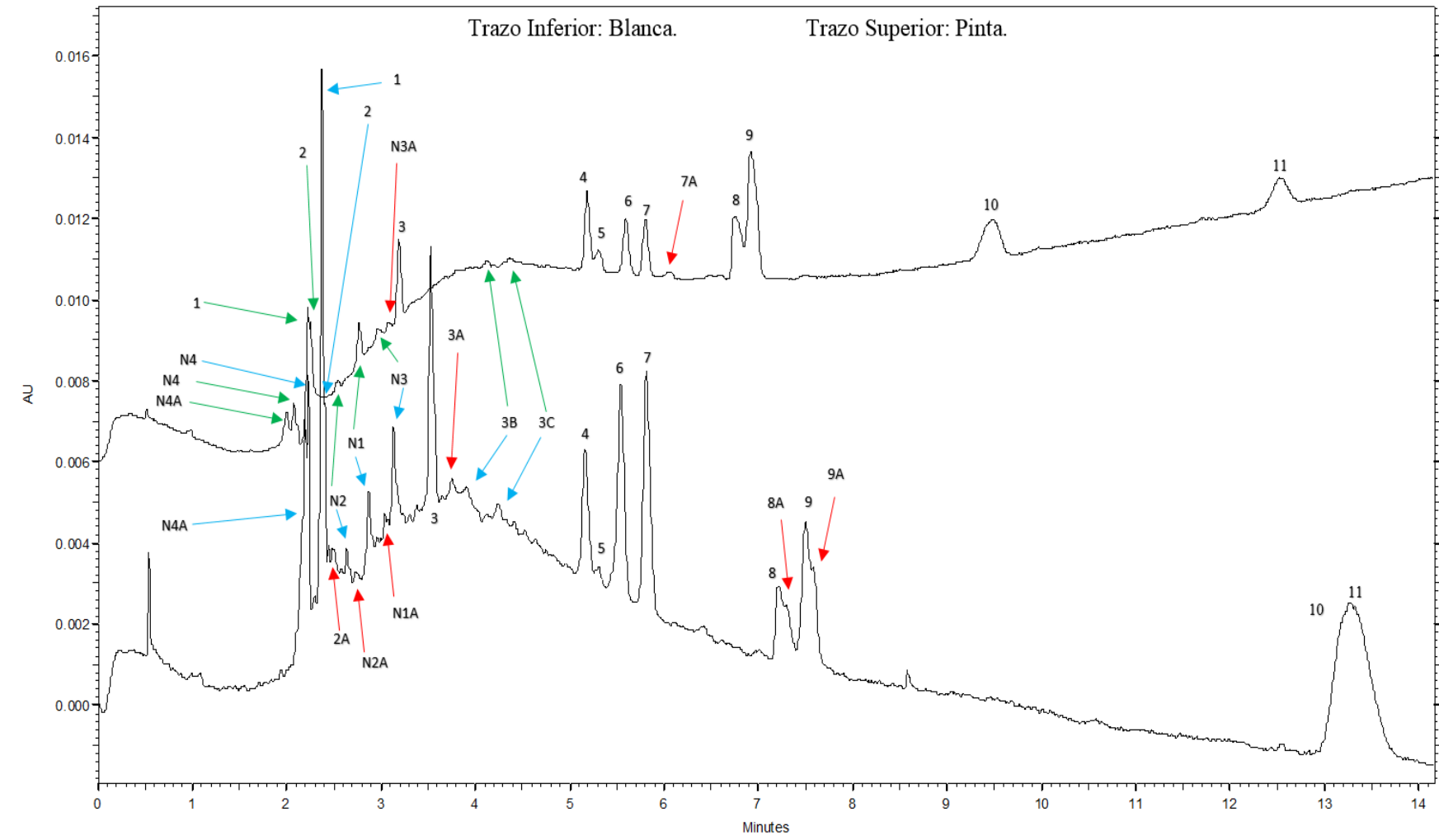


Figura 6.18. Jalisco. La Arena, Zapotlanejo. Semilla blanca vs pinta.

Los picos presentes únicamente en el color blanco fueron: 2A, N2A, N1, 3A, 8A, y 9A (Nota: Los picos 10 y 11 se han traslapado), así mismo los picos N3A y 7A fueron característicos de la semilla pinta.

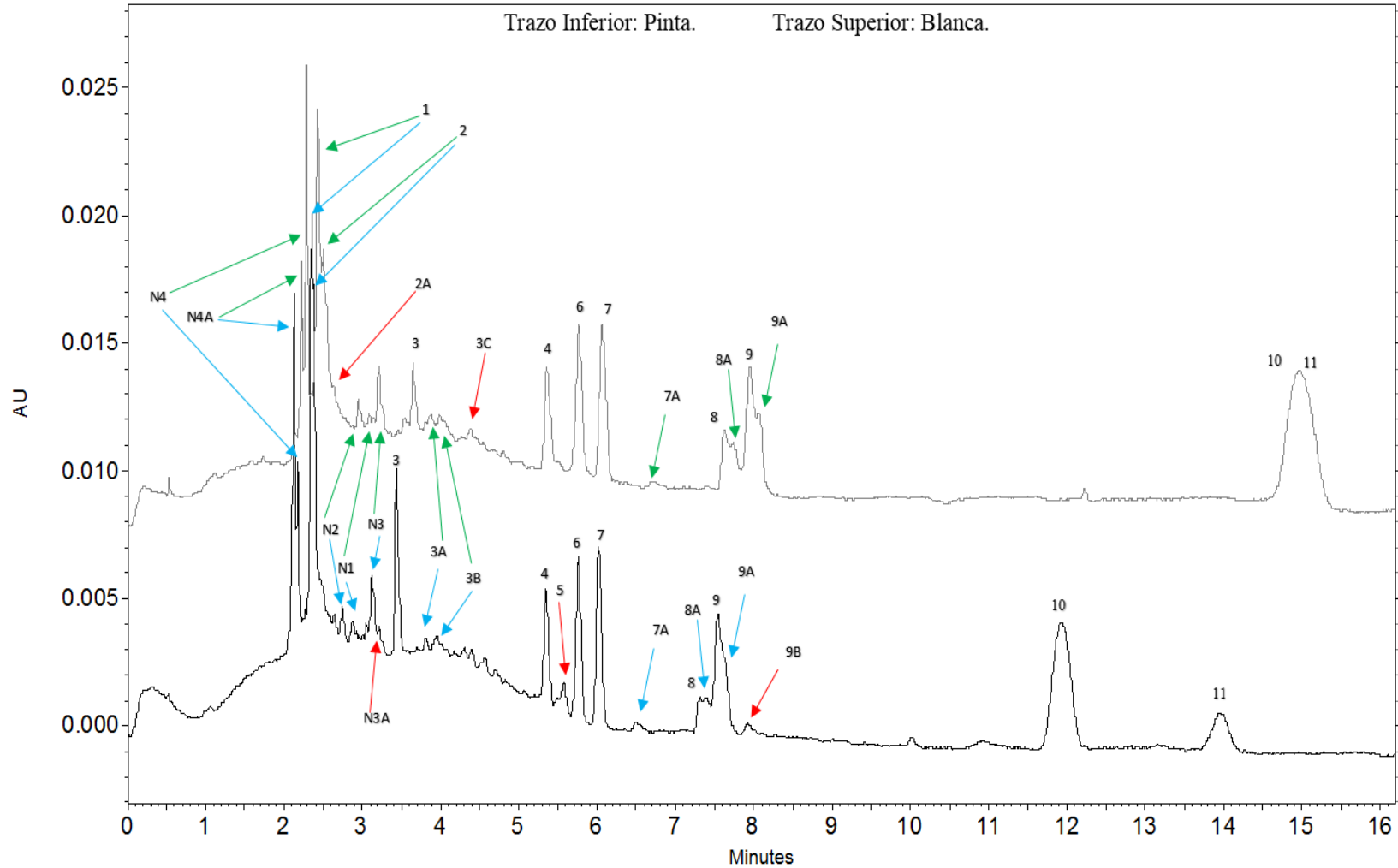


Figura 6.19. Jalisco. Tierra Roja, Arandas. Semilla pinta vs blanca.

Los picos que estuvieron presentes únicamente en la semilla de color blanco son: 2A y 3C (Nota: Los picos 10 y 11 se han traslapado), así mismo los picos N3A, 5 y 9B fueron característicos de la semilla pinta.

Enseguida se compararon semillas negras, blancas y pintas provenientes del Estado de Puebla y Morelos, obteniéndose en todas ellas diferencias en el perfil electroforético.

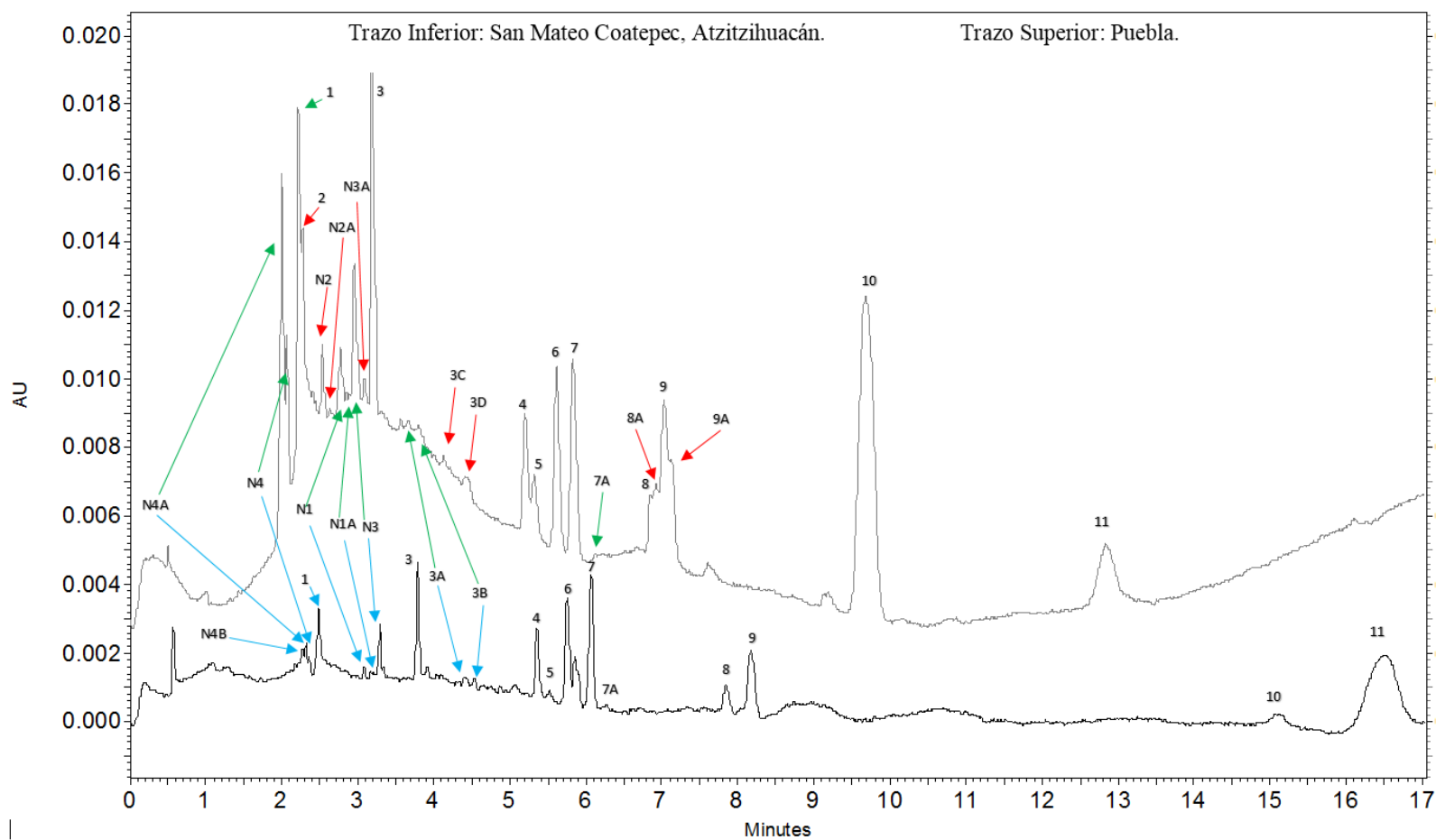


Figura 6.20. Puebla. San Mateo Coatepec, Atzitzihuacán vs Puebla. Semilla pinta.

En este caso (Mismo estado, diferente localidad y mismo color de semilla), la muestra proveniente de la capital Puebla es la única que presentó picos característicos: 2, N2, N2A, N3A, 3C, 3D, 8A y 9A; los demás picos son comunes a ambas semillas.

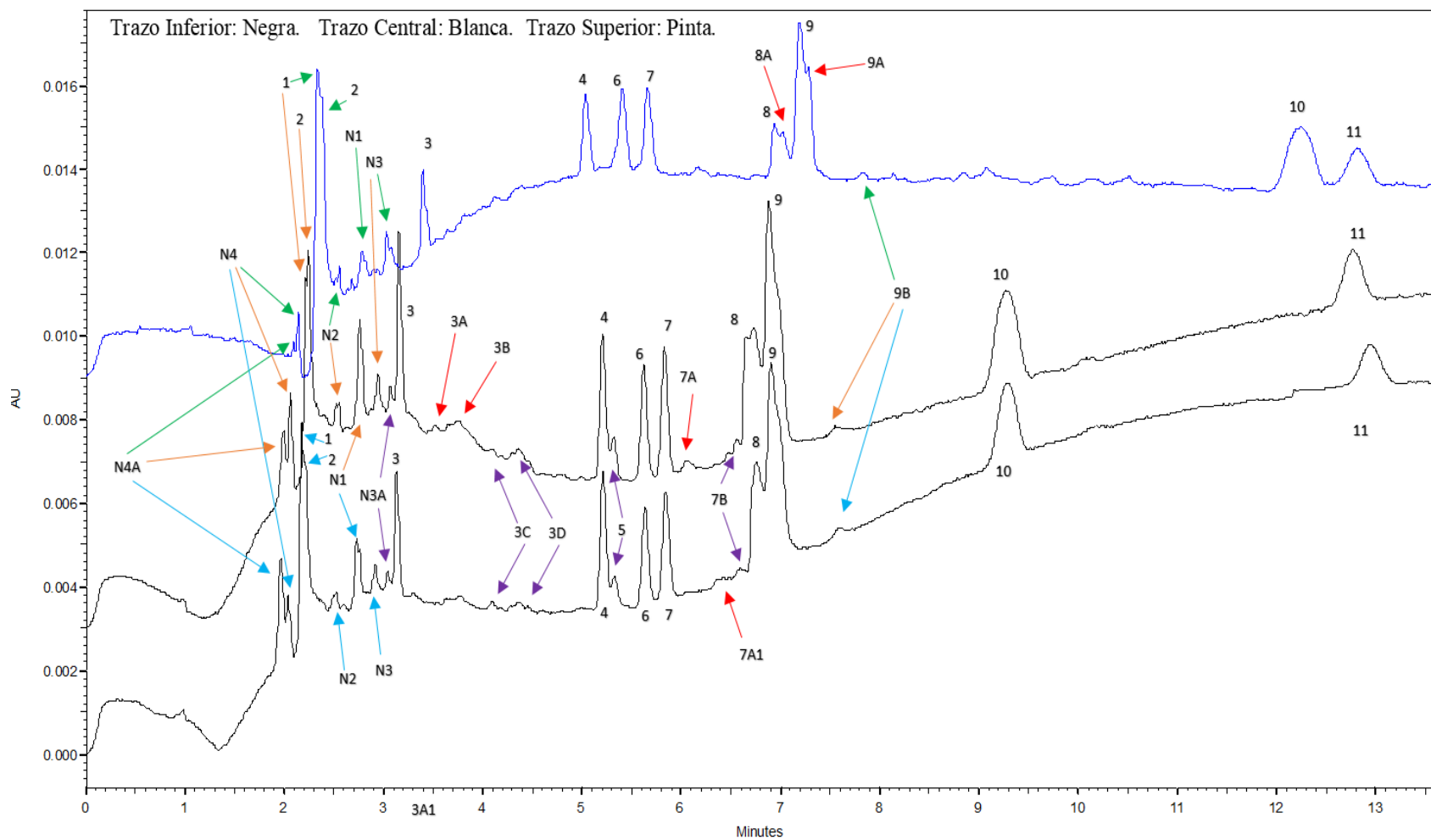


Figura 6.21. Puebla. Atlixco. Semilla negra vs blanca vs pinta.

En esta comparación (Mismo estado, misma localidad y diferente color de semilla) se muestran en rojo los picos que aparecieron únicamente en la muestra correspondiente y en morado aquellos que son comunes a dos de las tres muestras.

Semilla Negra: N3A, 3C, 3D, 5, 7B, 7A1. Semilla Blanca: N3A, 3C, 3D, 5, 7B, 3A, 3B, 7A. Semilla Pinta: 8A, 9A.

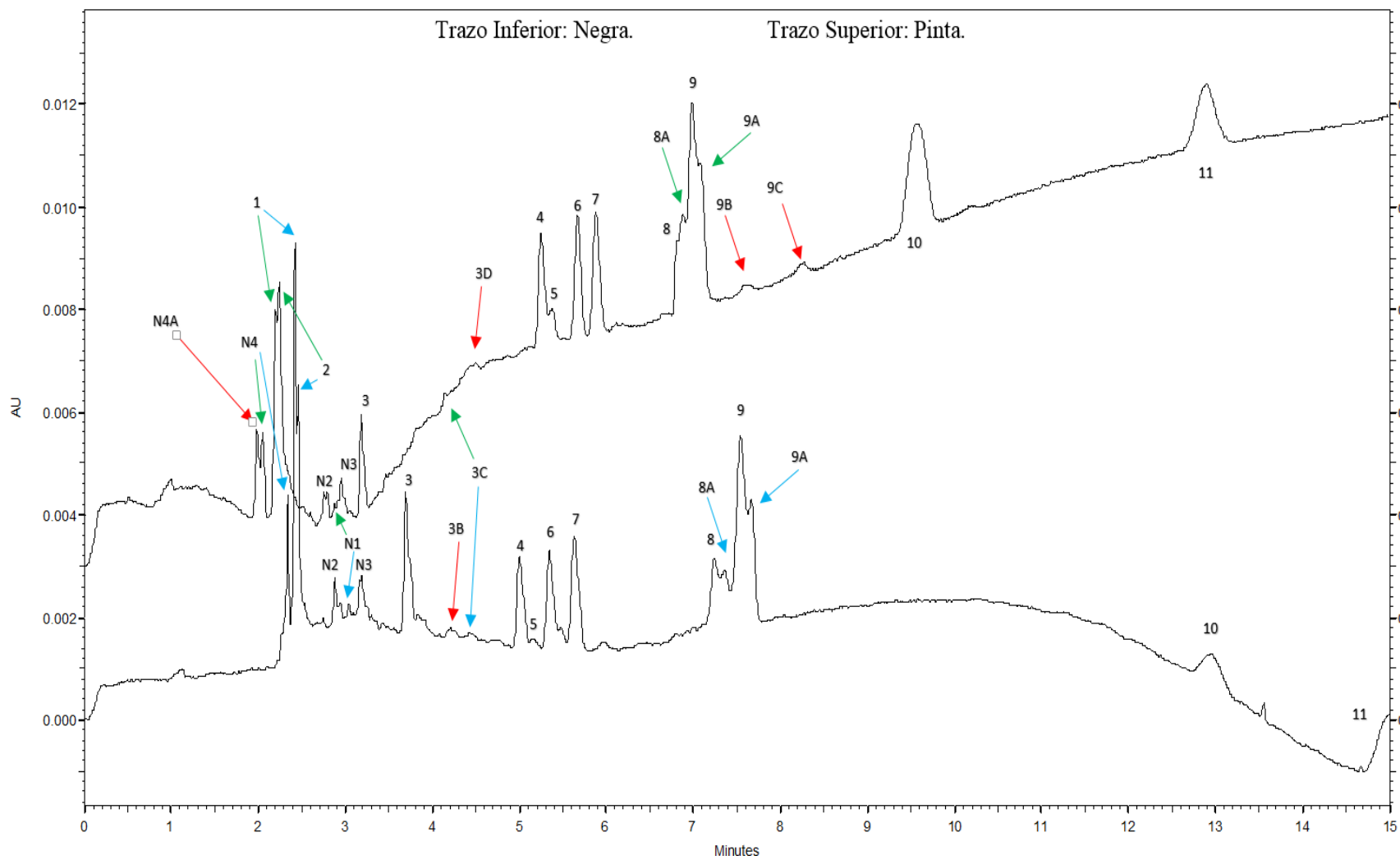


Figura 6.22. Morelos. Cuernavaca. Semilla negra vs pinta.

Para la semilla negra de Morelos (misma localidad), únicamente se encontró que el pico 3B es característico de esta semilla, mientras que para la pinta, los picos característicos fueron: N4A, 3D, 9B y 9C.

Por último, se comparó el perfil electroforético de semillas de chía pinta provenientes del Estado de Oaxaca y Michoacán, cuya localidad de origen se desconoce, pues fueron adquiridas en mercados, y aun cuando es posible su diferenciación, es de suma importancia conocer con exactitud su origen, para que en futuros trabajos se pueda contar con una base de datos amplia de perfiles electroforéticos perfectamente identificados.

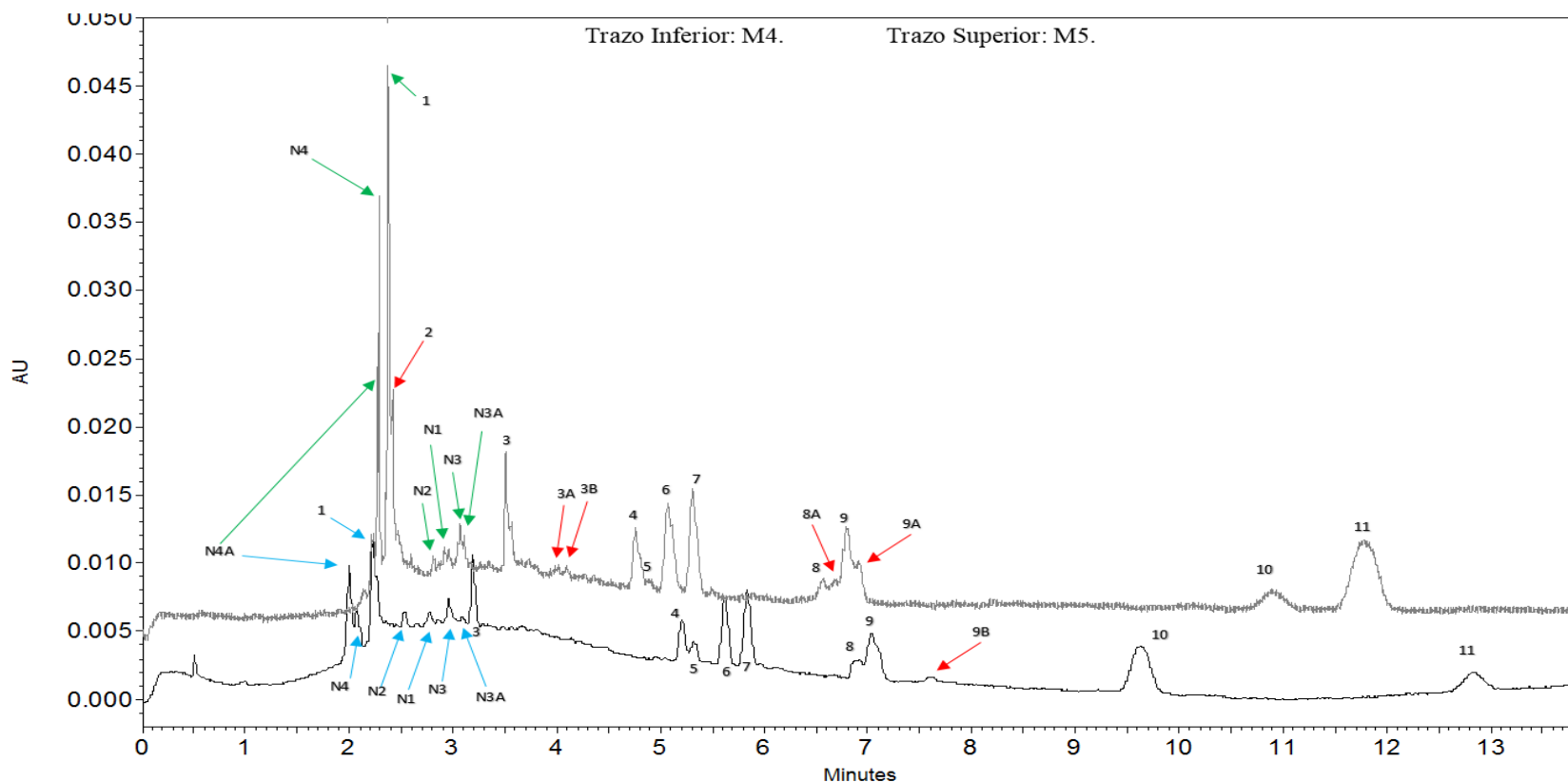


Figura 6.23. Oaxaca. M4 vs M5. Semilla pinta.

El único pico que diferenció a la semilla denominada M4 frente a la semilla M5 es el 9B, mientras que los picos 2, 3A, 3B, 8A y 9A fueron propios de la semilla M5.

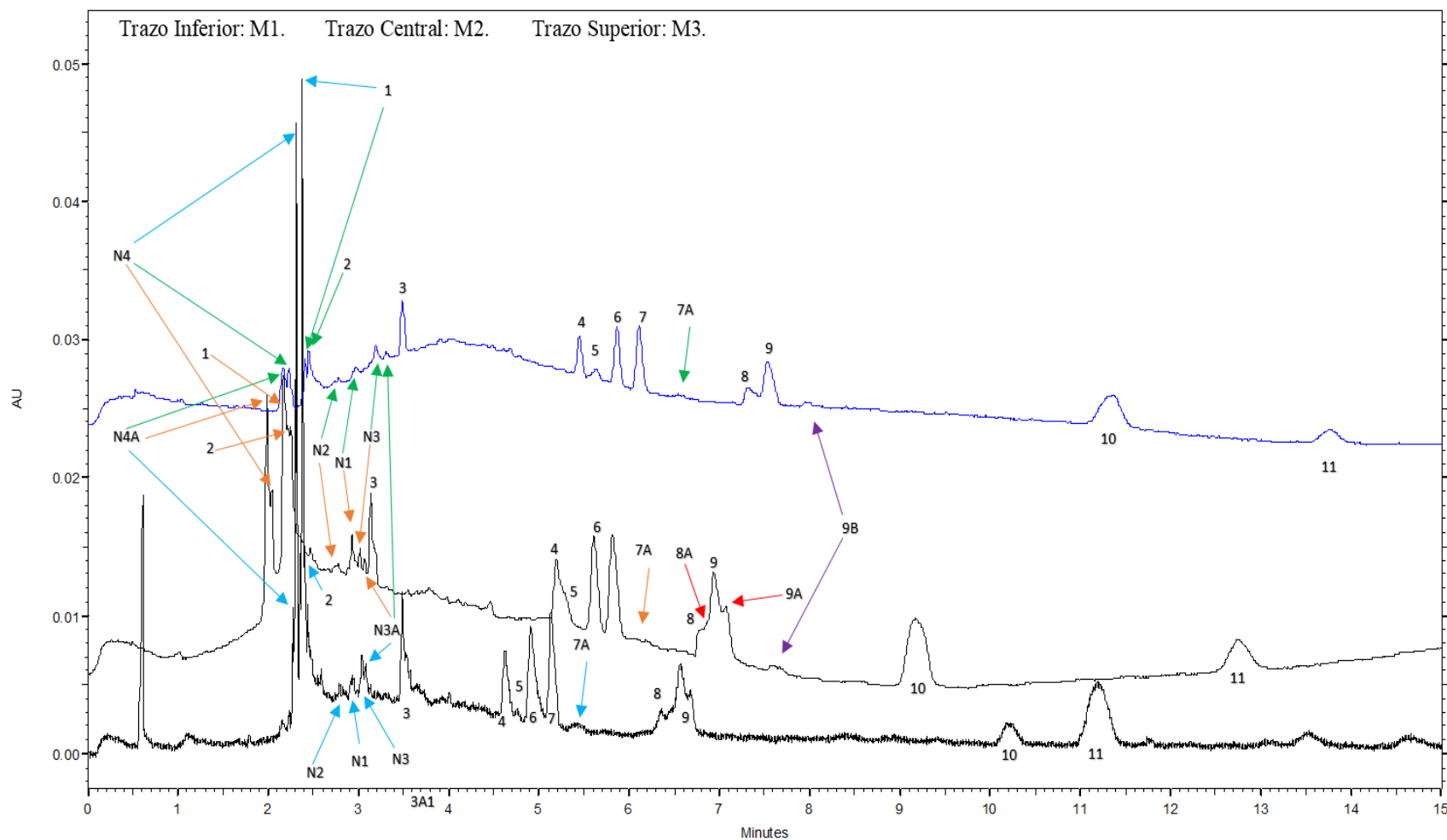


Figura 6.24. Michoacán. Morelia. M1 vs M2 vs M3. Semilla pinta.

En esta comparación, las semillas provienen de tres mercados diferentes de la ciudad de Morelia, Mich. Se muestran en rojo los picos que aparecen únicamente en la muestra correspondiente y en morado aquellos que son comunes a dos de las tres muestras.

M1: Ninguno.

M2: 9B, 3A, 3B, 8A, 9A.

M3: 9B.

En cuanto al contenido de aceites totales, humedad y sólidos totales de las diferentes muestras, se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 6.9 Aceites totales, humedad y sólidos totales de las diferentes semillas de chía.									
Material Biológico			Aceites Totales			Humedad			
Color	Estado	Localidad	Harina integral (g)	Aceite (g)	Aceite total (%)	Harina desgrasada	Humedad (g)	Humedad (%)	Sólidos Totales
Pinta	Colima	Desconocida	-	-	-	1.917	0.1319	6.88	93.12
Pinta	Jalisco	La Arena, Zapotlanejo	9.4584	3.1725	33.54	2.0366	0.1528	7.50	92.50
Blanca		La Arena, Zapotlanejo	10.3601	3.2831	31.69	2.1364	0.1513	7.08	92.92
Pinta		Tierra Roja, Arandas	10.4014	2.6526	25.50	1.9431	0.1275	6.56	93.44
Blanca		Tierra Roja, Arandas	11.7076	2.6613	22.73	2.0168	0.1457	7.22	92.78
Pinta		Tlajomulco de Zúñiga	10.8998	3.4766	31.90	2.0147	0.1413	7.01	92.99
Pinta		Acatic	10.3811	3.4325	33.06	1.9461	0.1274	6.55	93.45
Pinta		Desconocida	10.5487	2.4726	23.44	2.1225	0.1503	7.08	92.92
Pinta		Morelia. M1.	9.8911	2.5165	25.44	2.1066	0.1804	8.56	91.44
Pinta	Morelia. M2.	10.2622	3.2791	31.95	1.9988	0.141	7.05	92.95	

Tabla 6.9 Aceites totales, humedad y sólidos totales de las diferentes semillas de chía.									
Material Biológico			Aceites Totales			Humedad			
Color	Estado	Localidad	Harina integral (g)	Aceite (g)	Aceite total (%)	Harina desgrasada	Humedad (g)	Humedad (%)	Sólidos Totales
Pinta		Morelia. M3.	10.1874	3.0803	30.24	2.0368	0.1473	7.23	92.77
Pinta	Oaxaca	Oaxaca de Juárez. M4.	11.1421	3.7016	33.22	2.0436	0.1525	7.46	92.54
Pinta		Desconocida. M5.	9.9168	3.0543	30.80	2.0517	0.1369	6.67	93.33
Pinta	Puebla	San Mateo Coatepec, Atzitzihuacán	11.1938	3.1523	28.16	1.553	0.1041	6.70	93.30
Pinta		Puebla	9.6349	2.8484	29.56	2.0114	0.1261	6.27	93.73
Negra		Atlixco	10.0106	3.634	36.30	1.6023	0.1325	8.27	91.73
Blanca		Atlixco	10.0827	3.391	33.63	2.002	0.1698	8.48	91.52
Pinta		Atlixco	9.9356	3.5443	35.67	2.0276	0.1751	8.64	91.36
Negra		Cuernavaca	9.7172	3.3706	34.69	2.0803	0.1914	9.20	90.80
Pinta	Morelos	Cuernavaca	10.1761	3.5838	35.22	2.0518	0.1799	8.77	91.23
Blanca	México	San Mateo, Tultitlán	7.3479	2.3914	32.55	1.6697	0.153	9.16	90.84

Al realizar el ANOVA multifactorial para el porcentaje de humedad (Ver anexo 9.3.4), éste mostró que ni el lugar de procedencia, ni el color de la semilla tienen una influencia significativa para todas las semillas estudiadas. Sin embargo, el análisis de varianza multifactorial realizado para el porcentaje de aceite total de la semilla (Ver anexo 9.3.3), mostró que el lugar de procedencia tiene una influencia significativa en dicho porcentaje, cuyos valores van de 22.7% para Arandas, Jalisco y hasta 36.3 % para Atlixco, Puebla; estos valores concuerdan con la literatura, en el que el rango va de 28.76% a 39.0% (Ixtaina, 2010) (Pascual Bustamante, 2013), además existen referencias que indican que la altura y la precipitación promedio anual del sitio de cultivo influyen de forma significativa en estos porcentajes de aceite totales.

Tabla 6.10. Dependencia del contenido de aceite y la altitud del lugar de cultivo.

ID	Altitud (msnm)	Promedio de altura (msnm)	Aceite total (%)	Promedio de aceite total (%)
<i>B.JAL.TIE, ARA</i>	2000		22.73	
<i>P.JAL.TIE, ARA</i>	2000		25.50	
<i>P.PUE.MAT, ATZ</i>	2070		28.16	
<i>P.PUE.PUE</i>	2219	1947.0	29.56	28.87
<i>B.JAL.ARE, ZAP</i>	1522		31.69	
<i>P.JAL.TLA</i>	1575		31.90	
<i>B.MEX.TUL</i>	2243		32.55	
<i>P.JAL.ACA</i>	1680		33.06	
<i>P.JAL.ARE, ZAP</i>	1522		33.54	
<i>B.PUE.ATL</i>	1840		33.63	
<i>N.MOR.CUE</i>	2000	1817.4	34.69	34.59
<i>P.MOR.CUE</i>	2000		35.22	
<i>P.PUE.ATL</i>	1840		35.67	
<i>N.PUE.ATL</i>	1840		36.30	

Tabla 6.11. Dependencia del contenido de aceite y la precipitación promedio anual.

ID	Precipitación promedio anual (mm)	Promedio de la precipitación promedio anual (mm)	Aceite total (%)	Promedio de aceite total (%)
B.JAL.TIE, ARA	888.1		22.73	
P.JAL.TIE, ARA	888.1		25.50	
P.PUE.MAT, ATZ	1000		28.16	
P.PUE.PUE	900	877.6	29.56	28.87
B.JAL.ARE, ZAP	945.3		31.69	
P.JAL.TLA	821.9		31.90	
B.MEX.TUL	700		32.55	
P.JAL.ACA	835.8		33.06	
P.JAL.ARE, ZAP	945.3		33.54	
B.PUE.ATL	1100		33.63	
N.MOR.CUE	1150	1054.4	34.69	34.59
P.MOR.CUE	1150		35.22	
P.PUE.ATL	1100		35.67	
N.PUE.ATL	1100		36.30	

Los datos de las tablas 6.10 y 6.11 concuerdan con lo descrito por Ayerza y Coates (2011), quienes en general, concluyen que el contenido de aceite es inversamente proporcional a la altitud y proporcional a la precipitación promedio anual.

7. CONCLUSIONES.

Para lograr las condiciones de separación más adecuadas, fue necesario estudiar algunos de los factores que impactan en la separación de las prolaminas, tal como el tiempo de refrigeración, el cual al ser de varios días, provoca perfiles incompletos o una disminución en las señales de las prolaminas posiblemente debido a su degradación; el voltaje de separación y su efecto sobre la resolución de picos, en donde ésta decrece al disminuir el voltaje ya que la movilidad de las prolaminas es menor, disminuyendo la eficiencia de separación; la composición del buffer, cuyo ANOVA multifactorial mostró la influencia del ACN e IDA sobre los %RSD; el tamaño de la apertura y el lavado inicial del capilar con y sin NaOH, que si bien no mostraron una influencia significativa, ayudaron a la resolución de picos y estabilidad de la línea base. También se evaluó la repetibilidad y precisión intermedia del método de separación optimizado, cuya importancia radica en conocer la variación de los tiempos de migración, ya que para la comparación de perfiles de las prolaminas de las diferentes muestras se debe tener certeza en la asignación de señales, e incluso poder detectar traslapes de las mismas.

Con el presente trabajo, se demostró que la técnica de electroforesis capilar es útil para la obtención de perfiles específicos de la semilla de chíá, y aun cuando el análisis ANOVA multifactorial no mostró una influencia significativa de la localidad y color de semilla sobre la cantidad de picos diferenciales, indicando que las muestras no son variedades o cultivares diferentes, se pudo comparar y clasificar las diferentes semillas al utilizar un análisis de conglomerados, mostrando una clara agrupación para semillas pintas, en las cuales se obtienen tres aglomerados en las que para cada uno existe al menos una semilla proveniente de Jalisco, lo cual refuerza la idea de que todas las semillas cultivadas en el mundo tienen su origen en dicho estado; y otra agrupación se obtuvo para las semillas blancas y negras, con lo que se comprueba la domesticación de la semilla. Adicionalmente y debido a la existencia de picos diferenciales en todas las muestras, se mostró la utilidad de los perfiles como medio de comparación por Estado, Localidad (mismo Estado) e incluso color de la semilla (misma localidad).

Por último, el ANOVA multifactorial no mostro un efecto significativo del lugar de cultivo y color de semilla en el porcentaje de humedad, en contraste a la influencia sobre el porcentaje de aceite total, verificándose que las condiciones de altura y precipitación promedio anual afectan en dicho porcentaje.

8. REFERENCIAS.

- Albillos García, S. (2003). *Aplicación de la electroforesis capilar para el análisis y seguimiento del grado de maduración de quesos de oveja y mezcla de la provincia de Burgos*. Burgos: Universidad de Burgos.
- American Heart Association. (1999). Functional foods: position of ADA. *J Am Diet*(99), 1278-1285.
- Ayerza, R. (2000). Dietary levels of chia: Influence in yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poultry Science*, 79, 724-739.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). *Chia. Rediscovering a Forgotten Crop of The Aztecs* (1st ed.). Tucson, USA: The University of Arizona Press.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica L.*). *Industrial Crops and Products*, 1366-1371.
- Bean, S. R., & Lookhart, G. L. (2000). Ultrafast Capillary Electrophoretic Analysis of Cereal Storage Proteins and Its Applications to Protein Characterization and Cultivar Differentiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(48), 344-353.
- Bean, S. R., Bietz, J. A., & Lookhart, G. L. (1998). High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *Journal of Chromatography*, 814, 25-41.
- Benítez de Rojas, C., Cardozo L., A., Hernández Ch., L., Lapp, M., Rodríguez, H., Ruiz Z., T., & Torrecilla, P. (2006). *Botánica Sistemática. Fundamentos para su estudio*. Maracay, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Bohinsky, R. C. (1998). *Bioquímica*. México, México: Pearson Educación.
- Bossi, A., & Righetti, P. G. (1997). Generation of peptide maps by capillary zone electrophoresis in isoelectric iminodiacetic acid. *Electrophoresis*, 2012-2018.
- Bushey, M., & Jorgenson, J. (1989). Capillary electrophoresis of proteins in buffers containing high concentrations of zwitterionic salts. *Journal of Chromatography A*(410), 301-310.
- Cahill, J. P. (2004). Genetic diversity among varieties of Chía (*Salvia hispanica L.*). *Genetic Resources and Crop Evolution*(51), 773-781.
- Castagnino, J. M. (1999). Electroforesis Capilar. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 33(3), 297-329.
- Castanon, M., Steyertha, N., & Castagnino, J. (1996). *Aplicación de un método de electroforesis capilar al estudio de la glicosilación de albúmina in vitro*. (Vol. 40). Buenos Aires, Argentina: Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.
- CHIA CORP. (2014). *Chía, una semilla ancestral redescubierta*. CICH. Recuperado el 2014

- CHIABLANCA S. C. de R. L. (2014). *Chía blanca*. Obtenido de <http://chiablanca.com.mx/> (1542).Códice Mendoza. Ed. *Francisco del Paso y Troncoso (1925)*. Museo Nacional de Arqueología, Historia y Etnografía, México, D. F.
- Curtis A., M., & Robert T., K. (1994). *Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry.
- Derbyshire, E., Wrigt, D. J., & Bouter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage protein of legume seed. *Phytochem*(15), 3-24.
- Ewing, G., Wallingfird, R., & Olefirowicz, T. (1989). Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 292-303.
- Fontúrbel Rada, F. E., Achá Cordero, D., & Mondaca Gutiérrez, D. A. (2007). *Manual de introducción a la botánica*. (2a ed.). Publicaciones Integrales.
- González Jiménez, F. E. (2010). *Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (Salvia hispanica L.), mediante electroforesis capilar*. Tesis de Maestría. IPN, ENCB, México, D. F.
- Hernández Gómez, J. A., & Miranda Colin, S. (2008). Caracterización morfológica de chía (Salvia hispanica). *Fitotec*, 31 (2), 105-113.
- Hjertén, S. (1985). High performance electrophoresis, elimination of electroendoosmosis and solute adsorption. *Journal Chromatography*, 347, 191-198.
- Ibañez-Carranza. (1991). *Aislamiento y caracterización parcial de las fracciones proteínicas de avena cubierta var. Páramo y avena desnuda var. Dorada*. Tesis de maestría. D. F., México: ENCB. IPN.
- INAFED Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Secretaría de Gobernación. (2010). *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México*. Obtenido de <http://e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/EMM15mexico/index.html>
- Infoagro Systems, S.L. (2014). *Agricultura. Sectores, información y precios*. Obtenido de <http://www.infoagro.com/>
- Ixtaina, V. Y. (2010). *Caracterización de la semilla y el aceite de chía (Salvia hispanica L.) obtenido mediante distintos procesos. Aplicación en tecnología de alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Química.
- Jiménez, J. C., Alché, J. D., & Rodríguez García, M. i. (2007). Alperujo y semillas de olivo presentan el mismo tipo de proteínas de almacenamiento. *Actas del Simposium Científico-Técnico. Ponencias y Comunicaciones.*, 365-376.
- Jorgenson, J., & Lukacs, K. (1981). *Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries* (Vol. 53). Analytical Chemistry.
- Landers. (1997). *Handbook of Capillary Electrophoresis*. Boca Ratón: CRC Press.

- Landers, J. P., Oda, R. P., & Spelsberg, T. C. (1993). Capillary electrophoresis: A powerful microanalytical technique for biologically active molecules. *BioTechniques*(14), 98-106.
- Martínez Gordillo, M., Fragoso Martínez, I., García Peña, M., & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*(84), 30-86.
- McLaughlin, G. M., Nolan, J. A., Palmieri, R. H., Anderson, K. W., Morris, S. C., Morrison, J. A., & Bronzart, T. J. (1992). Pharmaceutical drug separations by HPCE: practical guidelines. *Journal of Liquid Chromatography*(15), 961-1021.
- Morante Zarcero, S., Sierra Alonso, I., & Hierro Morales, S. (2007). *Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétricas*. (Vol. 19). España: Ciencias experimentales y tecnología.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2001). *Lehninger, Principios de bioquímica* (4a ed.). Barcelona, España: Omega.
- Oda, R. P., & Landers, J. P. (1997). Introduction to capillary electrophoresis. (C. Press, Ed.) *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 1-49.
- Osborne, T. B. (1907). Proteins of the wheat kernel. *Carnegie Institution Washington Publication*(84), 1-119.
- Osorio Durango, E. J. (2009). *Aspectos Básicos de Farmacognosia*. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Pascual Bustamante, S. (2013). *Efecto de la temperatura sobre las propiedades fisicoquímicas y la composición de los ácidos grasos presentes en el aceite de la semilla de chía (Salvia hispanica L.)*. Tesis de maestría. Distrito Federal: Instituto Politécnico Nacional.
- Peralta Flores, M. E. (2004). *Caracterización bioquímica de las proteínas de la semilla de Jatropha Curcas L.* Tesis de Maestría. D. F.: IPN.
- Pérez Xochipa, I. (2009). *Estudio de la variabilidad genética de maíces criollos y su correlación con el contenido y estructura de las zeínas*. Tesis de Doctorado. México, D. F.: IPN.
- Ramírez Milla, L. G. (2011). *Caracterización bioquímica de la fracción de prolaminas de la semilla de chía (Salvia hispanica L.) de los estados de Colima y Puebla*. Tesis de Maestría. México, D. F.: IPN.
- Rubianes Manzano, J. (2007). *Prolaminas y marcadores moleculares relacionados con la calidad en Trigo Duro (Triticum turgidum L.)*. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Madrid, España.

- Sahagún, B. (1579). *Historia general de las cosas de Nueva España (Códice Florentino)* 1989. D. F.: Porrúa.
- Sandoval Oliveros, M. R. (2012). *Tesis de Maestría: Aislamiento y caracterización de las proteínas de la chía (Salvia hispanica L.)*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain. *Journal of Experimental Botany*, 53, 370, 947-958.
- Siriamornpun, S., Onanong, K., Wantana, S., Naris, S., & Naret, M. (2010). Protein Fractionation of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Leaf, Flower and Seed by Capillary Electrophoresis and Its Potential for Variety Identification. *Chinese Journal of Chemistry*(28), 543-547.
- Tsuda, T. (1994). Control of electroosmotic flow in capillary electrophoresis. (C. Press, Ed.) *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 720-773.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2002). *Nutrient Database for Standard Reference*. Pennsylvania.
- Watson, G. (1938). *Nahuatl word in American English* (Vol. 13). American Speech.
- Zúñiga Sáez, H. (2012). *Características de la chía y posible adaptación a las condiciones de Chile. Tesis*. Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Producción Agrícola.

9. ANEXOS.

9.1. Comprobación del método reportado y evaluación de algunos factores que impactan en la separación de las prolaminas de la chía (Optimización del método de separación).

9.1.1. Variación de la concentración de ACN.

Picos/Corrida	Regulador 1									Regulador 2										
	12/11/2012			04/12/2012			06/12/2012			%RSD	12/11/2012			04/12/2012			06/12/2012			%RSD
	A	B	C	D	E	F	G	H	A		B	C	D	E	F	G	H	I		
1	2.47	2.47	2.47	2.08	2.08	2.04	2.04	2.04	9.72%	2.25	2.25	2.25	2.02	2.02	2.02	1.93	1.97	2	6.33%	
2																				
3	3.96	3.96	3.94	3.24	3.24	3.15	3.15	3.15	11.48%	3.35	3.35	3.34	2.9	2.93	2.96	2.73	2.77	2.84	8.49%	
4	6.24	6.24	6.22	5.41	5.43	5.23	5.23	5.25	8.56%	3.93	3.95	3.93	3.84	3.91	3.98	3.58	3.68	3.79	3.54%	
5	6.61	6.63	6.59	5.64	5.66	5.42	5.49	5.46	9.48%											
6	6.79	6.81	6.77	5.91	5.93	5.67	5.7	5.73	8.55%	4.12	4.13	4.1	4.07	4.11	4.21	3.77	3.87	4	3.46%	
7	7.01	7.05	7.01	6.07	6.11	5.84	5.85	5.89	8.86%	4.26	4.27	4.25	4.22	4.25	4.34	3.88	4	4.11	3.58%	
8	7.72	7.78	7.76	6.51	6.51	6.23	6.25	6.25	10.69%											
9	7.94	7.98	7.96	6.72	6.72	6.39	6.42	6.42	10.60%	5.1	5.13	5.08	4.89	4.94	5.06	4.44	4.6	4.7	5.08%	
10	12.97	12.97	12.84	10.23	10.23	9.4	9.4	9.4	15.45%	6.72	6.72		6.99	7.11	7.34	6.18	6.47	6.7	5.40%	
11	14.76	14.82	14.76	13.02	12.98	11.87	11.95	12.02	9.97%							7.92	8.32	8.76	5.04%	
N1				2.6	2.6	2.56	2.56	2.56	0.85%	2.86	2.86	2.86	2.62	2.62	2.64	2.48	2.52	2.56	5.70%	
N2																				
N3				2.99	2.99	2.91	2.91	2.91	1.49%											
N4													1.98	1.98	1.98	1.85	1.87	1.89	3.20%	

Tabla A2. Separación a 15 kV y apertura 2.

Picos/Corrida	Regulador 1										Regulador 2									
	29/01/2013			30/01/2013			15/02/2013			%RSD	29/01/2013			30/01/2013			15/02/2013			%RSD
	A	B	C	D	E	F	G	H	I		A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	1.96	1.96	1.96	1.96	1.96	1.96	1.96	2.02	1.87	1.95%				2	2	2	1.99	1.99	1.99	0.27%
2																				
3	2.95	2.97	2.98	3	3	3	2.97	2.97	2.97	0.59%	3.1	3.14	3.16	3.14	3.14	3.14	3.08	3.08	3.08	1.04%
4	4.81	4.86	4.89	5	5.03	5.05	4.92	4.93	4.94	1.60%	4.12	4.19	4.27	4.41	4.45	4.45	4.86	4.87	4.88	6.65%
5	4.98	5.04	5.11	5.21	5.24	5.24	5.11	5.13	5.14	1.71%							5.03	5.05	5.07	0.40%
6	5.21	5.29	5.32	5.47	5.48	5.48	5.35	5.36	5.38	1.73%	4.32	4.4	4.74	4.66	4.7	4.77	5.26	5.26	5.26	7.54%
7	5.34	5.41	5.46	5.61	5.65	5.65	5.5	5.51	5.53	1.93%	4.46	4.55	4.64	4.83	4.89	4.93	5.42	5.44	5.45	7.90%
8	5.65	5.71	5.75	5.95	6	6	5.86	5.86	5.86	2.14%							6.07	6.09	6.11	0.33%
9	5.76	5.84	5.9	6.09	6.16	6.16	6.01	6.01	6.01	2.30%							6.23	6.23	6.27	0.37%
10	8.22	8.36	8.48	8.98	9.11	9.11	8.7	8.7	8.7	3.65%	6.82	7	7.16	7.94	8	8.1	8.95	8.99	9.03	10.88%
11	10.32	10.58	10.77	11.47	11.7	11.79	11.09	11.13	11.11	4.46%				8.44	8.58	8.77	10.88	10.97	11.04	13.31%
N1							2.43	2.43	2.43	0.00%							2.57	2.57	2.57	0.00%
N2							2.2	2.2	2.2	0.00%										
N3							2.73	2.73	2.73	0.00%							2.82	2.82	2.82	0.00%
N4	1.9	1.9	1.9	1.79	1.79	1.79	1.89	1.89	1.88	2.80%							1.92	1.92	1.92	0.00%

9.1.2. Variación de la concentración de IDA.

Tabla A3. Separación a 15 kV y apertura 8.																					
Pico/Corrida	Regulador 3									Regulador 4											
	12/11/2012			04/12/2012		06/12/2012				%RSD	12/11/2012			04/12/2012			06/12/2012				%RSD
	A	B	C	D	E	F	G	H	A		B	C	D	E	F	G	H	I			
1	2.49	2.49	2.49	2.35	2.35	2.3	2.3	2.3	3.79%	2.54	2.54	2.54	2.5	2.5	2.5	2.41	2.41	2.41	2.32%		
2																					
3	3.48	3.51	3.51	3.35	3.35	3.33	3.33	3.33	2.49%	3.8	3.8	3.8	3.5	3.5	3.5	3.36	3.36	3.36	5.48%		
4	4.6	4.64	4.69	5.29	5.29	5.09	5.15	5.15	5.90%	5.19	5.23	5.26	5.2	5.2	5.2	5.25	5.28	5.3	0.76%		
5					5.4	5.23		5.3	1.61%				5.4	5.4	5.4	5.38	5.38	5.39	0.18%		
6	4.82	4.88	4.93	5.7	5.7	5.46	5.5	5.52	7.03%	5.49	5.51	5.57	5.5	5.5	5.5	5.63	5.67	5.68	1.42%		
7	4.99	5.06	5.09	5.91	5.91	5.67	5.69	5.71	7.09%	5.7	5.74	5.81	5.78	5.8	5.8	5.86	5.88	5.91	1.15%		
8	5.79	5.85	5.91	6.8	6.8	6.6	6.64	6.64	6.98%		6.92	7	7.05	7.05	7.05	7.06	7.08	7.12	0.84%		
9	5.91	5.97	6.06	6.99	6.99	6.74	6.76	6.76	7.08%	7.05	7.11	7.22	7.25	7.2	7.2	7.24	7.24	7.29	1.04%		
10				9.65	9.65	9.51	9.59	9.7	0.76%	10.1	10.32	10.49	10.33	10.35	10.33	9.55	9.6	9.65	3.71%		
11				11.93	11.93	11.27	11.39	11.5	2.66%				11.7	11.65	11.65	12.07	12.14	12.23	2.25%		
N1	2.9	2.9	2.9	3.2	3.2	3.1	3.1	3.1	4.29%				3.2	3.2	3.2	2.98	2.98	2.98	3.90%		
N2				3	3	2.9	2.9	2.9	1.86%				3	3	3				0.00%		
N3	3.14	3.14	3.14	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2	2.07%				3.35	3.35	3.35	3.12	3.12	3.12	3.89%		
N4	2.34	2.34	2.36	2.21	2.21	2.16	2.16	2.16	3.97%				2.25	2.25	2.25	2.19	2.19	2.19	1.48%		

Tabla A4. Separación a 15 kV y apertura 2.

Picos/Corrida	Regulador 3										Regulador 4										
	29/01/2013			30/01/2013			15/02/2013				%RSD	29/01/2013		30/01/2013			15/02/2013				%RSD
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	A		B	C	D	E	F	G	H			
1	2.22	2.46	2	2.26	2.26	2.19	2.12	2.12	2.13	5.87%	2.36	2.36		2.29	2.29	2.1	2.1	2.1	5.55%		
2						2.26	2.18	2.18	2.18	1.82%											
3	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.03	3.03	3.03	1.61%	3.26	3.26	3.19	3.19	3.19	3.07	3.08	3.08	2.49%		
4	4.93	4.96	4.96	4.95	4.99	4.99	4.88	4.89	4.91	0.82%	5.04	5.04	5.04	5.05	5.05	4.98	5	5	0.54%		
5	5.06	5.08	5.08	5.09	5.11	5.13	4.98	5	5.01	1.03%	5.15	5.15							0.00%		
6	5.29	5.33	5.33	5.32	5.36	5.37	5.25	5.26	5.28	0.80%	5.4	5.4	5.4	5.42	5.43	5.33	5.36	5.36	0.63%		
7	5.5	5.53	5.53	5.52	5.56	5.58	5.43	5.45	5.46	0.93%	5.6	5.62	5.6	5.63	5.65	5.53	5.56	5.56	0.73%		
8	6.37	6.41	6.41	6.35	6.4	6.44	6.27	6.29	6.29	0.98%	6.75	6.79	6.9	6.93	6.93	6.64	6.66	6.66	1.84%		
9	6.53	6.57	6.57	6.54	6.6	6.62	6.38	6.4	6.42	1.39%	6.92	6.95	6.75	6.75	6.75	6.75	6.78	6.78	1.21%		
10	8.87	8.94	8.94	9	9.11	9.15	8.4	8.43	8.48	3.36%	9.26	9.32	9.16	9.18	9.22	8.41	8.45	8.43	4.66%		
11	10.99	11.12	11.16	11.15	11.38	11.5	10.9	10.99	11.05	1.74%	11.42	11.65	11.63	11.74	11.84	11.37	11.44	11.46	1.47%		
N1			2.91	2.72	2.72	2.72	2.65	2.65	2.65	3.38%	2.88	2.87	2.86	2.86	2.86				0.31%		
N2	2.71		2.71	2.51			2.43	2.43	2.43	5.43%											
N3			3				2.82	2.82	2.83	3.08%	3	2.98	2.97	2.97	2.97	2.87	2.89	2.89	1.71%		
N4				2.03	2.03	2.03	1.99	1.99	1.99	1.09%	2.11	2.11	2.09	2.09	2.09	2	2	2	2.49%		

9.1.3. Análisis de varianza multifactorial para los datos de la tabla 6.5.

Los factores estudiados para saber si tiene influencia en el % RSD obtenido (precisión) fueron:

- a) %ACN (10, 20 y 30).
- b) Tamaño de apertura (8 y 2).
- c) Concentración de IDA (50, 75 y 100 mM).

La prueba de hipótesis realizada se basa en lo siguiente:

H₀: No hay diferencias significativas en los %RSD por el factor.

H₁: Hay diferencias significativas en los %RSD por el factor.

Se acepta H₀ si $F_{exp} < F_{tab}$ o si el valor de probabilidad $p > 0.05$

Tabla AN.1. Análisis de varianza multifactorial para los datos de la tabla 6.5.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Apertura	19.686	1	19.686	1.06	0.3050
B:% ACN	408.735	2	204.368	11.02	0.0000
C:[IDA] (mM)	890.832	2	445.416	24.01	0.0000
RESIDUOS	2300.63	124	18.5534		
TOTAL (CORREGIDO)	3213.44	129			

Conclusión: Los factores que influyen de forma significativa en el aumento en los %RSD son la concentración de IDA y el % de ACN, por lo tanto son los que se deben controlar para obtener mejor precisión.

9.2. Evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia del método de separación seleccionado.

9.2.1. Tiempos de migración bajo las condiciones de lavado A.

Tabla A5. Día uno (23/02/2013).																																			
	Pico/Corr																																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	Conteo	%RSD	Tm prom		
7.59	7.3	7.38	7.28	7.28	7.59	7.57	7.21	7.19	7.45	7.45	7.45	7.45	7.37	7.35	7.34	7.34	7.32	7.32	7.38	7.37	7.36	7.37	7.35	7.35	7.28	7.27	7.3	7.25	7.25	7.24	30	1.52%	7.40		
5.48	5.25	5.45	5.47	5.26	5.28	5.52	5.53	5.53	5.32	5.31	5.54	5.55	5.55	5.55	5.56	5.56	5.82	5.83	5.82	5.83	5.57	5.47	5.59	5.58	5.59	5.6	5.61	5.61	5.61	5.84	5.84	5.84	30	0.82%	5.55
3.71	3.69	3.69	3.67	3.68	3.68	3.59	3.57	3.57	3.55	3.56	3.49	3.47	3.47	3.47	3.47	3.46	3.46	3.46	3.47	3.48	3.48	3.47	3.46	3.46	3.45	3.39	3.4	3.39	3.36	3.38	3.36	30	3.04%	3.51	
5.11	5.09	5.1	5.09	5.14	5.13	5.15	5.15	5.15	5.16	5.16	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.17	5.19	5.18	5.19	5.18	5.2	5.19	5.19	5.2	5.21	5.22	5.2	5.2	5.19	5.19	30	0.67%	5.17	
2.44	2.43	2.43	2.43	2.44	2.43	2.39	2.39	2.38	2.38	2.39	2.36	2.38	2.36	2.35	2.36	2.35	2.35	2.36	2.39	2.39	2.36	2.36	2.36	2.36	2.35	2.31	2.32	2.32	2.31	2.31	2.31	30	1.72%	2.37	
2.49	2.5	2.49	2.49	2.47	2.47	2.47	2.46	2.46	2.45	2.46	2.45	2.46	2.45	2.45	2.44	2.43	2.44	2.39	2.39	2.39	2.38	2.39	2.39	2.39	2.38	2.37	2.36	2.35	2.35	2.34	2.34	29	2.04%	2.42	

Tabla A5. Día uno (23/02/2013).

	Tabla A5. Día uno (23/02/2013).																													
	4	3	2	1	Z	1	11	10	Pico/Corr																					
	2.34	3.21					14.69	13.17	1																					
	2.33	3.22	2.65	2.91			14.59	13.15	2																					
	2.33	3.28	2.63	2.91			14.59	13.17	3																					
	2.32	3.2	2.62	2.9			14.52	13.19	4																					
	2.34	3.19		2.91			14.5	13.22	5																					
	2.33	3.2		2.91			14.43	13.25	6																					
	2.26	3.16		2.9			13.33		7																					
	2.25	3.15		2.9			13.27		8																					
	2.24	3.16		2.9			13.22		9																					
	2.24	3.14		2.89			13.2		10																					
	2.24	3.15		2.89			13.17		11																					
	2.24	3.15		2.88			13.1		12																					
	2.21	3.13		2.87			13.04	12.35	13																					
	2.21	3.12		2.85			13.01	12.28	14																					
	2.21	3.12		2.88			13.03	12.25	15																					
	2.21	3.12		2.85			13.04	12.2	16																					
	2.2	3.11		2.88			13.04	12.13	17																					
	2.19	3.12		2.88			13.06	12.09	18																					
	2.2	3.11		2.87			13.2	12.33	19																					
	2.2	3.12		2.87			13.22	12.32	20																					
	2.19	3.12		2.86			13.2	12.27	21																					
	2.2	3.12		2.87			13.22	12.23	22																					
	2.2	3.11		2.87			13.22	12.16	23																					
	2.19	3.11		2.87			13.23	12.11	24																					
	2.17	3.08	2.74	2.86			13.12	11.47	25																					
	2.17	3.08	2.74	2.86			13.11	11.44	26																					
	2.06	3.08	2.71	2.85			13.11	11.37	27																					
	2.16	3.08	2.71	2.85			13.11	11.33	28																					
	2.16	3.07	2.7	2.85			13.06	11.26	29																					
	2.16	3.06	2.7	2.84			13.04	11.19	30																					
	30	30	9	29			30	24	Conteo																					
	2.95%	1.60%	1.67%	0.75%			4.34%	5.49%	%RSD																					
	2.23	3.14	2.69	2.88			13.42	12.25	Tm prom																					

Tabla A6. Día dos (25/02/2013).

	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Ptco/Corr
	9.92	7	6.82	5.8	5.59	5.33	5.18	3.27	2.3	2.26	1
	10.67	7.1	6.88	5.8	5.56	5.36	5.17	3.35	2.32	2.3	2
	10.61	7.09	6.88	5.79	5.56	5.36	5.16	3.32	2.32	2.31	3
	10.6	7.09	6.89	5.8	5.57	5.37	5.17	3.32	2.32	2.31	4
	10.6	7.1	6.89	5.82	5.59	5.34	5.19	3.32	2.32	2.3	5
	9.98	7.01	6.83	5.78	5.56	5.32	5.16	3.26	2.28	2.26	6
	9.94	6.99	6.81	5.77	5.55	5.31	5.15	3.2	2.28	2.25	7
	9.96	7.01	6.8	5.79	5.57	5.32	5.17	3.25	2.28	2.26	8
	9.95	7.02	6.85	5.81	5.59	5.34	5.19	3.26	2.29	2.27	9
	9.92	7.04	6.8	5.8	5.59	5.33	5.18	3.27	2.3	2.26	10
	9.9	6.99	6.88	5.8	5.58	5.33	5.18	3.258	2.3	2.25	11
	10.32	7.05	6.84	5.78	5.56	5.34	5.16	3.28	2.29	2.27	12
	10.3	7.04	6.84	5.79	5.56	5.33	5.17	3.28	2.3	2.28	13
	10.25	7.02	6.85	5.78	5.56	5.33	5.16	3.27		2.27	14
	10.3	7.07	6.87	5.82	5.6	5.36	5.19	3.29		2.31	15
	10.27	6.89	6.88	5.82	5.6	5.36	5.19	3.28		2.3	16
	10.26	7.07	6.89	5.82	5.6	5.36	5.19	3.27		2.28	17
	9.85	7.03	6.84	5.8	5.59	5.32	5.18	3.22		2.28	18
	9.95	7.07	6.9	5.87	5.65	5.38	5.24	3.26		2.26	19
	9.85	7.04	6.85	5.81	5.6	5.31	5.18	3.21	2.27	2.25	20
	9.84	7.03	6.87	5.82	5.6	5.32	5.19	3.22		2.26	21
	9.84	7.06	6.88	5.83	5.61	5.33	5.2	3.22	2.29	2.26	22
	9.81	7.07	6.86	5.83	5.61	5.33	5.2	3.22		2.26	23
	9.66	7	6.82	5.8	5.57	5.31	5.17	3.2	2.26	2.24	24
	9.36	6.87	6.71	5.75	5.55	5.27	5.15	3.2	2.1	2.09	25
	9.38	6.9	6.76	5.78	5.57	5.29	5.17	3.2	2.13	2.09	26
	9.38	6.99	6.85	5.83	5.62	5.31	5.21	3.19		2.08	27
	9.44	7	6.88	5.84	5.63	5.32	5.21	3.19	2.12	2.08	28
	9.43	7	6.87	5.83	5.63	5.31	5.2	3.18	2.09	2.08	29
	9.44	7	6.88	5.84	5.62	5.32	5.21	3.18	2.1	2.08	30
	30	30	30	30	30	30	30	30	21	30	Conteo
	3.91%	0.82%	0.62%	0.43%	0.47%	0.45%	0.39%	1.44%	3.71%	3.56%	%RSD
	9.97	7.02	6.85	5.81	5.59	5.33	5.18	3.25	2.25	2.24	Tm Prom

Tabla A6. Día dos (25/02/2013).

		W	N	U	Z	H	Ptco/Corr
2.1	3.27	2.59	2.8	12.47	1		
2.14	3.04	2.66	2.82	12.58	2		
2.13	3.14	2.66	2.82	12.56	3		
2.13	3.04	2.66	2.82	12.6	4		
2.14	3.32	2.67	2.83	12.64	5		
2.1	3	2.59	2.8	12.41	6		
2.1	2.99	2.57	2.79	12.43	7		
2.1	3	2.59	2.8	12.45	8		
2.11	3.01	2.59	2.81	12.5	9		
2.1	3	2.59	2.8	12.47	10		
2.1	3	2.57	2.8	12.45	11		
2.11	3.01		2.8	12.55	12		
2.12	3.01	2.62	2.81	12.54	13		
2.11	3.08	2.61	2.8	12.55	14		
2.12	3.025	2.62	2.82	12.63	15		
2.12	3.02	2.62	2.82	12.63	16		
2.12	3.01	2.61	2.81	12.68	17		
2.09	2.98	2.52	2.84	12.73	18		
2.11	3.01	2.69	2.836	12.83	19		
2.09	2.97	2.59	2.83	12.81	20		
2.09	2.98	2.56	2.78	12.84	21		
2.09	2.98	2.56	2.8	12.83	22		
2.09	2.98	2.55	2.8	12.87	23		
2.08	2.97	2.54	2.82	12.63	24		
2.02	2.97	2.52		12.16	25		
2.02	2.97	2.52		12.24	26		
2.01	2.97	2.52	2.68	12.62	27		
2	2.97	2.52	2.69	12.79	28		
2	2.96	2.51		12.79	29		
2.01	2.97	2.51		12.83	30		
30	30	29	26	30	Conteo		
2.04%	2.76%	2.04%	1.32%	1.41%	%RSD		
2.09	3.02	2.58	2.80	12.60	Tm Prom		

9.2.2. Tiempos de migración bajo las condiciones de lavado B.

	Pico/Corr																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	Conteo	%RSD	Tm prom																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
7.61	7.39	6.05	5.78	5.6	5.36	3.45	2.44	2.36	1	7.61	7.37	6.05	5.79	5.6	5.37	3.43	2.43	2.35	2	7.63	7.38	6.09	5.83	5.63	5.4	3.44	2.44	2.37	3	7.56	7.32	6.05	5.8	5.59	5.38	3.42	2.43	2.35	4	7.52	7.26	6.02	5.77	5.5	5.35	3.4	2.42	2.34	5	7.39	7.16	5.95	5.7	5.28	5.27	3.36	2.4	2.33	6	7.27	7.09	5.91	5.67	5.49	5.27	3.33	2.4	2.31	7	7.28	7.07	5.93	5.7	5.46	5.29	3.33	2.42	2.31	8	7.63	7.41	6.15	5.89	5.63	5.45	3.38	2.4	2.33	9	7.63	7.4	6.16	5.91	5.64	5.46	3.38	2.4	2.33	10	7.6	7.39	6.15	5.9	5.63	5.46	3.36	2.4	2.32	11	7.59	7.36	6.15	5.9	5.64	5.45	3.35	2.39	2.31	12	7.67	7.43	6.15	5.89	5.63	5.44	3.35	2.39	2.3	13	7.66	7.42	6.16	5.9	5.63	5.45	3.35	2.39	2.3	14	7.64	7.41	6.16	5.91	5.63	5.46	3.35	2.38	2.3	15	7.64	7.4	6.17	5.92	5.65	5.46	3.34	2.38	2.3	16	7.55	7.35	6.13	5.88	5.61	5.43	3.32	2.37	2.29	17	7.14	6.95	5.85	5.63	5.36	5.2	3.24	2.37	2.25	18	7.07	6.9	5.83	5.61	5.34	5.2	3.22	2.36	2.25	19	7.11	6.93	5.86	5.65	5.35	5.23	3.23	2.36	2.26	20	7.13	6.95	5.87	5.65	5.36	5.23	3.23	2.36	2.26	21	7.15	6.98	5.92	5.7	5.41	5.29	3.25	2.35	2.27	22	7.07	6.91	5.87	5.65	5.36	5.25	3.23	2.33	2.25	23	7.11	6.95	5.91	5.7	5.4	5.28	3.23	2.33	2.25	24	6.92	6.83	5.77	5.57	5.25	5.16	3.14	2.33	2.25	25	6.85	6.73	5.73	5.53	5.22	5.13	3.13	2.33	2.25	26	6.97	6.85	5.79	5.58	5.25	5.17	3.13	2.33	2.25	27	6.96	6.83	5.79	5.58	5.25	5.17	3.13	2.33	2.25	28	6.95	6.82	5.78	5.58	5.26	5.16	3.12	2.32	2.25	29	6.94	6.82	5.78	5.58	5.25	5.16	3.12	2.32	2.25	30	30	30	30	30	29	30	30	30	20	24	3.95%	3.46%	2.51%	2.26%	2.87%	2.17%	3.21%	1.23%	1.63%	7.33	7.14	5.97	5.74	5.47	5.31	3.29	2.40	2.30

Tabla A7. Día uno (21/04/2013).

	Z4	Z3	Z2	Z1	I1	I0	Pico/Corr
	2.18	3.12	2.75	2.91	14.15	12.1	1
	2.18	3.11	2.74	2.9	14.2	12.03	2
	2.19	3.13	2.75	2.92	14.32	12.07	3
	2.17	3.11	2.73	2.9	14.13	11.85	4
	2.17	3.09		2.89	13.92	11.65	5
	2.15	3.07		2.87	13.93	11.44	6
	2.14	3.05		2.91	13.42	10.78	7
	2.14	3.05	2.65	2.86	13.24	10.7	8
	2.15	3.09	2.66	2.89	14.45	11.47	9
	2.15	3.09	2.66	2.89	14.5	11.41	10
	2.15	3.08	2.75	2.89	14.48	11.36	11
	2.14	3.08	2.64	2.88	14.47	11.26	12
	2.13	3.07	2.64	2.88	14.7	11.45	13
	2.13	3.08	2.64	2.88	14.76	11.42	14
	2.13	3.07	2.63	2.87	14.72	11.38	15
	2.13	3.07	2.63	2.88	14.78	11.35	16
	2.12	3.05	2.62	2.86	14.48	11.1	17
	2.09	2.99	2.63	2.86	13.45	10.35	18
	2.09	3.06	2.52	2.87	12.98	9.9	19
	2.09	3	2.65	2.87	13.7	9.9	20
	2.1	3		2.82	13.07	9.85	21
	2.1	3.02	2.58	2.85	12.85	9.81	22
	2.08	2.99	2.55	2.82	12.58	9.63	23
	2.09	3	2.57	2.82	12.74	9.72	24
	2.05	2.93		2.78	12.36	9.02	25
	2.04	2.92		2.77	12.18	8.9	26
	2.05	2.92	2.59	2.77		9.1	27
	2.05	2.92		2.77	12.72	9.07	28
	2.04	2.92		2.77	12.62	9.03	29
		2.95		2.8	12.63	8.99	30
	29	30	21	30	29	30	Conteo
	2.11%	2.19%	2.52%	1.64%	6.18%	10.23%	%RSD
	2.12	3.03	2.65	2.86	13.67	10.60	Tm prom

Tabla A8. Día dos (22/04/2013).

	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Pico/Corr
	14.15	9.93	7.42	7.3	6.11	5.89	5.69	5.43	3.23	2.29	2.24	1
	13.66	9.68	7.28	7.16	6.02	5.8	5.45	5.35	3.2	2.27	2.23	2
	13.93	9.8	7.36	7.23	6.08	5.85	5.51	5.4	3.21	2.27	2.24	3
	13.3	9.33	7	6.88	5.81	5.6	5.29	5.19	3.14	2.25	2.21	4
	13.23	9.15	6.99	6.86	5.83	5.62	5.3	5.21	3.15	2.33	2.24	5
	13.4	9.34	7.09	6.96	5.88	5.67		5.24	3.15	2.29	2.23	6
	13.48	9.6	7.22	7.07	5.98	5.76	5.41	5.33	3.19	2.25	2.23	7
	13	9.22	7.03	6.9	5.85	5.64	5.33	5.23	3.17	2.34	2.23	8
	13.78	9.75	7.33	7.17	6.06	5.84	5.5	5.39	3.21	2.35	2.24	9
	13.17	9.36	7.1	6.95	5.92	5.7		5.28	3.17	2.27	2.22	10
	12.79	9.16	7.02	6.88	5.85	5.63	5.3	5.22	3.16	2.3	2.23	11
	13.15	9.35	7.12	7	5.93	5.72	5.38	5.29	3.17	2.31	2.22	12
	13.12	9.1	7.06	6.93	5.85	5.65	5.37	5.28	3.12		2.22	13
	12.73	9.02	7.05	6.93	5.9	5.69		5.27	3.17	2.35	2.23	14
	12.71	8.96	7.03	6.9	5.88	5.67	5.35	5.26	3.16	2.33	2.24	15
	12.21	9.03	7.09	6.97	5.88	5.68		5.25	3.13	2.3	2.23	16
	13.5	9.34	7.21	7.09	6	5.78	5.42	5.35	3.17	2.32	2.22	17
	14.3	9.72	7.43	7.31	6.15	5.93	5.55	5.46	3.2	2.25	2.23	18
	14.15	9.65	7.39	7.28	6.11	5.89		5.43	3.19	2.27	2.22	19
	14.21	9.65	7.41	7.3	6.13	5.9		5.44	3.19	2.25	2.23	20
	14.22	9.66	7.44	7.27	6.13	5.9	5.53	5.44	3.19	2.26	2.23	21
	14.16	9.6	7.36	7.28	6.1	5.88		5.42	3.18	2.26	2.22	22
	14.27	9.65	7.4	7.3	6.13	5.91	5.37	5.45	3.19	2.25	2.22	23
	14.15	9.64	7.4	7.29	6.13	5.9		5.45	3.18	2.26	2.23	24
	14.28	9.53	7.48	7.35	6.14	5.91		5.46	3.19	2.36	2.23	25
	14.35	9.55	7.46	7.35	6.14	5.91		5.46	3.18	2.26	2.23	26
	14.37	9.57	7.5	7.37	6.16	5.92		5.47	3.19	2.35	2.23	27
	14.37	9.55	7.48	7.36	6.15	5.92		5.47	3.18	2.36	2.23	28
	14.44	9.57	7.5	7.39	6.17	5.94		5.48	3.19	2.36	2.24	29
	14.45	9.57	7.47	7.34	6.16	5.93		5.47	3.18	2.27	2.23	30
	30	30	30	30	30	30	15	30	30	29	30	Conteo
	4.66%	2.69%	2.53%	2.63%	2.09%	2.03%	2.09%	1.82%	0.75%	1.75%	0.34%	%RSD
	13.70	9.47	7.27	7.15	6.02	5.80	5.43	5.36	3.18	2.30	2.23	Tm Prom

Tabla A8. Día dos (22/04/2013).

	4	3	2	1	Pico/Corr
	2.08	3	2.52	2.85	1
	2.07	2.98	2.5	2.82	2
	2.07	2.99	2.5	2.83	3
	2.05	2.97	2.42	2.83	4
	2.06	2.94	2.47	2.8	5
	2.1	2.95	2.52	2.85	6
	2.07	2.98	2.49	2.82	7
	2.07	2.96		2.8	8
	2.08			2.9	9
	2.06	2.95	2.48	2.8	10
	2.06	2.95		2.77	11
	2.06			2.95	12
	2.09	2.92			13
	2.06	2.96	2.48	2.81	14
	2.07	2.96	2.47	2.81	15
	2.05				16
	2.06	2.96	2.52	2.81	17
	2.07	2.99	2.48	2.84	18
	2.06	2.98	2.48	2.83	19
	2.07	2.99	2.48	2.83	20
	2.06	2.98	2.48	2.83	21
	2.05	2.97	2.47	2.83	22
	2.06	2.48		2.98	23
	2.06	2.98	2.47	2.83	24
	2.06	2.99	2.47	2.85	25
	2.06	2.98			26
	2.06	2.98	2.47	2.85	27
	2.06	2.98	2.47	2.85	28
	2.07	2.99	2.47	2.86	29
	2.06	2.98	2.47	2.85	30
	30	27	22	27	Conteo
	0.54%	3.26%	0.89%	1.55%	%RSD
	2.07	2.95	2.48	2.84	Tm Prom

9.2.3. Análisis de la varianza multifactorial para los datos de la tabla 6.6.

El factor estudiado para saber si el tipo de lavado (A o B) tiene influencia en el % RSD obtenido (precisión).

La prueba de hipótesis realizada se basa en lo siguiente:

H₀: No hay diferencias significativas en los %RSD por el factor.

H₁: Hay diferencias significativas en los %RSD por el factor.

Se acepta H₀ si $F_{exp} < F_{tab}$ o si el valor de probabilidad $p > 0.05$

Tabla AN.2. Análisis de varianza de un factor para los datos de la tabla 6.6.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.00147	1	0.00147	0.00	0.9873
Intra grupos	159.663	28	5.70225		
Total (Corr.)	159.665	29			

Conclusión: No existe una influencia significativa del tipo de lavado en el cambio de %RSD, ya que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para cada uno de estos tipos de lavado A y B. Solo podemos decir por el diagrama de caja con bigote obtenido, que utilizando el tipo de lavado B pueden obtenerse datos con una menor dispersión, es decir, más precisos.

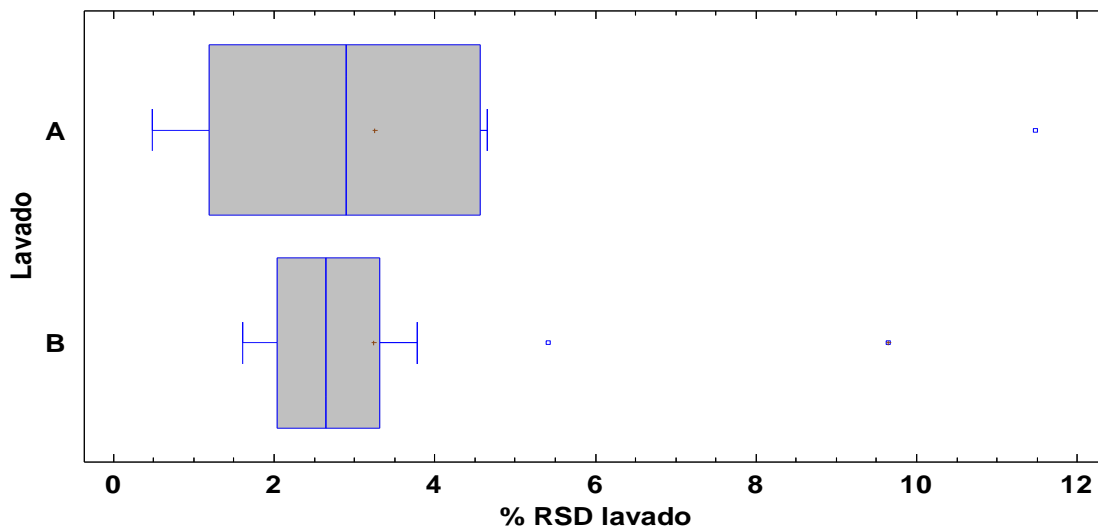


Figura AN.1. Gráfico de caja y bigotes para el tipo de lavado y su efecto en el %RSD.

9.3. Análisis de las diferentes muestras.

9.3.1. Análisis de la varianza multifactorial para evaluar la influencia de la localidad y el color de semilla a los picos diferenciales obtenidos del perfil de las prolaminas.

Los factores estudiados para saber si existe influencia sobre la cantidad de picos diferenciales fueron:

- a) Localidad de origen.
- b) Color de la semilla.

La prueba de hipótesis realizada se basa en lo siguiente:

H₀: No hay diferencias significativas en el número de picos diferenciales.

H₁: Hay diferencias significativas en los picos diferenciales.

Se acepta H₀ si $F_{exp} < F_{tab}$ o si el valor de probabilidad $p > 0.05$

Tabla AN.3. Análisis de varianza multifactorial para los datos de la tabla 6.7.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Localidad	81.25	12	6.77083	1.42	0.3703
B:Color	10.4167	2	5.20833	1.09	0.4050
RESIDUOS	23.9167	5	4.78333		
TOTAL (CORREGIDO)	120.2	19			

Conclusión: No hay una influencia significativa de la localidad de origen y el color de semilla sobre la cantidad de picos diferenciales, ya que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para cada factor (Localidad y color de semilla).

9.3.2. Análisis clúster para las muestras de chía analizadas.

Paso	Número de conglomerados	Nivel de semejanza	Nivel de distancia	Conglomerados incorporados		Nuevo conglomerado
1	20	93.333	1.0000	8	13	8
2	19	93.333	1.0000	2	9	2
3	18	88.889	1.6667	4	8	4
4	17	86.667	2.0000	11	12	11
5	16	80.000	3.0000	10	18	10
6	15	80.000	3.0000	6	15	6
7	14	80.000	3.0000	1	2	1
8	13	75.556	3.6667	6	7	6
9	12	73.333	4.0000	3	5	3
10	11	66.667	5.0000	10	20	10
11	10	66.667	5.0000	16	17	16
12	9	60.000	6.0000	19	21	19
13	8	54.667	6.8000	1	11	1
14	7	46.667	8.0000	3	19	3
15	6	40.889	8.8667	1	14	1
16	5	31.111	10.3333	4	10	4
17	4	0.000	15.0000	4	6	4
18	3	-11.111	16.6667	3	16	3
19	2	-13.333	17.0000	1	4	1
20	1	-113.016	31.9524	1	3	1

9.3.3. Análisis de la varianza multifactorial para la respuesta de porcentaje de aceite total.

Los factores estudiados para saber su influencia en el porcentaje de Aceite Total fueron:

- A) El color de la semilla.
- B) Su lugar de procedencia (localidad).

La prueba de hipótesis realizada se basa en lo siguiente:

Ho: No hay diferencias significativas en los % de Aceite total por el factor.

H1: Hay diferencias significativas en los % de Aceite total por el factor.

Se acepta Ho, si $F_{exp} < F_{tab}$ o si el valor de probabilidad $P > 0.05$

Tabla AN.4. Análisis de varianza multifactorial para los datos de la tabla 6.9.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Color semilla	3.51003	2	1.75502	0.87	0.5045
B:Ubicación	272.504	14	19.4646	9.61	0.0436
RESIDUOS	6.07392	3	2.02464		
TOTAL (CORREGIDO)	305.897	19			

Conclusión: El factor que influyen de forma significativa en el % de Aceite Total es B) el lugar de procedencia (localidad), mientras que el color es un factor que no tiene influencia en ésta respuesta.

9.3.4. *Análisis de la varianza multifactorial para la respuesta de porcentaje de humedad.*

Los factores estudiados para saber su influencia en el % de Humedad fueron:

- A) El color de la semilla.
- B) Su lugar de procedencia (localidad).

La prueba de hipótesis realizada se basa en lo siguiente:

Ho: No hay diferencias significativas en los % de humedad por el factor.

H1: Hay diferencias significativas en los % de humedad por el factor.

Se acepta Ho, si $F_{exp} < F_{tab}$ o si el valor de probabilidad $P > 0.05$

Tabla AN.5. Análisis de varianza multifactorial para los datos de la tabla 6.9.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Ubic	11.9007	15	0.793378	5.24	0.0989
B:Semilla color	0.0133894	2	0.0066947	0.04	0.9573
RESIDUOS	0.453927	3	0.151309		
TOTAL (CORREGIDO)	17.162	20			

Conclusión: Ni el Lugar (localidad), ni el color de la semilla tienen una influencia significativa en el porcentaje de Humedad obtenido para todas las semillas estudiadas.