



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

---

---

CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS  
PRESENTES EN LA SEMILLA Y ACEITE DE CHÍA (*Salvia Hispánica L.*),  
MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA:

MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

ASESORA: DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI ESTADO DE MÉXICO 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa 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 y Cuantificación de Compuestos Fenólicos presentes en semillas y Aceite de Chía (Salvia Hispánica L), mediante Electroforesis Capilar**

Que presenta el pasante: Marco Antonio Hernández Hernández  
Con número de cuenta: 407071427 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 10 de febrero de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Brígida del Carmen Camacho Enríquez	
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
SECRETARIO	Q. José Antonio Piña Tavera	
1er. SUPLENTE	MC. Pablo Hernández Matamoros	
2do. SUPLENTE	Q. Karla Paola Hernández Pérez	

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

HHA/iac



Mi más sincero agradecimiento a:

A mis padres Gelasio y Heliberta

Gracias por todo el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida, por todos los consejos ya que han hecho más ligero mi camino, por las palabras de aliento en los momentos más difíciles, por todas las cosas, por la vida misma. Gracias los quiero mucho.

A mis hermanos Filiberto y Reyna

Gracias por los momentos buenos y malos que pasamos juntos, por su apoyo incondicional en toda la carrera, porque siempre me han apoyaron en todo y creyeron en mí ya que nunca me dejaron solo.

A mis sobrinos Miguel Ángel, José Alberto y Dulce Jazmín

Gracias por permitirme compartir cada uno de estos últimos años con sus llantos y risas. Cada uno ha contribuido con un granito para que yo culmine una etapa más de mi vida. Porque siempre tenían la intención de ayudarme en mis labores estudiantiles para que yo jugara con ustedes. Espero les sea un ejemplo a seguir.

A mi amigo Ramiro Ortiz Neri por todos sus consejos, comentarios eres un ejemplo a seguir.

A mis compañeros de Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos; Rosa, Claudia, Érica, Casandra, Lupita, Aarón, y Luis por todos los consejos y apoyos brindados durante el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos de la licenciatura en especial a Martha Teresa, Anabel y Maricela por compartir grandes momentos durante estos últimos años, por darme ánimo y consejos, porque siempre estuvieron cuando más las necesité, por que estuvimos juntos en las buenas y las malas. Anabel gracias por haberme recomendado para tener mi primer trabajo como Químico. Por los buenos momentos que pasamos en el área de teñido en la master

A todos mis profesores que durante todo el camino me formaron y educaron para llegar a ser un hombre de bien.



A la Dra. Marina por permitirme estar en su laboratorio, haciendo uso de la red para la elaboración de este escrito, por todos sus consejos, gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas a una de las mejores universidades del mundo.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por enseñarme los valores éticos, morales y profesionales, por ser como mi segunda casa y permitirme salir como profesional de alto nivel.

A la Dra. María Gabriela Vargas por la confianza y paciencia por creer en mí y sobre todo por el apoyo brindado en este proyecto, por los consejos, ya que siempre nos invita a seguirmos preparando día a día , por sus enseñanzas tanto profesionales como de la vida.

A todos mis compañeros de trabajo de la Escuela Preparatoria Oficial N° 24, por todos sus consejos. Paulina, Pili, David, Eliel, Gaby, Brenda.

**ABREVIATURAS****Tabla 1. Abreviaturas**

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
EC	Electroforesis capilar
T <sub>m</sub>	Tiempo de migración
Nm	Nanómetros
G	Gramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
kV	Kilovoltios
μA	Microampers
λ	Longitud de onda
UV	Ultravioleta
Min	Minutos
Ha	Hectárea
Ton	Tonelada
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CV	Coeficiente de Variación
CG	Cromatografía de Gases
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ECC	Electrocromatografía Capilar
PAL	Fenilalanina Amonio Liasa
Q	Carga
Fe	Fuerza electroestática
E	Campo eléctrico
F <sub>f</sub>	Fuerza de fricción
H	Viscosidad
R	Radio de la partícula
Y	Velocidad de migración
FEO	Flujo electroosmótico
M	Molar
N	Normal
S	Segundos
Mg	Miligramos
L	Litro
V	Volumen
R	Resistencia
I	Intensidad de corriente
Cm	Centímetro
μL	Microlitro
IC(β <sub>1</sub> )	Intervalo de confianza para la pendiente
IC(β <sub>0</sub> )	Intervalo de confianza para la ordenada al origen



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>9</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Características de la semilla de chía .....</b>	<b>10</b>
1.1.1 Historia de la semilla de chía.....	10
1.1.2 Caracterización botánica.....	11
1.1.3 Clasificación Taxonómica.....	12
1.1.4 Distribución geográfica.....	12
1.1.5 Composición.....	13
1.1.6 Cultivo .....	13
<b>1.2 Compuestos Fenólicos .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Flavonoides. ....	14
1.2.2 No Flavonoides .....	17
1.2.3 Actividad biológica de los compuestos fenólicos.....	18
1.2.4 Análisis de compuestos fenólicos.....	19
1.2.5 Biosíntesis de compuesto fenólicos.....	20
<b>1.3 Electroforesis capilar .....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Instrumentación .....	22
1.3.2 Proceso electroforético .....	23
1.3.3 Principios de la separación electroforética.....	25
1.3.4 Factores de los que depende la velocidad de migración del analito.....	27
<b>1.4 Extracción Soxhlet.....</b>	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>31</b>
<b>3. DESARROLLO EXPERIMENTAL. ....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Equipo, material y muestras. ....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Equipo. ....	32
3.1.2 Materiales.....	32



3.1.3 Muestras Analizadas.....	33
3.2 Extracción de aceite y compuestos fenólicos en la semilla de chía.....	33
3.2.1 Extracción del aceite de chía .....	33
3.2.2 Extracción de compuestos fenólicos de la semilla de chía con etanol . .....	34
3.2.3 Extracción de compuestos fenólicos presentes en el aceite . .....	34
3.3 Análisis de compuestos fenólicos mediante electroforesis capilar. ....	34
3.3.1 Acondicionamiento y lavado del capilar. ....	35
3.4 Preparación de soluciones estándar (vainillina, ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, kaempferol, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillinico, quercetina, ácido cafeico y ácido gálico a 1000 mg/L.....	35
3.5 Inyección de la mezcla de estándares. ....	36
3.6 Identificación de los compuestos fenólicos presentes en las diferentes variedades de chía (harina y aceite).....	36
3.6.1 Identificación cualitativa. ....	36
3.6.2 Fortificación.....	36
3.7 Selección de los estándares internos (E.I). ....	37
3.8 Preparación de las Curvas de calibración.....	37
3.8.1 Procedimiento y cálculos para la preparación de las curvas de calibración de los polifenoles.....	38
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
4.1 Optimización de las condiciones electroforéticas para separar los compuestos fenólicos presentes en el aceite y semilla de chía. ....	44
4.2 Condiciones óptimas para el análisis de muestras por la técnica de Electroforesis Capilar.....	46
4.2.1 Ciclo de lavado.....	46
4.3 Identificación cualitativa de compuestos fenólicos presentes en el aceite y en la harina de la semilla de chía.....	48
4.4 Selección del estándar interno.....	57
4.5 Curvas de calibración para los compuestos fenólicos presentes en los las muestras de chía.....	58
4.6 Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en el aceite y semilla de chía y comparación con otras fuentes de antioxidantes (semillas, aceite, frutas y verduras).....	59
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>
<b>ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>72</b>





<b>ANEXO 1. Características de los compuestos químicos estudiados .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO 2 Electroferograma de las muestras fortificadas con adición del estándar a confirmar.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 3. Respuestas y curvas de calibración obtenidas para cada uno de los fenoles presentes en las muestras de chía.....</b>	<b>80</b>



## RESUMEN

Actualmente los alimentos con elevado contenido de antioxidantes son objeto de estudio debido a la evidencia de que previenen enfermedades crónico-degenerativas. La semilla de chía es un alimento milenario que actualmente ha sido revalorizado debido a sus propiedades nutricias como son su elevado contenido de fibra, proteínas y carbohidratos, contiene 30% de aceite cuya composición es rica en ácidos grasos indispensables (esenciales), también existen evidencias de su elevado contenido de polifenoles que actúan como antioxidantes (González 2011).

En el presente trabajo se llevó a cabo la optimización de un método analítico para la caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en tres variedades de semillas de chía provenientes de los estados de Puebla y una del estado de Colima, en la parte seca (harina), así como en el aceite extraído de las mismas. Se caracterizaron los compuestos fenólicos en las muestras de harina y aceite de chía, mediante el uso de la electroforesis capilar (EC), confirmando su identidad por adición de estándar para confirmar el aumento en la señal en la muestra y por comparación de los espectros de absorción con el estándar correspondiente. Posteriormente, se realizó la cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en las muestras, por interpolación en las curvas de calibración correspondientes y utilizando la relación de áreas de el fenol correspondiente entre la obtenida con el estándar interno adicionado. Varios parámetros estadísticos de la validación del método fueron evaluados para asegurar que el método desarrollado es confiable. Los resultados obtenidos del contenido de polifenoles en el aceite y semilla de chía fueron comparados con referencias encontradas para otras fuentes de antioxidantes como semillas, aceite, frutas y verduras, con la finalidad de poder llegar a conclusiones sobre la riqueza en polifenoles contenida en la semilla de chía y los beneficios que puede producir su consumo en la salud de la población.



## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Características de la semilla de chía

#### 1.1.1 Historia de la semilla de chía

La chía (*Salvia hispanica*) es una planta anual de la familia *Lamiaceae* que se produce principalmente en el Estado de Jalisco y algunas regiones de Sinaloa. Comenzó a usarse como alimento hace unos 5500 años, se convirtió en un cultivo básico en el centro de México y era consumido por los aztecas debido a su aporte energético (Beltrán Orozco y Romero, 2003).

En la época prehispánica (de acuerdo a la Crónica de la Nueva España), la chía era uno de los alimentos básicos de las civilizaciones de América Central (los aztecas y los mayas) después del maíz y el frijol y antes que el amaranto (Ayerza y Coates, 2006).

Entre sus usos la semilla era molida y convertida en harina, la cual era incorporada en las tortillas y los tamales, también se empleo como bebida al mezclarse con agua (Ayerza y Coates, 2004). Actualmente la semilla se utiliza comúnmente en la preparación de bebidas, se puede obtener mucílago dejando reposar la semilla en agua, para utilizarla como fibra dietética o para añadirla y dar espesor a mermeladas, jaleas, yogures, mostaza; igualmente es útil en la industria cosmética y otras aplicaciones (Beltrán y Romero, 2003).

El aceite de la chía conocido como *chiamatl* fue usado como cosmético. Este aceite era componente de ungüentos debido a sus propiedades emolientes. También era utilizado como base para pinturas, además de que era un componente básico en la pintura para los cuerpos de los guerreros durante las ceremonias religiosas y sociales, además para dar acabados brillosos a las vasijas y platos (Cahill, 2003).



Ilustración 1. Semilla de chía (Cahill 2003)



Los aztecas recibían semilla de chía como tributo anual de los pueblos conquistados y la ofrecían a los dioses como parte de las ofrendas en las ceremonias religiosas. El uso de la chía en las ceremonias religiosas paganas fue el motivo por el cual los conquistadores españoles trataron de eliminarla y reemplazarla con especias traídas del viejo mundo (Beltrán y Romero, 2003).

Desafortunadamente el consumo de esta semilla se abandonó, a tal grado que en la actualidad su producción a nivel nacional apenas alcanza las 300 toneladas de semilla producidas anualmente, mientras que en la época prehispánica parece haber sido de alrededor de 10, 000 toneladas (Reforma, 2006).

### 1.1.2 Caracterización botánica.

La *Salvia hispnica* es una planta herbácea de la familia *Lamiaceae* de 1 a 1.5 m de altura de tallos cuadrangulares, hojas ovadas y oblongas, de color verde oscuro en el anverso y verde pálido en el reverso, las flores (ilustración 2) se producen en las espigas terminales, de color morado o azul con cáliz en forma de campana; en el fruto se encuentran las semillas que son ovaladas de aproximadamente dos milímetros de largo por uno y medio de ancho, son lisas brillantes color oscuro grisáceo, con muchas irregularidades de color rojizo (ilustración 3). Esta semilla oleaginosa está compuesta de tres capas, la más exterior no se diferencia hasta el momento en que la semilla tiene contacto con el agua y se observa una capa de gel conocida comúnmente como mucílago (Flores, 1938). Este mucílago, es un polisacárido principalmente constituido de ácido urónico y xilosas llega a absorber una cantidad de agua de hasta siete veces el peso de la semilla (Lin et al., 1994; Scheer, 2001).



Ilustración 2. Flor de chía (Ayerza y Coates, 2006)



Ilustración 3. Semilla de chía (Ayerza y Coates, 2006)

### 1.1.3 Clasificación Taxonómica

Tabla 2. Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae: plantas
Subreino	Tracheobionta: planta vascular
División	Magnoliophyta: angiosperma
Clase	Magnoliopsida: dicotiledones
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Genero	<i>Salvia L.</i>
Especie	<i>Salvia hispanica L.</i>

(<http://www.itis.gov/index.html>).

### 1.1.4 Distribución geográfica

Originaria de las arenas montañosas que se extienden desde el oeste central de México hasta el norte de Guatemala. Es una planta anual de verano, las formas silvestres se dispersan a través de la Sierra Madre Occidental de Sonora y de Chihuahua (Flores 1938).

Crece en terrenos ligeros, profundos y arenosos y es propia de climas cálidos y templados, es sensible a las heladas y resistente a climas secos; florece de julio a agosto, y sus flores son hermafroditas (Flores 1938).

La *Salvia hispanica* L. cuenta con varios nombres comunes como salvia española, artemisa española, chía mexicana, chía negra o simplemente chía (Scheer, 2001; Clebsh, 2000).



### 1.1.5 Composición

La composición química de chía (tabla 3) y su valor nutrimental, le confieren un gran potencial para usarla dentro de los mercados alimenticios e industriales.

**Tabla 3. Análisis proximal de la semilla de chía.**

COMPONENTE	g/ 100g de semilla
<b>Humedad</b>	5.97 ± 0.14
<b>Grasa</b>	26.55 ± 1.37
<b>Fibra</b>	30.19 ± 0.13
<b>Cenizas</b>	2.73 ± 0.13
<b>Proteínas</b>	19.79 ± 0.42
<b>Carbohidratos</b>	14.77

(Velasco, 2003).

Otro autores, como Ayerza y Coates, (1996), reportan ácido linoleico; Bushway *et al.*, (1981), ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3) y las sales minerales de Ca, K, Mg, P, Al, B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn. Reyes, (2006) concluyó que tiene un alto contenido de fibra dietética (66%) e indica que posee la capacidad de retener agua y estabilizar emulsiones, además de que la fibra dietética insoluble es importante ya que puede tener efectos hipocolesterolémicos. Posee también elementos naturales que al extraerlos de la semilla desengrasada presentan actividad antioxidante es decir, estructuras polifenólicas que tiene la capacidad de retardar el efecto de la oxidación de las grasas. Ayerza y Coates, (1996) reportaron ácido clorogénico, ácido caféico, miricetina, quercetina y kaempferol.

### 1.1.6 Cultivo

En la actualidad se cultiva comercialmente en México, Bolivia, Argentina, Ecuador, Australia y Guatemala. Está reportado que en el 2008, Australia fue el mayor productor de chía a nivel mundial, el Valle de Ord produjo un total de 750 Ha. El registro nacional de la SAGARPA (2012) identificó en los estados de Jalisco y Puebla en el 2009 tuvo, una producción de 45 Ha, sembradas con un rendimiento de semilla de 0.99 Ton/Ha a un precio por tonelada de \$ 5,291.67 pesos.



## 1.2 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias químicas con estructura que consiste en un núcleo aromático con al menos un sustituyente hidroxílico libre o sustituido. Se diferencian de otros compuestos, que también poseen esta estructura fenólica (monoterpenos), en su origen biosintético (Macheix *et al.* 1990).

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Robbins, 2003; Kähkönen *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista de sus estructuras los compuestos fenólicos se pueden clasificar en dos grandes grupos: fenoles flavonoides y fenoles no flavonoides.

### 1.2.1 Flavonoides.

De la diversidad de compuestos fenólicos vegetales, los Flavonoides ( $C_6-C_3-C_6$ ) son los que presentan una distribución mayor dentro del reino vegetal (Markham, 1982). Los flavonoides son compuestos que presentan dos anillos aromáticos, el anillo A y el anillo B unidos entre sí por un anillo heterocíclico, llamado anillo C (ilustración 4).

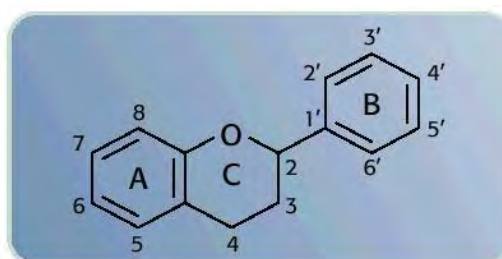


Ilustración 4. Estructura básica de los flavonoides (Sánchez, 2002)



Existen varios tipos de flavonoides, los cuales se diferencian entre sí por el grado de oxidación presente en el anillo heterocíclico C, los más ampliamente distribuidos son las antocianinas, los flavonoles, las flavonas, las flavanonas, y las isoflavanonas (Almaraz-Abarca, 2007).

Los flavonoides llevan a cabo funciones muy importantes en diversos procesos fisiológicos y en el establecimiento de las diferentes relaciones ecológicas, principalmente de defensa, de las plantas. Esta amplia gama de funciones es el resultado de su diversidad química estructural y de la variedad de sustituciones de grupos funcionales (Anzellotti e Ibrahim, 2004).

### 1.2.1.1 Antocianinas

Este es un grupo de compuestos ampliamente distribuido entre las diferentes especies de plantas. Son compuestos conspicuos porque son coloridos, responsables del color rojo, rosa, púrpura y azul de flores, frutos, y semillas (ilustración 5). Se consideran que las antocianinas actúan como atrayentes de polinizadores y de dispersores de semillas debido precisamente a la coloración que dan a las flores y frutos (Taiz y Zeiger, 1991).

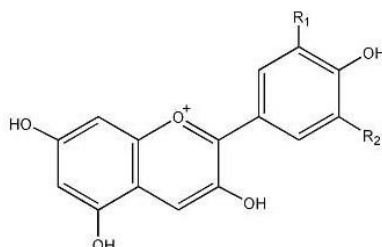


Ilustración 5. Estructura general de las antocianinas (Sánchez 2002).

### 1.2.1.2 Flavonoles

Los flavonoles representan un grupo de flavonoides generalmente incoloros, que se encuentran con mayor frecuencia en las flores, actuando como copigmentos de las antocianinas, aunque también están presentes en las hojas de todas las plantas verdes (Harborn y Turner 1984). Absorben a longitudes de ondas cortas en la región del ultravioleta, lo que los hace imperceptibles al ojo humano, pero no al de los insectos que ven dentro del intervalo ultravioleta del espectro de radiación (ilustración 6). Por esta razón también se les considera como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas (Taiz





y Zeiger, 1991) Kliebenstein (2004) menciona que según Fiscus et al. (1999) y Britt (2003), los flavonoles tienen relación directa con la protección de las plantas haciéndolas resistentes al daño por los rayos UV.

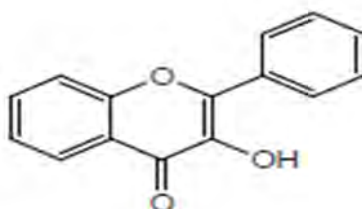


Ilustración 6. Estructura general de los Flavonoles (Sánchez, 2002)

### 1.2.1.3 Flavonas

Las flavonas poseen características similares a las de los flavonoles, la diferencia entre ellos radica en la ausencia en éstas, de un grupo hidroxilo en la posición 3, el cual está presente en los flavonoles (ilustración 7). Las flavonas son flavonoides que tienen máximos de absorción en la región ultravioleta del espectro de radiación y a las que se les reconocen papeles importantes como mecanismos de defensas de las plantas contra el ataque de herbívoros (Hadacek, 2002) y patógenos (Ryals *et al.*, 1994).

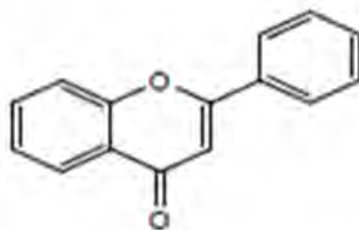


Ilustración 7. Estructura general de las flavonas (Sánchez 2002).

### 1.2.1.4 Flavanonas

Las flavanonas son un tipo de flavonoides que carecen de un doble enlace en el anillo C (ilustración 8). Su distribución dentro del reino vegetal es más restringida que la de las antocianinas, flavonoles, flavona. Las flavanonas y las chalconas son interconvertibles



entre sí, de ahí que no es raro encontrarlas juntas, aunque esporádicamente las flavanonas se presentan en las plantas sin su chalcona análoga (Harborn *et al.*, 1984).

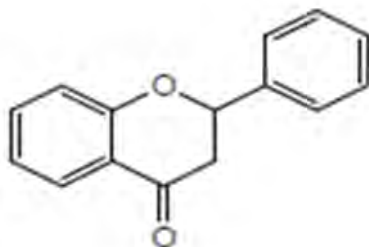


Ilustración 8. Estructura general de las flavanonas (Sánchez, 2002)

#### 1.2.1.5 Isoflavonoides

Este tipo de flavonoides se caracteriza por tener el anillo aromático B en la posición dos (ilustración 9). Está formado, entre otros, por las isoflavonas y las isoflavanonas, derivados respectivamente de las flavonas y las flavanonas (Dewick, 1994).

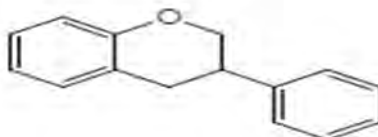


Ilustración 9. Estructura general de los isoflavonoides (Sánchez, 2002)

#### 1.2.2 No Flavonoides

Esta denominación abarca a los ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos ( $C_6-C_1$ ) (ilustración 10) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada ( $C_6-C_3$ ), pero también otros derivados fenólicos como los estilbenos.

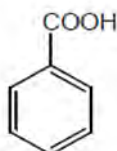


Ilustración 10. Estructura general de ácidos benzoicos (Sánchez, 2002)



### 1.2.2.1 Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos fenólicos más sencillos que los flavonoides. Su fórmula química condensada es  $C_6-C_3$ . (ilustración 11). Son ejemplos de estos ácidos el cafeico y el ferúlico. Junto con los flavonoides, estos compuestos son los fenoles que más comúnmente se encuentran en el polen de las plantas (Campos, 1997; Almaraz-Abarca *et al*, 2004).

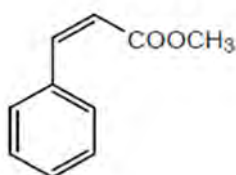


Ilustración 11. Estructura general de los ácidos hidroxicinámicos (Sanchez, 2002)

### 1.2.2.2 Estilbenos

Este grupo de compuestos fenólicos poseen una estructura de 2 anillos fenólicos unidos mediante dos átomos ( $C_6-C_2-C_6$ ) (ilustración 12).

El resveratrol es un compuesto fenólico del grupo de los estilbenos presente principalmente en las uvas y derivados (vino). En estos alimentos, se encuentra libre o como derivado glicosídico del resveratrol conocido como piceido (resveratrol-3-O-glucósido). Este compuesto ayuda a frenar el envejecimiento y prevenir las enfermedades cardiovasculares, y además posee propiedades antiinflamatorias y antitumorales.

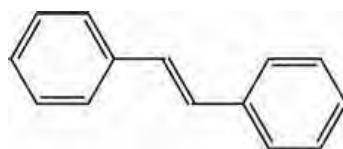


Ilustración 12. Estructura general de los estilbenos (Sánchez, 2002)

### 1.2.3 Actividad biológica de los compuestos fenólicos

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV),



inhiben las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como; antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento (Velioglu *et al*, 1998; Proestos *et al*, 2005).

#### 1.2.4 Análisis de compuestos fenólicos

En cuanto a su análisis, se han desarrollado un gran número de técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos. Tradicionalmente se han determinado mediante métodos colorimétricos ya que estos compuestos son capaces de sufrir una gran variedad de reacciones de condensación que generan especies intensamente coloreadas que son fácilmente analizables por espectrofotometría (Sánchez-Paniagua, 2008).

La necesidad de identificación individual de los compuestos fenólicos en distintas muestras requiere el uso de las técnicas especializadas de separación, como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (CG) y electroforesis capilar (EC). HPLC es la técnica analítica más utilizada para la caracterización de compuestos fenólicos, como lo refleja el gran número de artículos publicados. (Carrasco, 2006) Los sistemas de detección más empleados en HPLC son espectrofotometría UV-visible con arreglo de fotodiodos en serie, espectrometría de masas y detección electroquímica. La electroforesis capilar ha sido incorporada como alternativa o complemento de las separaciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos en distintas matrices, ya que es una técnica de alta resolución, sin paso de derivatización previo y corto tiempo de análisis (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Gómez-Caravaca *et al* 2006). Recientemente se ha utilizado como técnica analítica la electrocromatografía capilar (ECC), técnica híbrida de electroforesis capilar y HPLC, uniéndose las ventajas de ambas y combinando la retención cromatográfica con la movilidad electroforética (Stoggl *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2007). El mayor inconveniente radica en la baja vida de la columna, así como el elevado tiempo de acondicionamiento de la columna, lo que perjudica a la robustez del método y al precio del análisis.



### 1.2.5 Biosíntesis de compuesto fenólicos

La principal función de la fenilalanina es la producción de proteínas, no obstante, una parte se desvía de esta ruta, y la fenilalanina pasa a ser el precursor común de la síntesis de muchos de los compuestos fenólicos en plantas superiores. Representa el substrato inicial en la serie de reacciones colectivas conocida generalmente como “metabolismo general fenilpropanoide”, y el aporte de fenilalanina por la vía del shikimato parece ser una forma simple de controlar la síntesis de compuestos fenolicos (Ryan et al., 2002). En la ruta del shikimato (ilustración 13 y 14) la actividad de la Fenilalanina amonio liasa (PAL) juega un papel muy importante en la producción total de fenoles siendo este paso altamente sensible a condiciones ambientales; los más importantes son aquellos que se pueden considerar estresantes como temperatura, luz ultravioleta y daños físicos de la planta. Su actividad también varía con el grado de maduración del fruto. Por lo que la concentración de compuestos será en función de la actividad de dicha enzima.

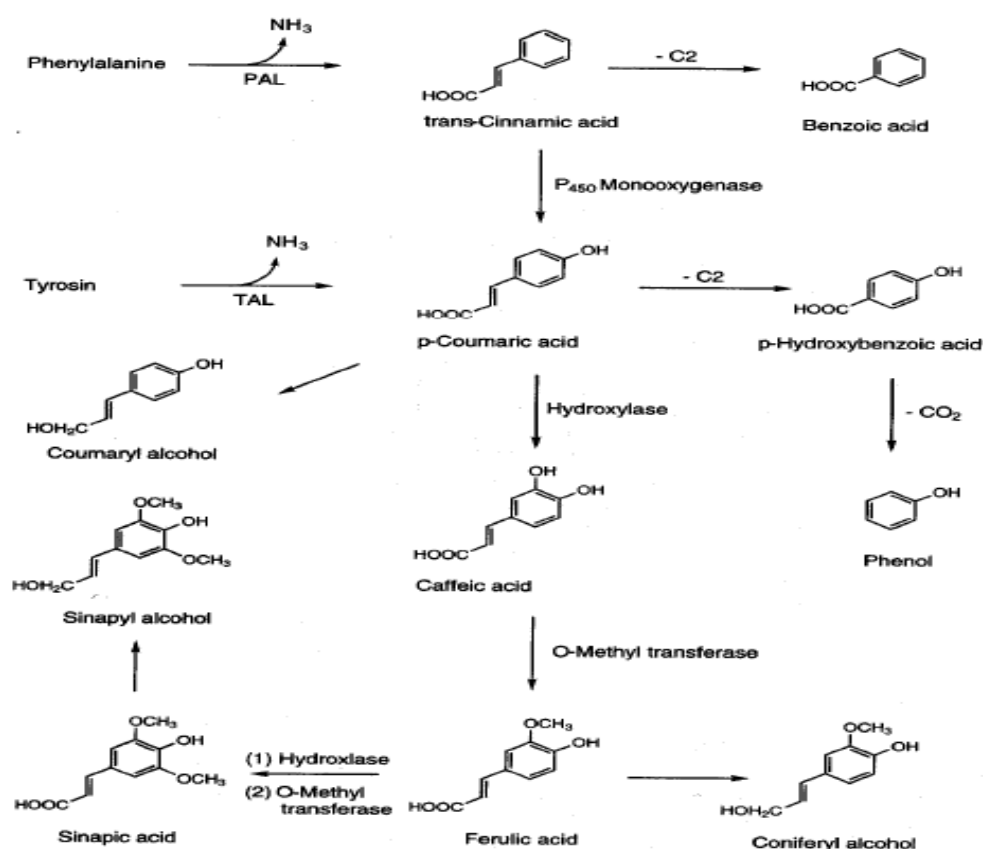


Ilustración 13. Formación de compuestos fenólicos a partir de la fenilalanina (González, 2011).



El grupo más importante de los compuestos fenólicos son los flavonoides, incluyendo flavonas, isoflavonas y antocianidinas, las que se forman vía condensación del fenilpropano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), con la participación de 3 moléculas de malonil coenzima A, la cual permite la formación de chalconas, que posteriormente se ciclan en condiciones ácidas. Por lo que los flavonoides tienen la estructura básica de los difenilpropanoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) que consiste en dos anillos aromáticos unidos a 3 carbonos que forman un anillo heterocíclico oxigenado. El estado oxidativo de esta cadena de 3 carbonos, determinan las diferentes clases de flavonoides.

Los flavonoides incluyen antocianinas (glucósidos ó acilglucósidos de las antocianidinas), flavanoles (catequinas), flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavonoles y sus derivados.

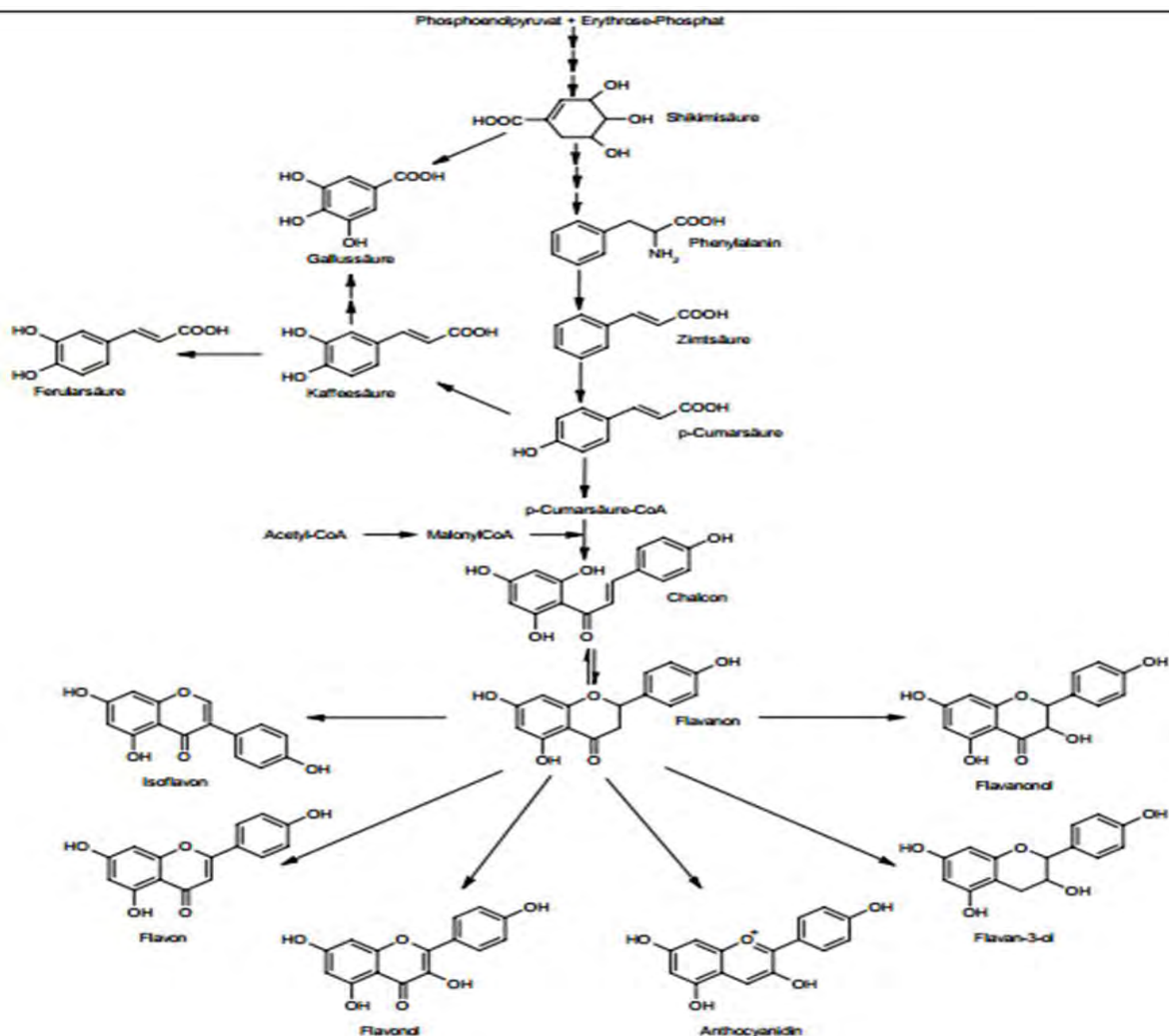


Ilustración 14. Biosíntesis de Polifenoles (Macheix, 1994).



### 1.3 Electroforesis capilar

Electroforesis Capilar es una técnica relativamente nueva, la cual se basa en el movimiento de especies cargadas en un sistema por acción de un campo eléctrico en un medio conductor líquido usualmente acuoso (Heiger, N., 1997).

#### 1.3.1 Instrumentación

Un sistema de electroforesis capilar (ilustración 15), se compone básicamente de los siguientes elementos (Castillo, 2002).

1. Viales de entrada y salida: En ellos se introducen los extremos del capilar para que este se llene del electrolito soporte, así como los electrodos.
2. Sistema de inyección: el extremo del capilar se coloca momentáneamente en un pequeño recipiente que contiene la muestra para que esta penetre el capilar.
3. Capilar: Es de sílice fundida, está recubierto en el exterior de poliamida, la cual lo hace flexible y tiene la función de puente de contacto entre el cátodo y el ánodo cerrando el circuito eléctrico.
4. Un par de electrodos de platino: Están conectados a la fuente de poder que proporciona la energía para que se de la separación.
5. Fuente de poder: Aplica la diferencia de potencial seleccionada entre los 2 electrodos para la separación (voltajes de 0 a 30 kV, autoreversible).
6. Sistema de detección: Una vez que los componentes de la muestra fueron separados por electroforesis, permite detectar su señal y cuantificarlos. Se clasifican en:
  - Ópticos: Absorción UV-Visible, fluorescencia, quimioluminiscencia, índice de refracción, etc.
  - Electroquímicos: Conductimetría, potenciometría y amperometría.
  - Otros: Espectrometría de masas y radiométricos.
7. Sistema de refrigeración: Disipa el exceso de calor producido en el capilar.



8. Sistema de registro de datos.- Presenta los datos obtenidos del análisis (electroferograma).

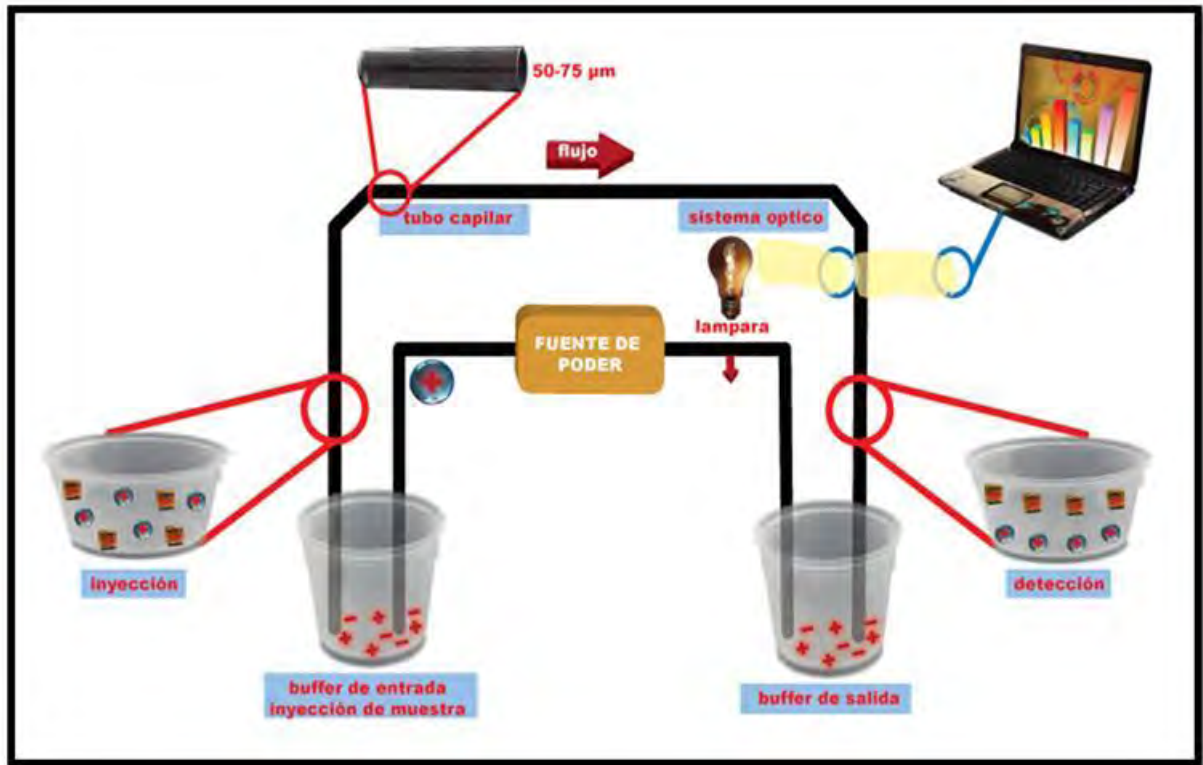


Ilustración 15. Esquema representativo de las partes básicas de un sistema de electroforesis capilar (González, 2011)

### 1.3.2 Proceso electroforético

Es el fenómeno que se lleva a cabo cuando en un sistema dado, las especies cargadas (iones) se mueven y separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración (Castillo, 2002).

En términos prácticos el proceso electroforético se lleva a cabo llenando el capilar con un amortiguador (buffer) llamado electrolito soporte o buffer de corrida, los cuales son sumergidos en contenedores llenos con el mismo buffer. En estos contenedores se encuentran electrodos conectados a una fuente de poder. Si la muestra se coloca y un campo eléctrico es aplicado, los iones en la muestra migrarán a través del capilar a diferentes velocidades. La velocidad de migración depende del tamaño de los iones y su carga (Heiger, 1997).





Los cationes cargados positivamente migrarán hacia el electrodo cargado negativamente, el cátodo y los aniones cargados negativamente migrarán hacia el electrodo cargado positivamente, el ánodo. Un ión pequeño migrará más rápido que uno más grande de la misma carga. Un ión con una carga alta migrará más rápido que uno de menor carga, si los iones son del mismo tamaño (ilustración 16). De este modo, un ión divalente migrará con mayor rapidez que un ión monovalente del mismo tamaño. (Heiger, 1997).

Bajo la influencia de un campo eléctrico, el buffer y las moléculas neutras migrarán debido a la electroósmosis. El flujo electroosmótico del buffer se mueve en dirección al electrodo negativo y acarrea los solutos presentes. Los cationes se mueven a una velocidad superior a la del flujo electroosmótico, mientras que las moléculas neutras a la misma velocidad, y los aniones lo hacen lentamente, de tal manera que el orden en que las moléculas alcanzan el electrodo negativo en este ejemplo es: cationes, moléculas neutras y aniones. Las moléculas neutras se desplazan en el capilar a la misma velocidad y no son separadas. Las moléculas neutras pueden separarse usando un tipo de electroforesis capilar conocida como Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética, en la cual se adiciona un surfactante al buffer de corrida (Heiger, 1997).

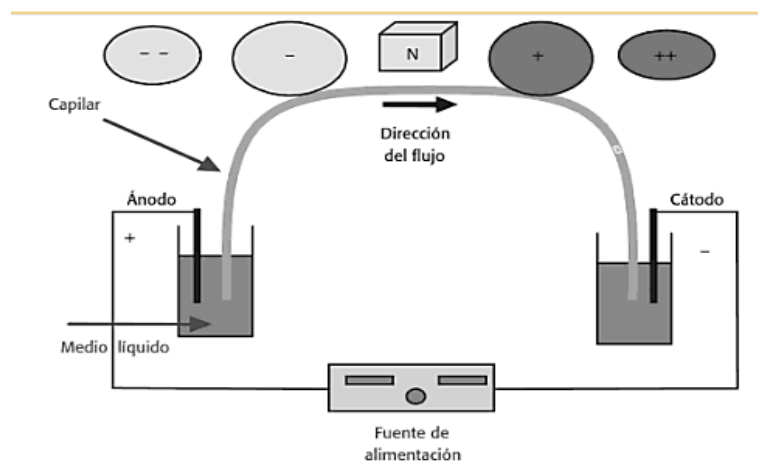


Ilustración 16. Representación esquemática de una separación por electroforesis capilar (Harris, 2012).

Las moléculas separadas se pueden analizar colocando algún tipo de detector en líneas, quitando un poco de recubrimiento del capilar o al final del tubo. La salida del detector es una gráfica de la respuesta del detector contra el tiempo, llamada electroferograma (Heiger, 1997).



Las mezclas de los compuestos químicos se pueden separar por electroforesis capilar en base a su relación carga-tamaño (Heiger, 1997).

### 1.3.3 Principios de la separación electroforética

#### 1.3.3.1 Movilidad electroforética

La movilidad o migración electroforética ( $\mu_e$ ) de iones y partículas cargadas se consigue debido al efecto de las fuerzas eléctricas generadas a lo largo de un gradiente de campo eléctrico, y juega un papel muy importante en el proceso de separación que tiene lugar en EC. Las moléculas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico adquiere una fuerza electrostática ( $F_e$ ) que es proporcional a la fuerza del campo eléctrico ( $E$ ) y a su carga ( $q$ ) según la Ecuación 1.

$$F_e = (q) E \dots \dots \dots (\text{ecuación 1})$$

Esta fuerza acelera los iones hacia el electrodo de carga opuesta, sin embargo en un medio viscoso la fuerza de fricción ( $F_f$ ) contrarresta la movilidad de los iones. De acuerdo con la ley de Stokes para partículas esféricas la  $F_f$  se expresa de acuerdo a la ecuación:

$$F_f = 6 \pi \eta r v \dots \dots \dots (\text{ecuación 2})$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad del líquido,  $r$  es el radio de la partícula y  $v$  es la velocidad de migración.

La velocidad de un ion puede expresarse también en función de la movilidad electroforética ( $\mu_e$ ) y la fuerza del campo eléctrico mediante la ecuación 3. Combinando las ecuaciones 1 y 2 y sustituyendo en la ecuación 3 podemos expresar  $\mu_e$  mediante la ecuación 4

$$v = \mu_e E \dots \dots \dots (\text{ecuación 3})$$

$$\mu_e = v / E = q / 6\pi\eta r \dots \dots \dots (\text{ecuación 4})$$

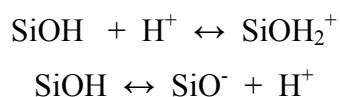
Por tanto  $\mu_e$  es una magnitud física fácil de calcular para un ion en unas condiciones determinadas.



### 1.3.3.2 Flujo electroosmótico.

El flujo electroosmótico (FEO) puede describirse como el movimiento de un líquido con respecto a una superficie cargada bajo la acción de un campo eléctrico. El FEO se puede explicar mediante la teoría de la doble capa, según la cual, en la interfase entre un sólido y un líquido se puede formar una doble capa de iones debido a dos fenómenos distintos: adsorción específica de iones de la disolución sobre la superficie sólida y la superficie sólida, que por su naturaleza se ioniza al estar en contacto con la disolución.

En EC los capilares más utilizados son de sílice fundida y presentan grupos silanol (Si-OH) en su superficie que pueden ser ionizados en función del pH del tampón, formando grupos cargados positiva (Si-OH<sub>2</sub><sup>+</sup>) o negativamente (Si-O<sup>-</sup>) según la siguiente reacción.



Se ha observado que a pH superior a 3 la superficie del capilar está cargada negativamente, de tal manera que su cara interna, según la teoría de la doble capa se forma una primera capa fina e inmóvil de cationes de la disolución (capa fija) que neutralizan parcialmente su carga, y una segunda capa compuesta mayoritariamente por cationes (capa difusa) mientras que en el centro del capilar encontramos iones de los dos signos a partes iguales (Ilustración 17). De esta manera cuando se aplica el campo eléctrico, los cationes de la capa fija no se mueven, mientras que los iones de la capa difusa y del seno de la disolución se mueven hacia el extremo de carga opuesta. Debido al exceso de cationes existentes en la capa difusa, se establece un flujo neto de la disolución hacia el cátodo. Este efecto se llama electroósmosis y crea un FEO, casi uniforme (excepto en la capa fija) de toda disolución hasta el cátodo.

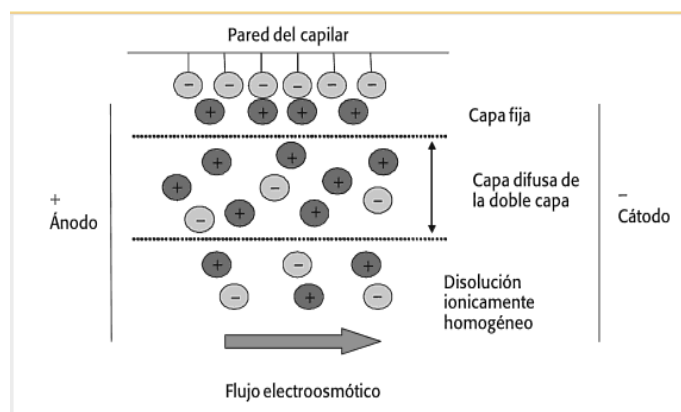


Ilustración 17. Formación de la doble capa eléctrica (Harris, 2012).

Manejando la fuerza de flujo uniformemente distribuida a lo largo del capilar no hay presión dentro del capilar y el flujo es uniforme. El perfil plano del flujo es benéfico porque no contribuye directamente a la dispersión de zonas del analito. Es importante señalar que el FEO puede modificar la migración de los iones, ya que los cationes son impulsados por éste a una mayor velocidad. Si por otra parte la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye. (Castillo, 2002).

### 1.3.4 Factores de los que depende la velocidad de migración del analito.

#### 1.3.4.1 La muestra

La forma en la cual un componente con carga eléctrica ve afectada su velocidad de migración puede deberse a los siguientes factores. (Castillo, 2002)

- ✓ Carga.-La velocidad de migración aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente, la magnitud de la carga depende del pH.
- ✓ Tamaño.-La velocidad de migración es menor en las moléculas grandes, debido al incremento de las fuerzas de fricción y electrostáticas ejercidas por el medio circundante
- ✓ Forma.-Las moléculas de tamaño similar, pero con diferente conformación, tales como las proteínas fibrosas y las globulares, exhiben distintas características de migración o causa de los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas



### 1.3.4.2 Electrolito soporte (Buffer o sistema amortiguador)

Durante una electroforesis, se produce una electrólisis del agua por acción del campo eléctrico, lo cual genera protones en la proximidad del ánodo e iones hidroxilo en el cátodo. El buffer es, por esta razón, esencial durante la electroforesis para evitar que el ánodo se acidifique y el cátodo se haga más básico, pero no debe afectar a las moléculas a separar.

Además, la fuerza iónica condiciona la movilidad electroforética de las sustancias a separar, ya que influye en su esfera de solvatación y en la conductividad de todo el sistema, por lo tanto, es necesaria una fuerza iónica suficiente para mantener el pH y la conductividad durante todo el proceso, pero no muy elevada, ya que llegaría a interferir en el sistema.

Normalmente, se emplean buffer con fuerzas iónicas moderadas (0.05-0.10M), siendo el pH la característica que debe ser más controlada, puesto que determina la carga de la muestra.

Conviene señalar también que atendiendo a la distribución del buffer, los sistemas se clasifican en continuos cuando se emplea un único buffer en el proceso y discontinuos cuando se emplean, al menos, dos buffer de pH y composición diferentes (Morales, 2006)

### 1.3.4.3 El campo eléctrico

Es un gradiente de potencial que posibilita que haya electroforesis. A su vez, depende de diferentes parámetros:

- Diferencia de potencial (V). Se mide en voltios y es lo que define el campo eléctrico. Cuanto mayor sea, mayor será la velocidad de migración. Las electroforesis se consideran de bajo voltaje si se realizan entre 10-500 voltios (la mayoría) y de alto voltaje si se realizan entre 500-10,000 voltios.

- Intensidad (I). Se mide en amperios y cuantifica el flujo de carga eléctrica. Esta relacionada con la diferencia de potencial por la Ley de Ohm:

$$V=IR.....(\text{ecuación 5})$$



Y para una diferencia de potencial dada, su valor (normalmente entre 5-50mA) viene determinado por la resistencia del soporte, por lo que, en última instancia, da cuenta de la distancia recorrida por las moléculas.

- Resistencia (R). Se mide en ohmios y cuanto mayor sea la resistencia del soporte, menor será la movilidad electroforética (ya que la intensidad ha de ser menor para que se cumpla la Ley de Ohm). Depende de la naturaleza del soporte, sus dimensiones (anchura, longitud y sección) y de la concentración del buffer de electroforesis.

- Temperatura. Por el efecto Joule, el paso de una corriente eléctrica produce calor, y este efecto será incrementara cuanto mayor sea la diferencia de potencial y la resistencia del sistema. Debe controlarse de forma estricta, puesto que puede afectar a la muestra (desnaturalizándola), al soporte e incluso al equipo electroforético. Todo esto justifica, por sí solo, la necesidad de un sistema de refrigeración en las cubetas de electroforesis (Morales, 2008).

#### **1.4 Extracción Soxhlet.**

La extracción es una de las operaciones básicas del laboratorio. Se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible. Se pueden realizar desde los tres estados de la materia, y se llaman de la siguiente manera: 1) extracción sólido-líquido; 2) extracción líquido-líquido y 3) extracción gas-líquido. La extracción sólido-líquido es la técnica utilizada en esta investigación, se usa a menudo para extraer un producto natural a partir de su fuente natural, tal como una planta. Se escoge un disolvente que selectivamente disuelva el compuesto deseado para que deje los sólidos insolubles indeseados en la fuente natural. El aparato usado para extracción continua sólido-líquido se llama extractor soxhlet mostrado en la ilustración 18, se usa muy comúnmente en un laboratorio de investigación de productos naturales.

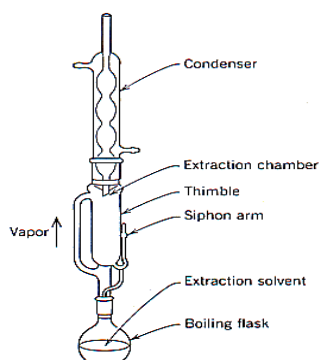


Ilustración 18. Extractor soxhlet (Nuñez, 2008)

La extracción soxhlet consta de las siguientes etapas: 1) colocación del disolvente en un matraz de bola. La tabla 4 muestra los diferentes disolventes que se pueden utilizar en la extracción soxhlet, así como puntos de ebullición correspondientes. 2) ebullición del disolvente que se evapora hasta un condensador a reflujo. 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior. 4) ascenso del nivel del disolvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el disolvente con el material extraído al matraz bola. 5) se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el matraz bola del disolvente (Núñez, 2008).

Tabla 4. Punto de ebullición de solventes

Disolvente	°C	Disolvente	°C
Éter	35	Etanol	78
Diclorometano	40	Benceno	80
Diclorometano	40	Ciclohexano	81
Éter de petróleo	35-50	Ácido fórmico	101
Cloroformo	62	Dioxano	102
Metanol	65	Tolueno	111
Etanol-benceno	65	Etanol	78
Hexano	69	Benceno	80
Etanol tolueno	73	Etanol	78
Acetato de etilo	77		



## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Optimizar un método analítico para la caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en la semilla de chía y en el aceite extraído de la misma, mediante el uso de la técnica de electroforesis capilar. Lo anterior, con la finalidad de contribuir al conocimiento de los componentes benéficos contenidos en la misma e indirectamente fomentar su consumo.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Realizar la extracción del aceite de chía y la obtención de la harina desengrasada de la misma.
- ✓ Desarrollar una metodología para la caracterización y la cuantificación de compuestos fenólicos mediante electroforesis capilar.
- ✓ Evaluar algunos parámetros de validación del método desarrollado para documentar su confiabilidad.
- ✓ Aplicar la metodología desarrollada a la caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en la semilla (harina desengrasada) y aceite de chía.





### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

#### 3.1 Equipo, material y muestras.

##### 3.1.1 Equipo.

- Equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ, con detector de arreglo de diodos y software Karat 3.2, Beckman Coulter (Fullerton, CA., USA), ver ilustración 19.
- Centrifuga Allegra™ 21 centrifuge, Beckman Coulter (Fullerton, CA., USA)
- Evaporador Turbo Vap LV, Caliper Life Science (Hopkinton, MA., USA);
- Potenciómetro, Hanna Instruments (Padua, Italia); Balanza analítica, Boeco, (Alemania); Sonicador Transsonic 570, Elma (USA); Desionizador Milli – Q (Millipore, MA., USA); Parrilla eléctrica con agitador magnético, Cimarec 2, Thermolyne (USA).
- Rotavapor (LQM)

La ilustración 19 muestra el equipo de electroforesis capilar con detector de arreglo de diodos usado durante las mediciones en esta tesis.



Ilustración 19. Equipo de Electroforesis Capilar utilizado en este estudio (González, 2011).

##### 3.1.2 Materiales.

Los materiales utilizados durante la experimentación fueron los siguientes:

- Matraces volumétricos: 1, 2, 5, 10, 20, 25 y 100 mL
- Pipetas volumétricas: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 20 mL
- Micropipetas: 10-100  $\mu$ L y 200-1000  $\mu$ L
- Agua desionizada
- Frascos viales
- Propipetas.



- Manta calefactora
- Equipo Soxhlet
- Refrigerante
- Soporte universal

### 3.1.3 Muestras Analizadas.

Se utilizaron 4 tipos de semillas de chía provenientes de dos estados de la república mexicana, de acuerdo a la tabla 4. Los códigos fueron asignados arbitrariamente.

Tabla 5. Codificación de las muestras de semilla de chía a estudiar

LOCALIDAD	CÓDIGO DE ORIGEN	CÓDIGO DE MUESTRA
Puebla	Semilla de chía 094	chía aceite 094 <sup>a</sup>
		chía desengrasada 094H
	Semilla de chía 125	chía aceite 125 <sup>a</sup>
		chía desengrasada 125H
Colima	Semilla de chía 287	chía aceite 287 <sup>a</sup>
		chía desengrasada 287H
	Semilla de chía 301	chía aceite 301 <sup>a</sup>
		chía desengrasada 301H

Estas muestras fueron separadas en aceite y harina, por lo que en total en esta tesis se estudiaron los polifenoles presentes en 4 tipos de harina de chía y 4 tipos de aceite de chía,

## 3.2 Extracción de aceite y compuestos fenólicos en la semilla de chía.

### 3.2.1 Extracción del aceite de chía (García *et al.* 2003).

Se procesaron 10 g de cada muestra de semilla de chía mediante equipo Soxhlet, empleando como disolvente n-hexano durante un tiempo de 6 horas. Los parámetros de extracción fueron: temperatura  $48 \pm 2$  °C y flujo de disolvente de 30 gotas por minuto. La mezcla hexano-aceite se destiló a presión reducida en un evaporador rotatorio a 45 °C, para obtener el aceite crudo, este se envasó en frascos de vidrio ámbar con rosca y se almacenó a 0° C bajo atmosfera de nitrógeno hasta su posterior evaluación.



### **3.2.2 Extracción de compuestos fenólicos de la semilla de chía con etanol (Reyes, 2007).**

Una masa de 5 g de harina de chía desengrasada se maceró con 50 mL de etanol a temperatura ambiente durante 48 h bajo agitación mecánica. La mezcla se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min. Se concentró a 40 ° C en un evaporador. El residuo seco se redisolvió con 7.5 mL de etanol.

### **3.2.3 Extracción de compuestos fenólicos presentes en el aceite (Carrasco Pancorbo et al. 2006).**

Una muestra de aceite (1 g) se disolvió en 1 mL de hexano esta mezcla se cargo a través de un cartucho DIOL pre-acondicionado a un flujo aproximado de 1 mL/min. Posteriormente se hizo pasar 3 porciones de 5 mL cada una de hexano para eluir la fracción no polar del aceite, finalmente se eluyó la fracción polar (polifenoles) haciendo pasar sobre el cartucho 4 porciones de 5 mL cada una de metanol y posteriormente se llevó a sequedad esta fracción en un evaporador a 45°C con flujo de nitrógeno y el residuo seco se redisolvió en 1 mL de metanol.

El cartucho (columna) se activó con 6 mL de n-hexano, 6 mL de metanol-agua 20:80 (v/v) y 3 mL de acetonitrilo, con un flujo aproximado de 2 mL/min.

### **3.3 Análisis de compuestos fenólicos mediante electroforesis capilar. (González, 2011).**

Se partió del método reportado para la caracterización de compuestos fenólicos, bajo las siguientes condiciones iniciales.

- Concentración de Buffer: 50 mM de boratos (a partir de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )
- pH: 9.4 (ajustado con NaOH 0.1N)
- Voltaje: 28 kV.
- Inyección de muestra: 0.5 psi durante 5 s.
- Temperatura de análisis: 22 °C.
- Longitud total de capilar: 51.9 cm.
- Longitud efectiva: 41.7 cm
- Diámetro interno: 50  $\mu\text{m}$ .
- Longitud de onda de detección: 200 nm.



### 3.3.1 Acondicionamiento y lavado del capilar.

Una vez que se montó el capilar en el cartucho éste se acondicionó al inicio de cada día, siguiendo el procedimiento de la Tabla 7, teniendo como objetivo, la activación de los grupos silanol, así como equilibrar las paredes del capilar con el buffer para la reproducibilidad de nuestros experimentos. Por otro lado, se realizó el lavado del capilar entre corridas con el buffer de boratos 50 mM, pH 9.4, por 15 min, a 30 psi y 25 °C, antes de la inyección y separación, como lo especifica la Tabla 8.

**Tabla 6. Activación de los grupos silanol.**

Solución	Tiempo	Presión	Temperatura
H <sub>2</sub> O desionizada	10 min.	30 psi	25 °C
NaOH (0.1 N)	10 min.	30 psi	25°C
H <sub>2</sub> O desionizada	3 min.	30 psi	25 °C
Buffer	20 min.	30 psi	25°C

**Tabla 7. Procedimiento de lavado del capilar al inicio de cada sesión**

Solución	Tiempo	Presión	Temperatura
H <sub>2</sub> O desionizada	10 min.	30 psi	25 °C
NaOH (0.1 N)	10 min.	30 psi	25°C
H <sub>2</sub> O desionizada	2 min.	30 psi	25 °C
Buffer	10 min.	30 psi	25°C

**Tabla 8. Instrucciones del Método de separación de los polifenoles en el equipo P/ACE MDQ de Electroforesis Capilar**

Evento	Tiempo	Presión	Condiciones
Enjuague entre muestras buffer	15 min	30 psi	25°C
Inyección de muestra	5 seg.	0.5 psi	22°C
Corrida	30 min	28 psi	28 kV, 22°C, detección 200 nm

### 3.4 Preparación de soluciones estándar (vainillina, ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, kaempferol, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillínico, quercetina, ácido cafeíco y ácido gálico a 1000 mg/L.

Se pesó 0.0010 g de cada uno de los estándares y se aforaron a 1 mL con etanol al 80% a excepción de la miricetina quercetina y kaempferol que fueron disueltos en dimetilsulfoxido al 10% en etanol.



### **3.5 Inyección de la mezcla de estándares.**

Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares en un vial, se mezclaron e inyectaron por triplicado bajo las siguientes condiciones: 0.5 segundos a una presión de 0.5 psi de muestra al equipo de electroforesis capilar.

### **3.6 Identificación de los compuestos fenólicos presentes en las diferentes variedades de chía (harina y aceite).**

En esta parte se utilizaron tres variedades de semillas chía provenientes de los estados de Puebla (094,125, 287) y una del estado de Colima (301), así como el aceite extraído de las mismas. Cada una de las muestra se inyectó por triplicado a las mismas condiciones que los estándares.

#### **3.6.1 Identificación cualitativa.**

Para identificar los compuestos fenólicos presentes en las muestras de chía (harina y aceite), se procedió a realizar la comparación de los tiempos de migración de cada uno de los estándares con los tiempos de migración obtenidos con los electroferogramas de las muestras. La identificación se sustenta en la comparación del espectro de absorción del pico obtenido, con el espectro de absorción de su estándar puro. Otro aspecto importante en la identificación cualitativa de los compuestos fenólicos fue la forma del pico en el electroferograma por ejemplo en el caso del ácido cafeico y el ácido gálico sus picos son muy característicos siendo estos bajos y anchos.

#### **3.6.2 Fortificación.**

Una vez identificadas cualitativamente se procedió a caracterizar mediante fortificación cada uno de los compuestos que se creían tener en cada una de las muestras. Se realizó preparando una solución para cada compuesto (vainillina, ácido trans-cinámico, ácido clorogénico ácido ferúlico, kaempferol, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillinico, quercetina, ácido cafeico y ácido gálico a 1000 ppm), para lo cual se tomaron cada una de las muestras de semilla de chía (harina y aceite) para fortificar. Se adicionaron a la muestra 10  $\mu\text{L}$  del estándar que se tenía tener a la muestra problema y si el pico característico aumentaba en la nueva medición, confirmaba su presencia inequívoca.



### 3.7 Selección de los estándares internos (E.I.).

Una vez realizada la fortificación de las diferentes semillas de chía (harina y aceite) con los estándares, el siguiente paso es seleccionar los estándares internos, para realizar la cuantificación de los principales compuestos fenólicos en los diferentes variedades de semilla de chía (harina y aceite).

Los estándares internos a elegir deben cumplir con las siguientes características:

- La señal del E.I. no debe traslaparse con los demás analitos de interés,
- No debe encontrarse como constituyente de la muestra que se va analizar
- Y debe tener una concentración similar a las señales de interés.

Considerando la matriz tan compleja en la muestra y debido a los cambios que esta provoca en la viscosidad de la muestra, los tiempos de migración se vieron afectados retrasando la aparición de los picos de los compuestos, factor que pudimos eliminar con la adición del estándar interno seleccionado que fue el ácido gentísico con una concentración de 45.45ppm

### 3.8 Preparación de las Curvas de calibración.

La Tabla 9 indica el intervalo de concentración corregidas para las curvas de calibración de ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillinico, quercetina, ácido cafeico, ácido gálico y la concentración constante de ácido gentísico que se seleccionó como estándar interno con una concentración de 45.45 ppm (E.I.).

**Tabla 9. Concentraciones en la curva de calibración**

<b>Compuesto fenólico</b>	<b>Intervalo de concentración (ppm)</b>
ácido trans-cinámico (altura)	10-200
ácido clorogénico (área)	10-200
ácido ferúlico (área)	4.0-48
miricetina(altura)	3.75-45
ácido cumárico(área)	2.0-28
ácido vainillinico (altura)	2.0-24
quercetina (altura)	2.75-33
ácido cafeico (altura)	2.75-33
ácido gálico (área)	2.75-33
ácido gentísico (E.I.)	44.541



### **3.8.1 Procedimiento y cálculos para la preparación de las curvas de calibración de los polifenoles**

**Reactivos:** Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico HPLC

**Preparación del estándar interno ácido gentísico 1487.7 ppm para las curvas de calibración de ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillinico, quercetina, ácido cafeíco y ácido gálico**

Se pesaron 0.0303 g de ácido gentísico R.A (98% pureza) y se aforaron en 20 mL con etanol al 80%. Esto da un stock de 1487.7 ppm del E.I.

#### **Preparación de solución estándar de ácido trans-cinámico 805 ppm**

Se pesaron 0.0161 g de ácido trans-cinámico R.A. y se aforaron a 20 mL con etanol al 80%.

#### **Preparación de solución estándar de ácido clorogénico 2004 ppm**

- Se pesaron 0.0501 g de ácido clorogénico R.A. y se aforaron a 25 mL con etanol al 80%.

#### **Preparación de solución estándar de ácido ferúlico 805 ppm**

- Se pesaron 0.0161 g de ácido ferúlico R.A. y se aforaron a 20 mL con etanol al 80%.

#### **Preparación de solución estándar de miricetina 800 ppm**

- Se pesaron 0.0160 g de miricetina R.A. y se aforaron a 20 mL con etanol al 80%.

#### **Preparación de solución estándar de ácido cumárico 405 ppm**

- Se pesaron 0.0081 g de ácido cumárico R.A. y se aforaron a 20 mL con etanol al 80%.

#### **Preparación de solución estándar de ácido vainillinico 405 ppm**

- Se pesaron 0.0081 g de ácido vainillinico R.A. y se aforaron a 20 mL con etanol al 80%.

#### **Preparación de solución estándar de quercetina 555 ppm**

- Se pesaron 0.0111 g de quercetina R.A. y se aforaron a 20 mL con etanol al 80%.

#### **Preparación de solución estándar de ácido cafeíco 700 ppm**

- Se pesaron 0.0140 g de ácido cafeíco R.A. y se aforaron a 20 mL con etanol al 80%.



### Preparación de solución estándar de ácido gálico 700 ppm

- Se pesaron 0.0140 g de **ácido gálico** R.A. y se aforaron a 20 mL con etanol al 80%.

#### 3.8.2 Preparación de las curvas de calibración.

Con las soluciones estándares que se prepararon para cada compuesto se procedió a realizar las curvas de calibración, que se muestran en la Tabla 10.

1. Se colocaron los mililitros correspondientes de cada estándar de acuerdo al sistema a preparar (ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillínico, quercetina, ácido cafeíco, ácido gálico) en un matraz volumétrico de 100 mL.

2. Se adicionaron 3 mL de ácido gentísico (estándar interno), se aforaron con etanol al 80%. De esta solución se lleno un vial donde se tomó la muestra para llevar a cabo la inyección a una presión de 0.5 psi durante 5 segundos por triplicado. Concentración de ácido gentísico 45.54 ppm

**Tabla 10. Preparación de los sistemas para las curvas de calibración de los estándares**

Nombre del estándar	SISTEMA					
	1	2	3	4	5	6
ácido trans-cinámico (mL)	0.5	1	2	3	4	6
ácido clorogénico (mL)	0.5	1	2	3	5	10
ácido ferúlico (mL)	0.5	1	2	3	4	6
miricetina (mL)	0.5	1	2	3	4	6
ácido cumárico (mL)	0.5	1	2	3	4	7
ácido vainillínico (mL)	0.5	1	2	3	4	6
Quercetina (mL)	0.5	1	2	3	4	6
ácido cafeíco (mL)	0.5	1	2	3	5	10
ácido gálico (mL)	0.5	1	2	3	4	5
ácido gentísico (mL)	3	3	3	3	3	3
Volumen <sub>aforo</sub> EtOH al 80% (mL)	100	100	100	100	100	100

#### 3.8.3 Procesamiento de datos para realizar las curvas de calibración.

Las curvas de calibración de cada analito se realizaron bajo el siguiente procedimiento:

- Se ubicaron en los electroferogramas los picos de cada estándar y del estándar interno a través de sus tiempos de retención y se registraron sus áreas  $\text{área}_{\text{estándar}}$  y  $\text{área}_{\text{E.I.}}$ , así como alturas  $\text{altura}_{\text{estándar}}$  y  $\text{altura}_{\text{E.I.}}$  respectivamente.





2. Se obtuvieron los cocientes de áreas ( $\text{área}_{\text{estándar}}/\text{área}_{\text{E.1}}$ ) y alturas ( $\text{altura}_{\text{estándar}}/\text{altura}_{\text{E.1}}$ ) para cada fenol, así como el promedio de las mismas.
3. Se graficaron el cociente de áreas, ( $\text{área}_{\text{estándar}}/\text{área}_{\text{E.1}}$ ) y altura ( $\text{altura}_{\text{estándar}}/\text{altura}_{\text{E.1}}$ ), en función de la concentración del compuesto fenol.
4. Se obtuvo la ecuación del modelo lineal y su coeficiente de determinación para cada caso.

### **3.9 Cuantificación de compuestos fenólicos en las muestras de semilla de chía (harina y aceite).**

Se obtuvo el cociente de áreas y alturas en la muestra problema correspondiente, el cual se interpoló en la ecuación con modelo lineal obtenida de la curva de calibración de cada estándar, despejando de ésta, la concentración desconocida de cada compuesto fenólico de la muestra, considerando las diluciones para que posteriormente encontrar la concentración inicial de cada uno de ellos en el aceite o la harina desengrasada.



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un trabajo previo se estudiaron algunas condiciones del método analítico para la separación de polifenoles como: la concentración y pH del buffer, voltaje, inyección, temperatura y longitud total del capilar. Las condiciones propuestas por González, (2011) se pueden ver en la tabla 11:

**Tabla 11. Condiciones iniciales reportadas en el trabajo previo de Gonzalez (2011).**

<b>Concentración de Buffer</b>	<b>50 mM de boratos (a partir de <math>\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}</math>)</b>
<b>Ph</b>	9.4 (ajustado con NaOH 0. 1N)
<b>Voltaje</b>	28 Kv
<b>Inyección de muestra</b>	0.5 psi durante 5 s
<b>Temperatura de análisis</b>	22°C
<b>Longitud total de capilar</b>	51.9 cm
<b>Longitud efectiva</b>	41.7 cm
<b>Diámetro interno</b>	50 $\mu\text{m}$
<b>Longitud de onda</b>	200 nm

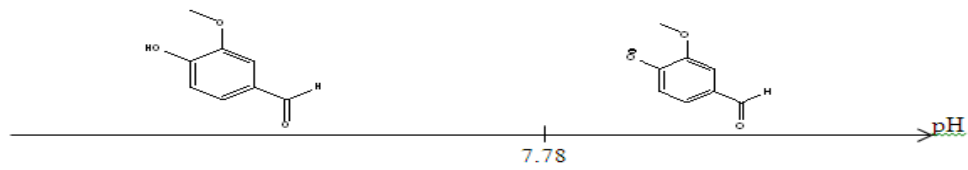
Cabe destacar que el pH de corrida del buffer es un parámetro importante a considerar. Al elegir el pH del buffer se definen las cargas netas de los componentes de las muestras y por lo tanto la magnitud y dirección de sus movilidades dentro del capilar, bajo la influencia del flujo electroosmótico presente.

Las especies químicas presentes se describen en los siguientes diagramas de zonas de predominio en función del pH del buffer, donde podemos observar las cargas de los componentes a diferentes valores de pH.

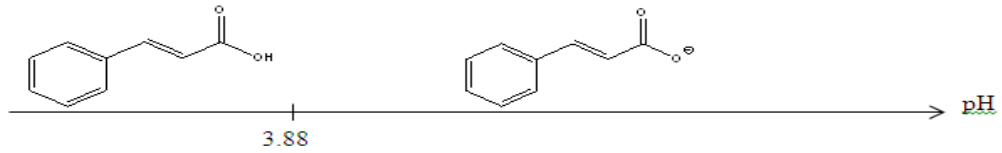
En la ilustración 20 podemos observar que los analitos a valores de pH de 9.4 ya se encuentran en su forma ionizada, en este caso en su forma aniónica, donde el flujo electroosmótico (que es muy alto a pH 9.4), es el responsable de que cualquier especie, independientemente de su carga, se mueva hacia al cátodo (Watson, 2005) pasando antes por el detector.



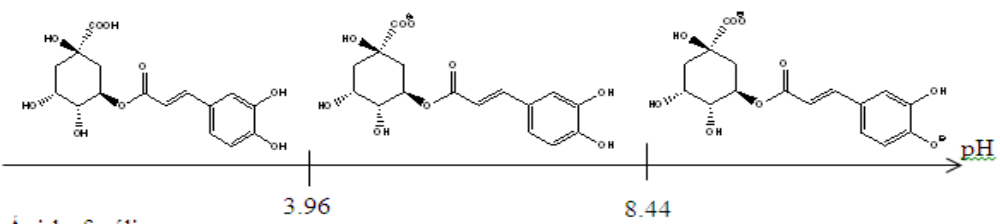
Vainillina



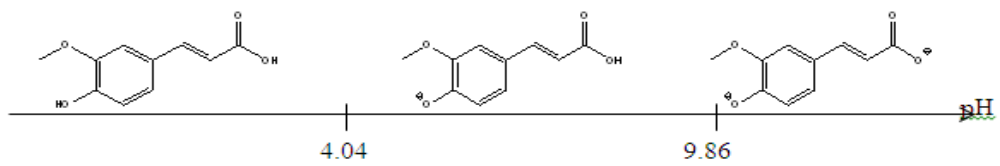
Ácido trans-cinámico



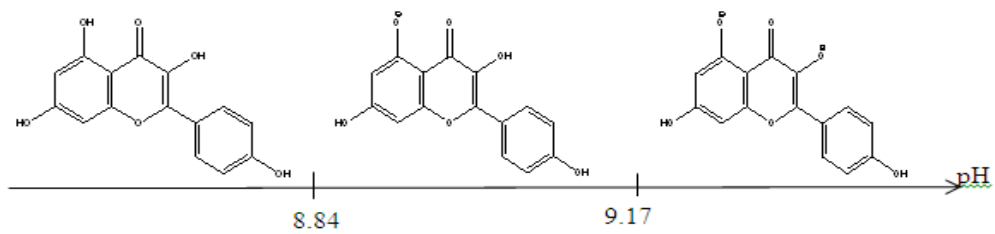
Ácido clorogénico



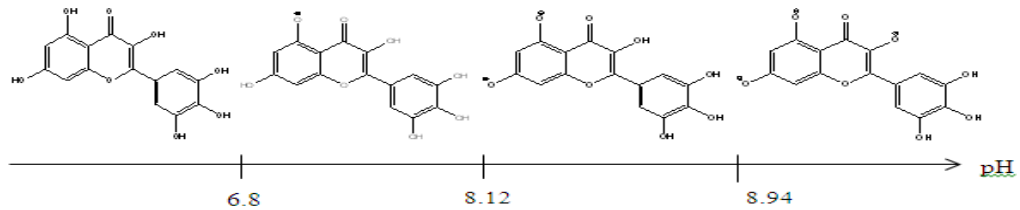
Ácido ferúlico



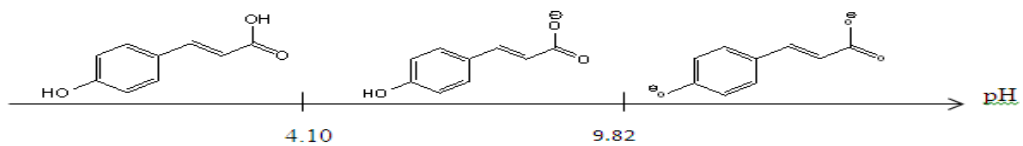
Kaempferol



Miricetina



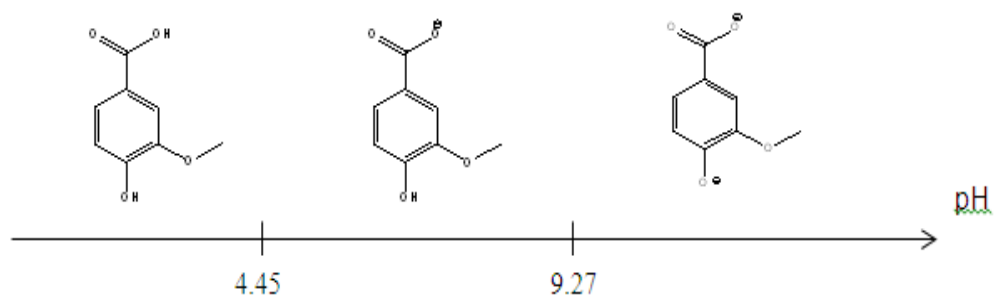
Ácido p-cumárico



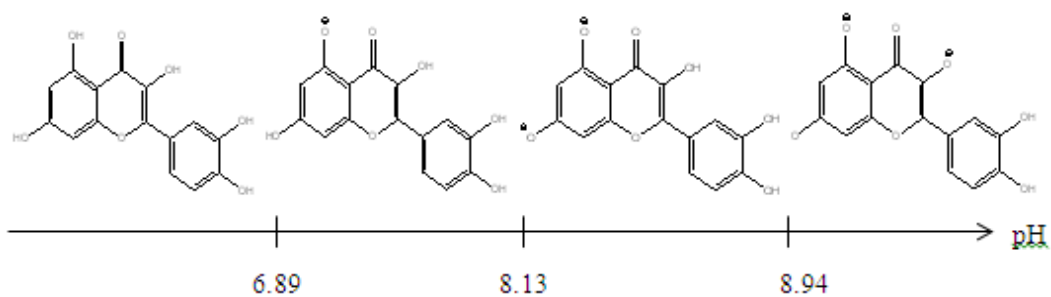


Continuación

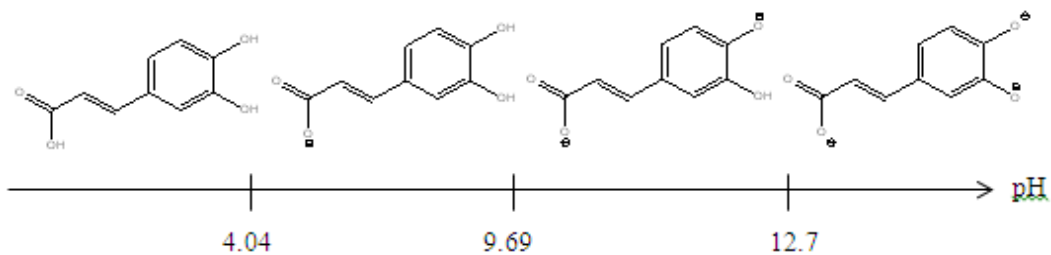
Ácido vainillínico.



Quercetina



Ácido cafeico



Ácido gálico

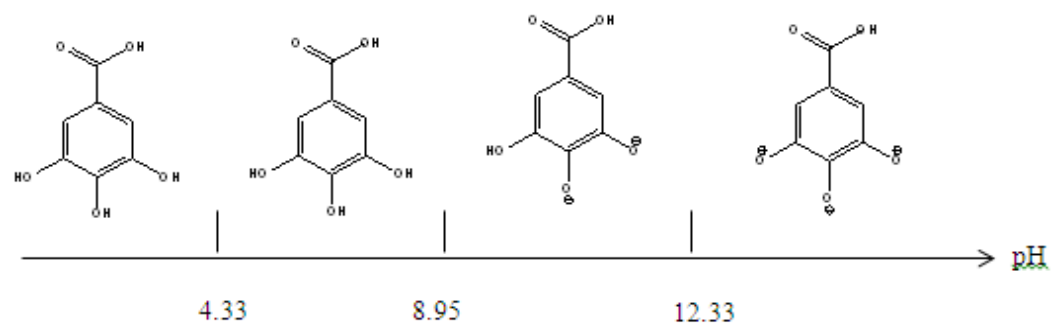


Ilustración 20. Diagrama lineal de zonas de predominio para vainillina, ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, kaempferol, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillínico, quercetina, ácido cafeico, ácido gálico en función del pH.



Primero se trabajó con las condiciones propuestas en el trabajo de González-Jiménez, (2011), La ilustración 21 muestra el electroferograma de la mezcla de estándares bajo estas condiciones. En él podemos observar un traslape de los picos 6, 7 y 8 por tal motivo fue necesario modificar algunas condiciones del método inicial reportado.

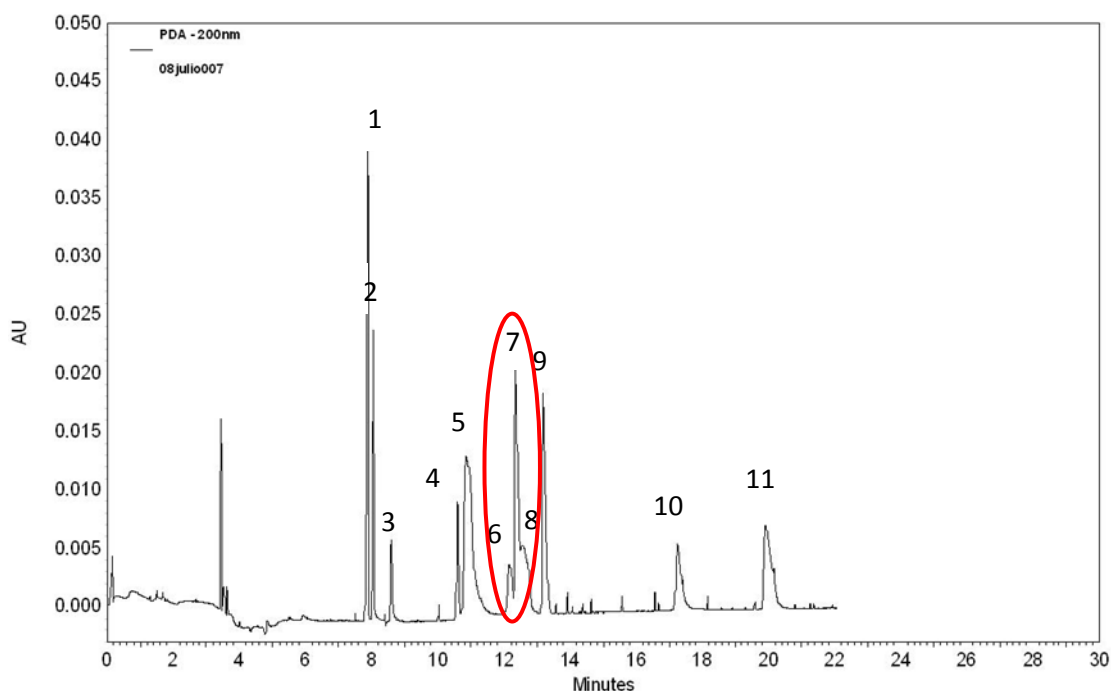


Ilustración 21 Electroferograma de la mezcla de 11 estándares..

**Condiciones:** Capilar de sílice fundida de 51.9 cm de longitud total, D.I. 50  $\mu\text{m}$ , buffer 50 mM, pH 9.4 inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 28 kv, polaridad normal del capilar, 22°C.

#### 4.1 Optimización de las condiciones electroforéticas para separar los compuestos fenólicos presentes en el aceite y semilla de chía.

Para mejorar la resolución de los estándares de polifenoles, se decidió aumentar la concentración del buffer de boratos a 60 mM, manteniendo el pH de 9.4. Como se puede observar en el electroferograma de la ilustración 22 al aumentar la concentración del buffer de 50 mM a 60 mM se obtiene una mejor resolución de los picos 6, 7 y 8, pero no hay una completa resolución de las tres señales, además de que se presenta un aumento en los tiempos de migración, esto se debe al incremento de la fuerza iónica del buffer y de su viscosidad (Watson, 2005).

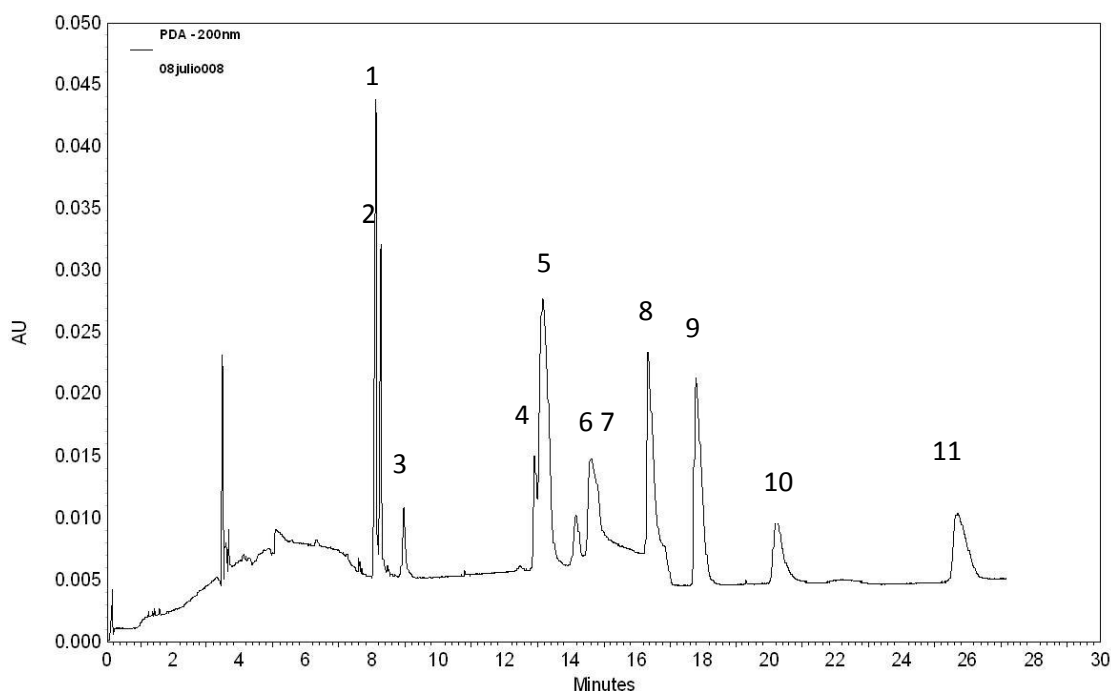


Ilustración 22. Electroferograma de la mezcla de 11 estándares.

**Condiciones:** Capilar de sílice fundida de 51.9 cm de longitud total, D.I. 50  $\mu\text{m}$ , buffer 60 mM, pH 9.4  
inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 28 kv, polaridad normal del capilar, 22°C

Ante esta situación se decidió utilizar una concentración intermedia de 55 mM del buffer de boratos, para disminuir los tiempos de migración.

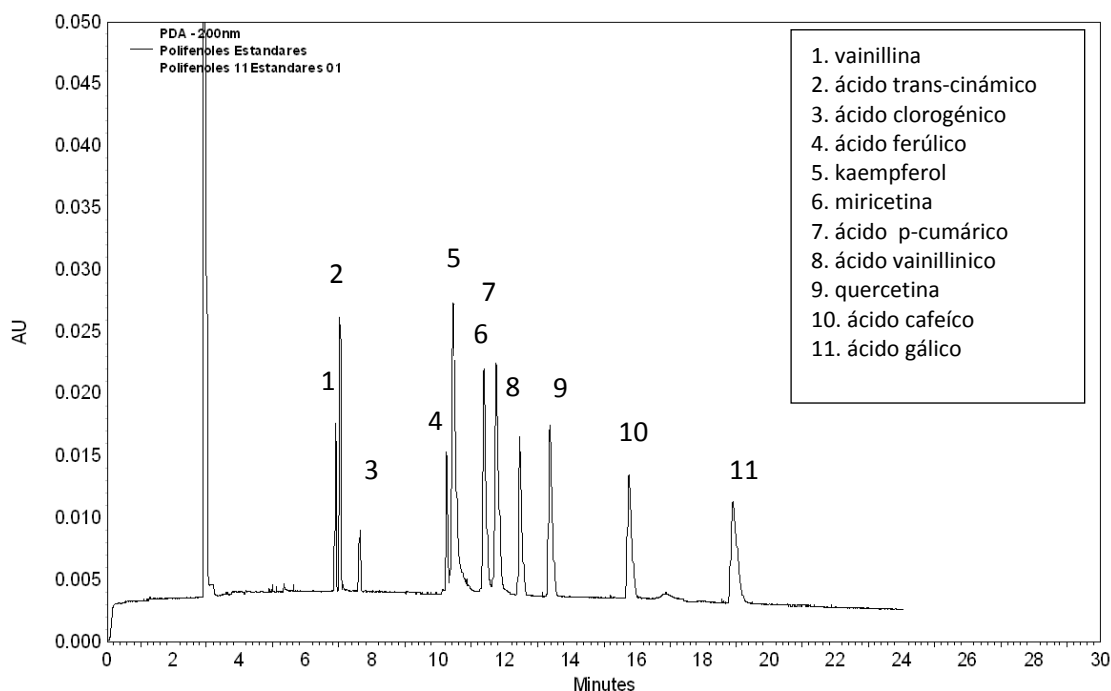


Ilustración 23. Electroferograma de la mezcla de 11 estándares.

**Condiciones:** Capilar de sílice fundida de 51.9 cm de longitud total, D.I. 50  $\mu\text{m}$ , buffer 55 mM, pH 9.4  
inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 28 kv, polaridad normal del capilar, 22°C.



En el electroferograma ilustración 23 podemos observar una mejor resolución de la mezcla de los 11 estándares con una mejora en la eficiencia de los picos y un menor tiempo de análisis (pues disminuyo de 27 minutos a 20 minutos).

#### 4.2 Condiciones óptimas para el análisis de muestras por la técnica de Electroforesis Capilar.

La Tabla 12 indica las condiciones óptimas de operación del instrumento las cuales se mantuvieron constantes durante todo el desarrollo experimental.

Tabla 12. Condiciones electroforéticas óptimas para el análisis de muestras

Concentración de Buffer	55 mM de buffer de boratos (a partir de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )
pH	9.4 (ajustado con NaOH 0.1N)
Voltaje	28 kV
Inyección de muestra	0.5 psi durante 5 s
Temperatura de análisis	22 °C
Longitud total de capilar	51.9 cm
Longitud efectiva	41.7 cm
Diámetro interno	50 $\mu\text{m}$
Longitud de onda de detección	200 nm

##### 4.2.1 Ciclo de lavado

Durante el desarrollo de un método es importante optimizar el ciclo de lavado del capilar para obtener una buena repetibilidad de los resultados. Cada método necesita un tiempo de acondicionamiento del capilar en función de la solución de separación que se esté empleando y la matriz utilizada.

Se realizó un experimento variando el tiempo de lavado del capilar entre inyecciones con el fin de observar el efecto que tiene éste en la repetibilidad de las mediciones. Los resultados se observan en la tabla 13 y en la ilustración 16.



**Tabla 13. Comparación de la repetibilidad en las áreas y alturas, en función del tiempo del lavado del capilar entre corridas.**

<b>10 MINUTOS DE LAVADO ENTRE CORRIDAS</b>				
	Área estándar/Área EI	Altura estándar/Altura EI	Área estándar/Área EI	Altura estándar/Altura EI
	0.1096	0.3115	0.1050	0.2890
	0.1051	0.2890	0.1007	0.2921
<b>Ácido ferúlico</b>	0.1027	0.2932	0.1024	0.2983
	0.1035	0.2988	0.1017	0.2892
	0.1017	0.2894	0.1028	0.2853
	0.1034	0.2857	0.1023	0.2881
<b>Promedio</b>	0.1043	0.2946	0.1025	0.2904
<b>Desviación Estándar</b>	0.0028	0.0094	0.0014	0.0045
<b>CV</b>	<b>2.7166</b>	3.1973	1.4077	1.5455

<b>15 MINUTOS DE LAVADO ENTRE CORRIDAS</b>				
	Área estándar/Área EI	Altura estándar/Altura EI	Área estándar/Área EI	Altura estándar/Altura EI
	0.0708	0.2403	0.0694	0.2341
	0.0704	0.2347	0.0678	0.2363
<b>Ácido p-cumárico</b>	0.0688	0.2367	0.0686	0.2388
	0.0700	0.2398	0.0669	0.2309
	0.0676	0.2314	0.0664	0.2294
	0.0683	0.2315	0.0680	0.2326
<b>Promedio</b>	0.0693	0.2357	0.0679	0.2337
<b>Desviación Estándar</b>	0.0013	0.0039	0.0011	0.0035
<b>CV</b>	1.8239	1.6533	1.6294	1.4862



Electroferograma obtenido de dos estándares y estándar interno a partir de un ciclo de lavado de 15 minutos entre corridas.

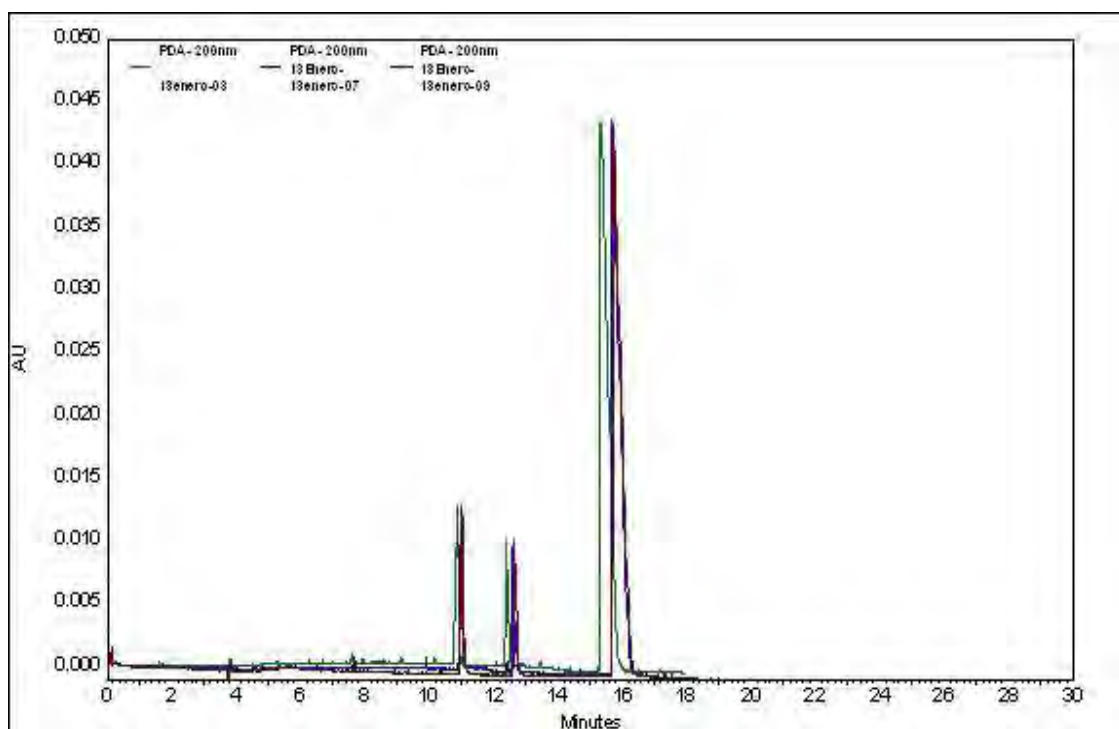


Ilustración 24. Electroferograma obtenido de dos estándares y estándar interno a partir de un ciclo de lavado de 15 minutos entre corridas.

Después de analizar los datos se concluyó que el mejor tiempo de lavado entre inyecciones es de 15 min de buffer a 30 psi de presión y 25°C, para obtener una buena repetibilidad en los resultados.

#### 4.3 Identificación cualitativa de compuestos fenólicos presentes en el aceite y en la harina de la semilla de chía.

Se realizó la identificación cualitativa de los compuestos fenólicos presentes en los diferentes lotes de chía mediante la comparación de tiempos de migración y forma con el perfil de los estándares previamente inyectados. La presencia de estos compuestos fenólicos se corroboró por el método de fortificación del estándar al verificar su respectivo aumento del pico después de su fortificación.

Antes de caracterizar los compuestos de interés cada extracto se corrió por triplicado. Al inyectar el extracto de la semilla desengrasada 125H el electroferograma (ilustración 25), mostró 4 señales de mayor intensidad entre los 7-13 minutos, de acuerdo al electroferograma obtenido de la inyección de la mezcla de estándares (ilustración 23) podemos inferir la existencia de ácido vainillínico debido a la señal que se obtuvo alrededor de los 12 minutos. De igual forma al contrastar todas las señales se propone la



existencia de ácido trans-cinámico, miricetina y ácido p-cumárico, para confirmar la presencia de estos compuestos fenólicos en el extracto se fortificó con una alícuota de 5  $\mu$ L de cada uno de los estándares que pudiesen tener presencia en la muestra. Confirmando su existencia por el aumento en áreas en cada una de las señales. En el electroferograma del anexo (ilustración 33) podemos ver el extracto fortificado de la semilla de chía desengrasada.

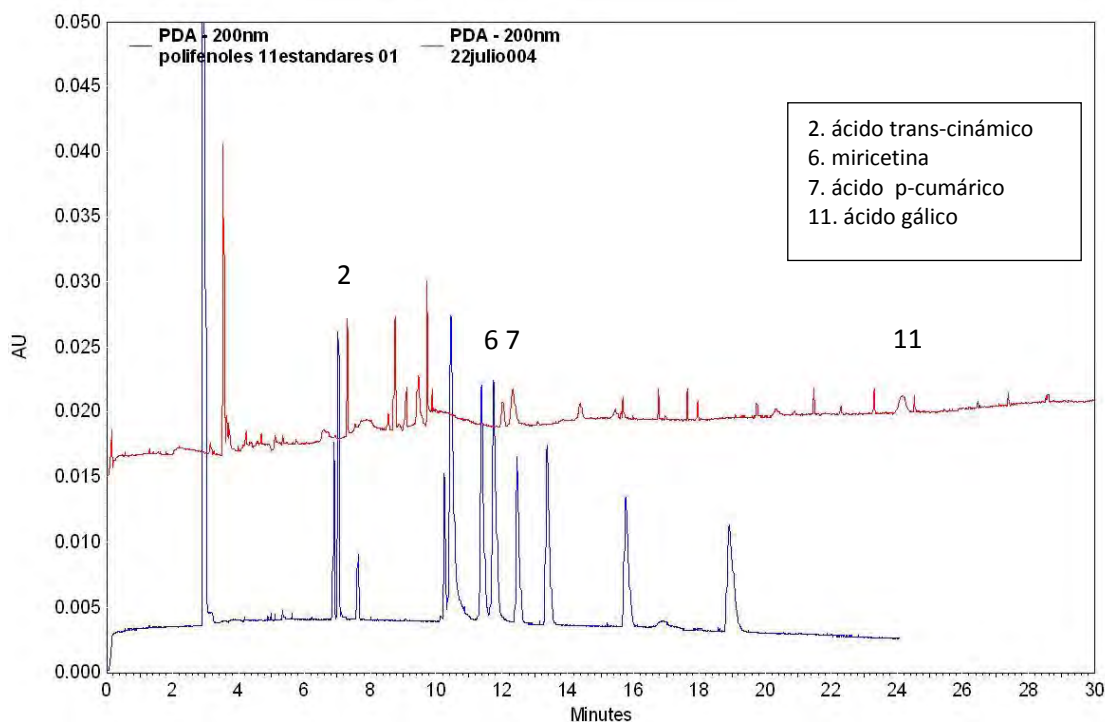


Ilustración 25 Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 125H.

De esta forma confirmamos que el extracto de la semilla 125H contiene miricetina, ácido cumárico y ácido gálico además en este mismo extracto se identificó ácido trans-cinámico. Por otro lado las señales entre los 10 y 8 minutos de mayor intensidad no coinciden con ninguno de los estándares.

Tabla 14. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 125H

Compuesto fenólico	Tiempo de migración	Área	Altura
ácido trans-cinámico	7.4	27601	8396
miricetina	12.2	8806	1735
ácido p-cumárico	12.5	25257	2575
ácido gálico	24.2	16856	1418



El electroferograma (ilustración 26) de la semilla desengrasada 287H muestra varias señales por lo que se sobrepuso al electroferograma de los estándares de polifenoles (ilustración 23) y se analizó de igual forma que en el extracto anterior. Podemos observar algunas señales que coinciden con los tiempo de migración de algunos estándares tal es el caso de las señales comprendidas entre los 8-14 minutos, por fortificación se corroboró la existencia de ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, miricetina, ácido cumárico, quercetina y ácido gálico. Cabe mencionar que el ácido gálico tuvo un mayor desplazamiento en la muestra de la semilla desengrasada 287H, este se identificó en primera estancia por la forma y se corroboró por fortificación con el estándar. Ver anexo ilustración 34 electroferograma fortificado del extracto de la semilla desengrasada 287H.

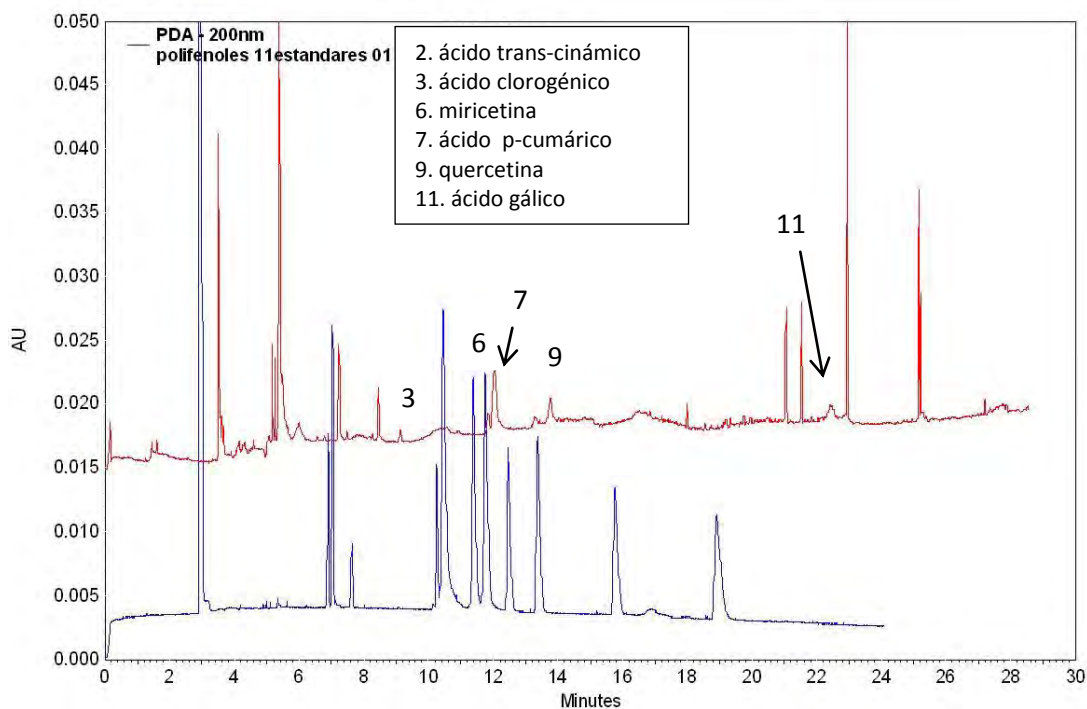


Ilustración 26. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 287H.

Tabla 15. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 287H

Compuesto fenólico	Tiempo de migración	Área	Altura
ácido trans-cinámico	7.3	34776	5025
ácido clorogénico	8.4	13043	4417
miricetina	11.8	4830	1358
ácido p-cumárico	12.0	45892	5364
quercetina	13.4	14369	3290
ácido gálico	22.4	16666	1466



En el extracto de la semilla de chía desengrasada 094H (ilustración 27) se detectó la menor cantidad de señales de las 4 muestras (de semilla desengrasada), a pesar de esto, se lograron identificar 4 compuestos fenólicos (al igual que la semilla desengrasada 125H con mayor número de señales) siendo éstos: ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico y ácido cafeíco.

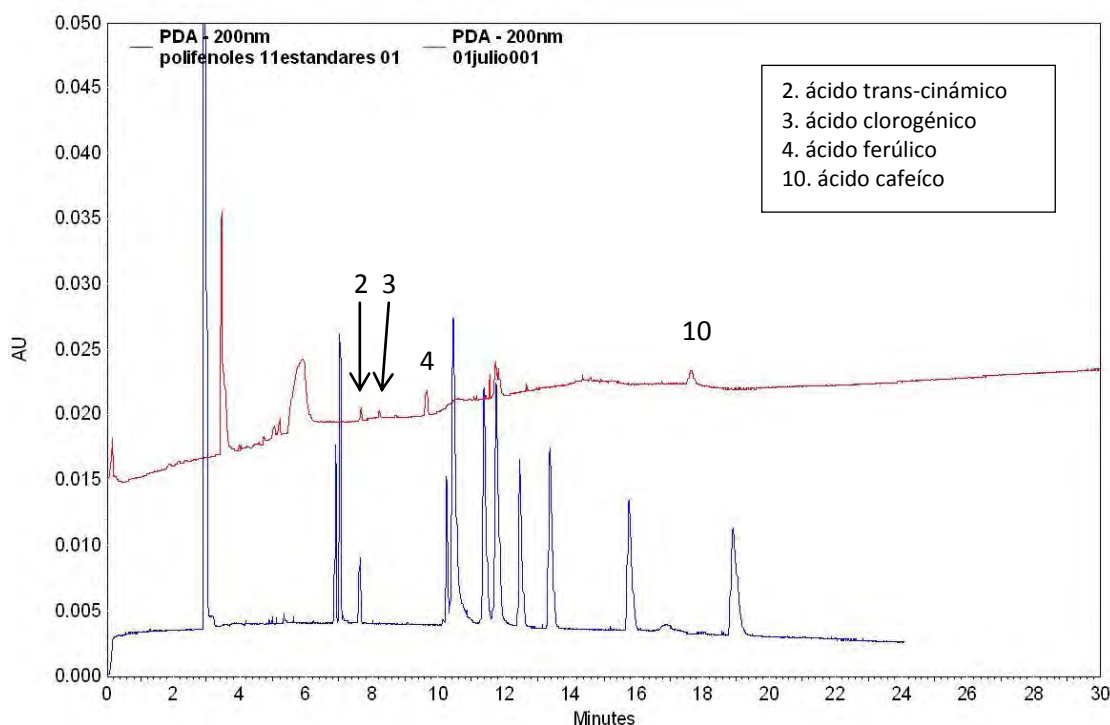


Ilustración 27. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 094H

En el anexo específicamente en la ilustración 35, se puede ver el electroferograma fortificado del extracto de la semilla desengrasada 094H.

Tabla 16. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 094H

Compuesto fenólico	Tiempo de migración	Área	Altura
ácido trans-cinámico	7.6	3299	1164
ácido clorogénico	8.2	2027	601
ácido ferúlico	9.6	8599	2186
ácido cafeíco	17.5	10265	1184

La última muestra analizada fue la de la semilla desengrasada 301H (ilustración 28), en el cual se logró identificar el mayor número de compuestos fenólicos analizados, identificándose: ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vainillínico, quercetina, ácido cafeíco y ácido gálico. En el anexo, específicamente



en la ilustración 36, se puede ver el electroferograma fortificado del extracto de la semilla desengrasada 301H, donde se confirmaron sus señales.

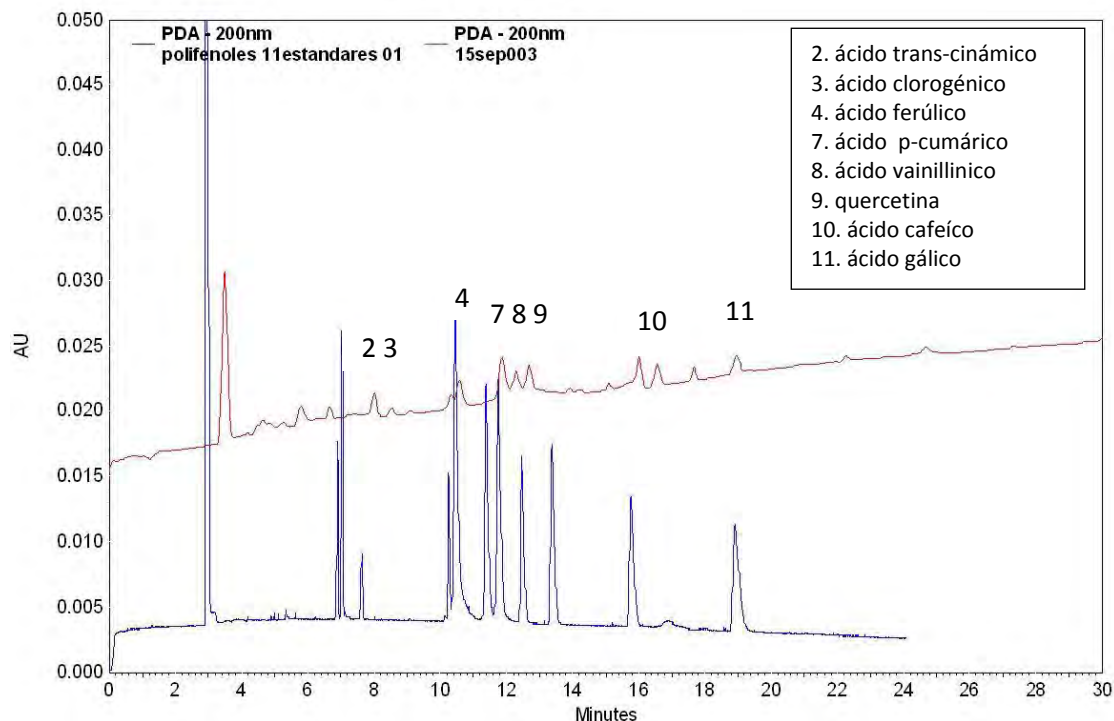


Ilustración 28. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 301A

Tabla 17. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 301H

Compuesto fenólico	Tiempo de migración	Área	Altura
ácido cinámico	8.0	17066	1741
ácido clorogénico	8.5	5323	560
ácido ferúlico	10.5	16195	1567
ácido cumárico	11.8	33353	2772
ácido vainillínico	12.2	13737	1251
quercetina	12.6	15948	1625
ácido cafeíco	16.5	15519	1576
ácido gálico	18.9	18110	1388

A continuación se muestran las graficas obtenidas de las muestra de aceite de cada una de las semillas. En el electroferograma del extracto del aceite de la semilla 125A podemos observar (ilustración 29) que entre los 9-17 minutos, no existe alguna señal significativa para sospechar la presencia de algún analito por lo que se sobrepuso el perfil de la mezcla de estándares (ilustración 23) comparando las gráficas observamos un desplazamiento debido a la viscosidad diferencial de la muestra con respecto a los estándares. Una vez



interpolado en las graficas sospechamos la existencia de ácido trans-cinámico y ácido clorogénico. Se corroboró la existencia de estos compuestos por fortificación. Ver en el anexo (ilustración 37) el electroferograma fortificado del extracto del aceite de la semilla desengrasada 125A.

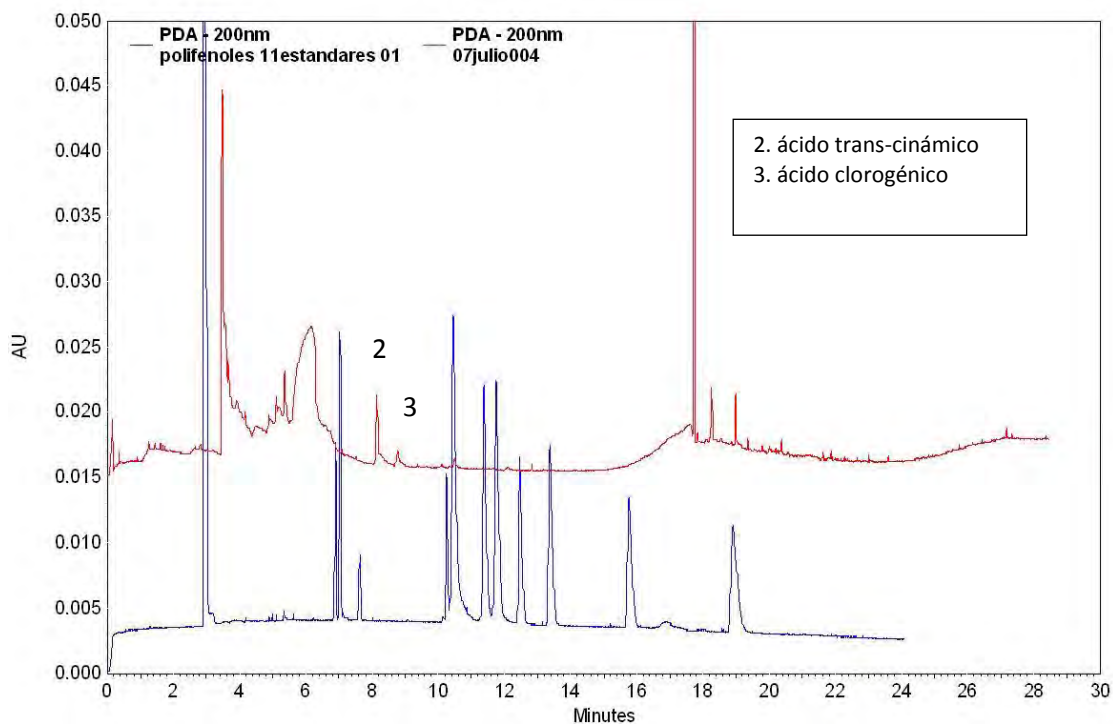


Ilustración 29. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chía 125A.

Tabla 18. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 125A.

Compuesto fenólico	Tiempo de migración	Área	Altura
ácido trans-cinámico	8.2	15103	4472
ácido clorogénico	8.8	3877	1015

El electroferograma del aceite de la semilla 287A (ilustración 30), comparado con el electroferograma de la muestra de aceite de la semilla anterior (ilustración 29), muestra una menor cantidad de picos por lo que esperaríamos identificar un menor número de compuestos de nuestro interés, una vez realizada la comparación del perfil de la muestra de aceite y la de la mezcla de estándares, nos percatamos, que a pesar de que hay una menor cantidad de señales, estas coinciden con las señales de la mezcla de estándares identificando un mayor número de compuestos de interés tales como: ácido trans-



cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, miricetina, ácido cafeíco. Ver anexo (ilustración 38) electroferograma fortificado del extracto del aceite de la semilla desengrasada 287A.

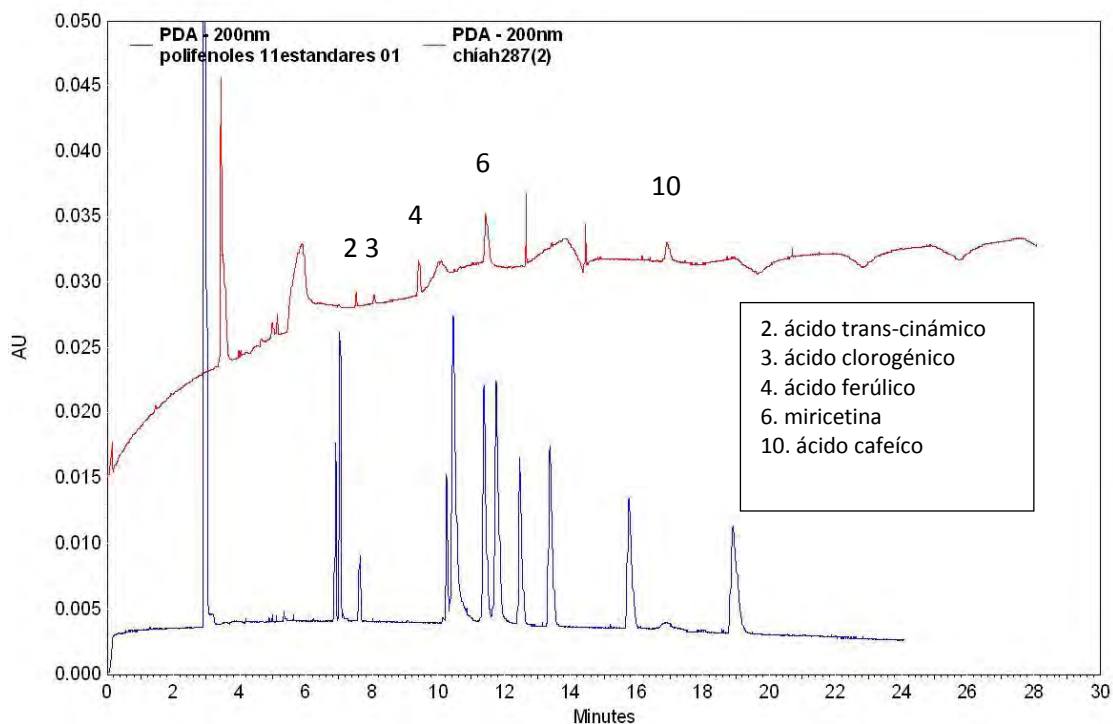


Ilustración 30. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla de chía 287A.

Tabla 19. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 287A.

Compuesto fenólico	Tiempo de migración	Área	Altura
ácido trans-cinámico	7.5	3413	1197
ácido clorogénico	8.1	2914	770
ácido ferúlico	9.4	10045	2663
miricetina	11.4	15967	2836
ácido cafeíco	16.9	13914	1473

En el electroferograma del aceite de la semilla 094A (ilustración 31) podemos observar una mayor cantidad de señales por lo que esperaríamos identificar un mayor número de compuestos fenólicos al realizar la comparación con el perfil de la mezcla de estándares, sin embargo, nos percatamos que solo existían dos señales que coincidían con los tiempos de migración de los estándares, por lo que se realizó la fortificación para la identificación y se corroboró la presencia de solo ácido cinámico. La señal a los 14 minutos se creía que correspondía a ácido vainillínico, pero en el momento de la fortificación se descartó la



existencia de este compuesto fenólico en la muestra, ya que se observó la presencia de una nueva señal a los 14.33 min. Ver (ilustración 39) en el anexo el electroferograma fortificado del extracto del aceite de la semilla desengrasada 094A.

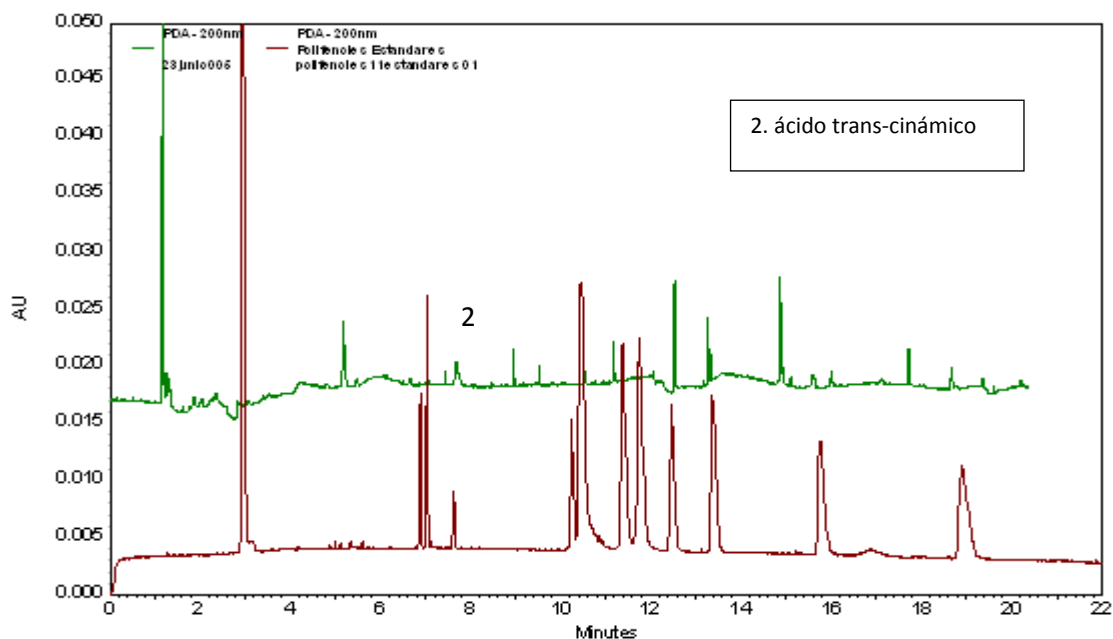


Ilustración 31. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla de chía 094A

Tabla 20. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 094ª.

Compuesto fenólico	Tiempo de migración	Área	Altura
ácido cinámico	7.8	16238	5682

La última muestra analizada fue la del aceite 301A (ilustración 32) en la cual se logró identificar ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido vainillínico, ácido cafeico y ácido gálico. En esta muestra fue donde se identificaron un mayor número de compuestos fenólicos, además de ser la que mostró mayor número de señales y de mayor absorbancia lo cual nos indica que están presentes en mayor cantidad. Ver anexo (ilustración 40) electroferograma fortificado del extracto del aceite de la semilla desengrasada 301A.



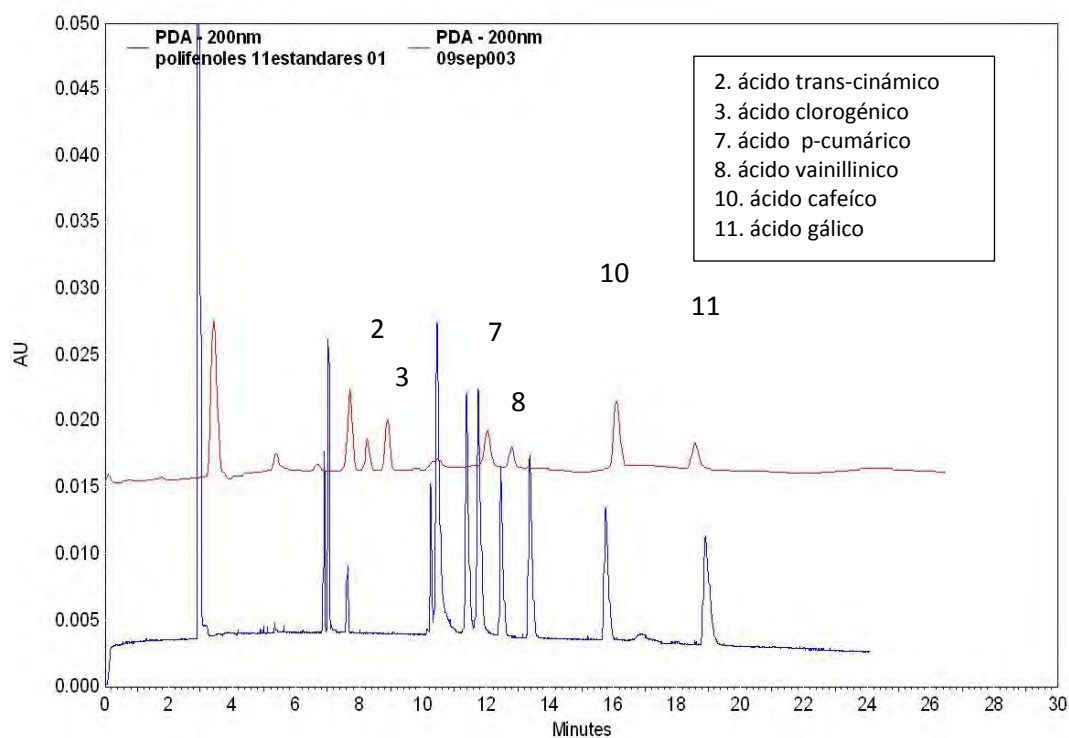


Ilustración 32. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla de chía 301A.

Tabla 21. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 301A.

Compuesto fenólico	Tiempo de migración	Área	Altura
ácido trans-cinámico	8.2	26986	2669
ácido clorogénico	8.8	34417	3345
ácido p-cumárico	11.9	28046	2078
ácido vainillínico	12.6	13954	1343
ácido cafeíco	18.3	24302	1732

A continuación se presenta un resumen (tabla 22) de los compuestos identificados en cada uno de los extractos de aceite y harina de la semilla de chía. Podemos observar un mayor número de compuestos identificados en la semilla 301, ya que se identificaron 8 de los 11 estándares analizados. Los parámetros de identificación fueron tiempo de migración y se corroboró su presencia por fortificación con adición del estándar.



Tabla 22. Identificación de compuestos fenólicos presentes en el extracto de aceite y semilla de chía por fortificación de las muestras con adición de estándar.

Muestra	Compuestos fenólicos										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
chía aceite 287A		✓	✓	✓		✓				✓	
chía desengrasada 287H		✓	✓			✓	✓		✓		✓
chía aceite 125A		✓	✓								
chía desengrasada 125H		✓				✓	✓			✓	✓
chía aceite 094A		✓									
chía desengrasada 094H		✓	✓	✓						✓	
chía aceite 301A		✓	✓			✓	✓			✓	
chía desengrasada 301H		✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓

Codificación:

1. Vainillina
2. ácido trans-cinámico
3. ácido clorogénico
4. ácido ferúlico
5. kaempferol
6. miricetina
7. ácido p-cumárico
8. ácido vainillinico
9. quercetina
10. ácido cafeico
11. ácido gálico

#### 4.4 Selección del estándar interno.

Una vez separados e identificados los diferentes compuestos fenólicos del aceite y chía desengrasada, se propusieron como estándar interno la vainillina y ácido gálico. Después de observar las señales de ambos estándares, se seleccionó ácido gálico como estándar interno (E.I.), debido a que no se encuentra presente en ninguno de los extractos de las semillas previamente analizadas y al mismo tiempo su pico no se traslapó con ningún otro pico de nuestras muestras, así mismo la altura del pico es similar a la de los demás estándares.

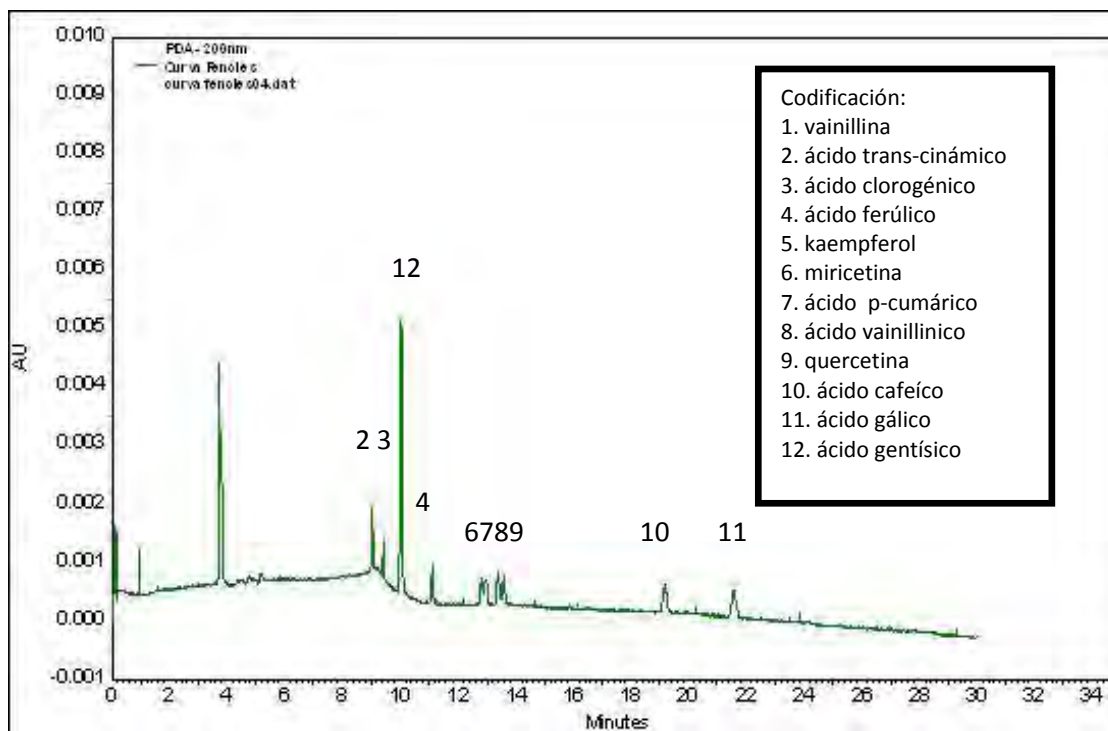


Ilustración 33. Electroferograma de la mezcla de 9 estándares y el estándar interno. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 51.9 cm de longitud total, D.I. 50  $\mu\text{m}$ , buffer 55 mM, pH 9.4 inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 28 kv, polaridad normal del capilar, 22°C.

#### 4.5 Curvas de calibración para los compuestos fenólicos presentes en los las muestras de chía.

Las curvas de calibración se realizaron por triplicado según lo expuesto en la sección 4.8 para cuantificar la concentración de ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillínico, quercetina, ácido cafeíco, ácido gálico en las muestras analizadas.

La Tabla 23 resume los resultados expresados en el Anexo 2, en la Tabla 23 se muestran intervalos de concentración y los parámetros de linealidad de las curvas de calibración de las Ilustraciones 33 a 39 de ese mismo anexo. En esta tabla se puede notar que hay un ajuste a un modelo lineal entre la relación de áreas ( $\text{área}_{\text{estandar}}/\text{área}_{\text{E.I}}$ ) y la concentración del fenol. Al igual que la relación de alturas ( $\text{altura}_{\text{estandar}}/\text{altura}_{\text{E.I}}$ ) y la concentración del fenol. Todas las ecuaciones tuvieron un coeficiente de determinación  $R^2 > 0.98$ , lo cual permite la utilización de las ecuaciones para interpolar las muestras de aceite y semilla de chía.

**Tabla 23. Resumen de los parámetros de linealidad de las curvas de calibración de los estándares.**

Compuesto	Interv. conc. (mg/L)	Ecuación Y=mx+b	R <sup>2</sup>	IC(β <sub>0</sub> )	IC(β <sub>1</sub> )
ácido trans-cinámico (altura)	10.2-200.4	Y=0.0068x+0.0180	0.9958	-0.0049-0.0409	0066-0.0071
ácido clorogénico (área)	10.2-200.4	Y=0.0040x+0.0163	0.9906	-0.0040-0.0366	0038-0.0043
ácido ferúlico (área)	4.025-48.3	Y=0.0156x+0.0009	0.9929	-0.0177-0.0196	0149-0.0163
miricetina (altura)	3.775-45.3	Y=0.0139x-0.0111	0.9912	-0.0285-0.0063	0133-0.0146
ácido cumárico (área)	2.025-28.35	Y=0.0448x-0.0227	0.9903	-0.0572-0.0117	0425-0.0472
ácido vainillinico (altura)	2.025-24.3	Y=0.0236x+0.0018	0.9897	-0.0152-0.0190	0234-0.0249
quercetina (altura)	2.775-33.3	Y=0.0163x+0.0022	0.9982	-0.0043-0.0088	0159-0.0166
ácido cafeíco (área)	29-290	Y=0.0039x-0.0260	0.9946	-0.0527-0.0005	0037-0.0040
ácido gálico (área)	29-290	Y=0.0033x-0.0210	0.9894	-0.0530-0.0110	0031-0.0035

Y=Cociente de áreas (área estándar/área<sub>E,i</sub>) ó cocientes de alturas (altura estándar/altura<sub>E,i</sub>)  
X= concentración del analito m= F factor respuesta/C<sub>E,i</sub> b= ordenada al origen

#### 4.6 Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en el aceite y semilla de chía y comparación con otras fuentes de antioxidantes (semillas, aceite, frutas y verduras).

La cuantificación de los compuestos se realizó con el procedimiento descrito en la sección 3.9. La tabla 24 resume la concentración de los fenoles presentes en cada una de las muestras en mg/L.

**Tabla 24. Concentración de compuestos fenólicos presentes en las diferentes especies de aceites y semilla de chía.**

Muestra	Concentración mg/L Compuesto fenólico									
	2	3	4	6	7	8	9	10	11	
chía aceite 287A	32.7345	23.1129	16.5797	40.7470				93.9835		
chía desengrasada 287H	207.0545	25.9579		30.5291	25.9995		38.6003		141.8520	
chía aceite 125A	183.9640	32.0559								
chía desengrasada 125H	231.0051			37.5631	15.5025				143.3982	
chía aceite 094A	234.4849									
chía desengrasada 094H	45.5886	21.9248	14.6110					71.2374		
chía aceite 301A	71.3742	207.0194			17.1561			174.0221		
chía desengrasada 301H	72.8472	32.0977	27.8594		19.7809	16.1656	28.5457	103.9852	153.5652	



Una vez realizado lo anterior, los datos de las concentraciones (mg/L) obtenidas de cada fenol se les realizó una la conversión a mg/100 g muestra, para poder realizar la comparación con otras fuentes de antioxidantes, la operación que se llevó a cabo fue la siguiente.

Para el aceite (según el apartado 3.2.3)

$$\left(\frac{28.8012 \text{ mg Fenol}}{L}\right)\left(\frac{1 L}{1000 \text{ mL}}\right)(1 \text{ mL}) = \frac{0.0288012 \text{ mg Fenol}}{1 \text{ g de aceite de chía}}$$

$$= \frac{2.8801 \text{ mg}}{100 \text{ g de aceite de chía}}$$

Para la semilla de chía (según el apartado 3.2.2)

$$\left(\frac{208.3248 \text{ mg Fenol}}{L}\right)\left(\frac{1 L}{1000 \text{ mL}}\right)(7.5 \text{ mL}) = \frac{0.2083248 \text{ mg}}{5 \text{ g de harina}} = \frac{31.2487 \text{ mg Fenol}}{100 \text{ g de harina}}$$

**Tabla 25. Concentración de compuestos fenólicos presentes en las diferentes especies de aceites y semilla de chía.**

Muestra	Concentración mg fenol/100 g muestra										TOTAL
	Compuesto fenólico										
	2	3	4	6	7	8	9	10	11		
chía aceite 287A	3.2735	2.3113	1.6580	4.0747				9.3983			20.7158
chía desengrasada 287H	31.0582	3.8937		4.5794	3.8999		5.7900		21.2778		70.499
chía aceite 125A	18.3964	3.2056									21.602
chía desengrasada 125H	34.6508			5.6345	2.3254				21.5097		64.1204
chía aceite 094A	23.4485										23.4485
chía desengrasada 094H	6.8383	2.1925	14.6110					10.6856			34.3274
chía aceite 301 <sup>a</sup>	7.1374	20.7019			1.7156			17.4022			46.9571
chía desengrasada 301H	10.9271	3.2098	27.8594		2.9671	2.4248	4.2819	15.5978	23.0348		90.3027

Como podemos observar en la tabla 16 el ácido trans-cinámico (2) es el analito que se encuentra presente en todas las muestras analizadas en un amplio rango de concentración, con un contenido alrededor de 3.2735 a 34.6508 mg ácido trans-cinámico/100 g de



muestra. Con respecto a la semilla de chía desengrasada la 125 resultó la de mayor concentración (34.65 mg/100g), mientras que con respecto al aceite, la semilla 094 (23.45 mg/100g) resultaron las de mayor concentración: estos valores superan los reportados (Martínez, 2000.), para las manzanas que oscilan entre 25-61.47 mg/L. Por otro lado el ácido clorogénico (3) es el segundo analito con mayor frecuencia en las muestras analizadas, el contenido es de 2.1925 a 20.7019 mg de ácido clorogénico/100 g de muestra, siendo el aceite de la semilla 301 la de mayor concentración, superando el contenido reportado para la patata de 17.36 mg de ácido clorogénico/ 100 g de muestra (Dao L., 1992). El contenido de ácido clorogénico en el aceite de la semilla 301 constituye el 45.94% del total los compuestos fenólicos caracterizados en esta muestra, destacando así el gran contenido de este compuesto fenólico en el aceite de esta semilla 301.

Le sigue el ácido cumárico (7) con un contenido de 1.7156-3.8999 mg de ácido cumárico/100g de muestra.

La concentración de quercetina (9) en las muestras se encuentran entre los 4.2819 a 5.7900 mg de quercetina/100g de muestra, comparando la concentración de quercetina en las muestras de chía desengrasada con otras fuentes como; la lechuga, la manzana y el tomate, estas semillas superan el contenido de quercetina en cada una de ellas (Herttog, 1992) se reporta 1.4 mg/100g de muestra en la lechuga, 0.8 mg/100g de muestra en el tomate y 3.6 mg/100g de muestra en la manzana. Comparando con el contenido de quercetina en las muestras de chía analizadas, éstas superan por mucho el contenido en otras fuentes. Por otro lado Cruz, 2008, reporta 4.95 mg de ácido cafeico/ 100g de muestra para una especie de chía desengrasada, proveniente del estado de Sinaloa, comparada con las semillas desengrasadas analizadas en esta tesis, estas superan el contenido de ácido cafeico (10) con 9.3983-17.4022 mg de ácido cafeico/100g de muestra.

Miricetina (6) se encontró en el aceite de la semilla 287 que esta contiene una concentración de 4.0747 mg de miricetina/100 g de muestra, mientras que la semilla desengrasada 125 contiene 5.6345 mg de miricetina/100 g de muestra. Comparado las concentraciones de este analito con la reportada para el tomate este contiene 2.6 mg de miricetina/100g de muestra y la uva rosada 0.45 mg de miricetina /100 g de muestra (Cieslik, 2006), la concentración de miricetina es mucho mayor en las semillas 287 y 125.



Con toda la comparación en el contenido de polifenoles realizada contra otras frutas y hortalizas, podemos ver que tanto el aceite de chía, como la semilla desengrasada (harina) son ricas fuentes de polifenoles comparados con otras frutas u hortalizas. Además pudimos observar que la semilla desengrasada (harina) tiene un contenido mayor (2 a 3 veces más) que en el aceite de chía.

#### 4.7 Comparación de los resultados obtenidos con valores reportados

Con la finalidad de realizar la comparación se realizó una suma de las cantidades de fenoles (mg/100g) obtenidas en cada una de las muestras. Este total también está reportado en la última columna de la Tabla 26 y realizaremos el ejercicio de compararla con los valores reportados (Gonzalez-Jiménez, 2011) de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu (Singleton y Rossi 1965).

**Tabla 26. Contenido de fenoles totales en aceite y semilla de chía (mg/100g de muestra).**

Muestra	ESTE ESTUDIO FOLIN-CIOCALTEAU	
	ESTE ESTUDIO	FOLIN-CIOCALTEAU
chía aceite 287 <sup>a</sup>	20.72	3.80±0.23
chía desengrasada 287H	70.50	1052.61±3.36
chía aceite 125 <sup>a</sup>	21.60	2.47±0.13
chía desengrasada 125H	64.12	854.29±5.82
chía aceite 094 <sup>a</sup>	23.45	11.49±0.53
chía desengrasada 094H	34.33	1104.71±6.05
chía aceite 301 <sup>a</sup>	46.96	5.21±0.23
chía desengrasada 301H	90.30	1091.34±13.33

Como podemos observar en la Tabla 17, en general tanto en este estudio, como en el reportado por González-Jiménez, existen mayores valores de fenoles totales en las semillas de chía desengrasada (harina) que en los aceites. Sin embargo, los valores comparados por ambas técnicas, no poseen una misma magnitud, sobre todo en los valores de la chía desengrasada. Cabe hacer mención que la técnica de electroforesis capilar está reportando, en ésta tesis, la cantidad específica de cada uno de los fenoles. Mediante la sumatoria de



todas las cantidades obtuvimos los fenoles totales, el método de Folin-Ciocalteou, es muy bien sabido que no es específico para solo fenoles y que evalúa además de todos los antioxidantes presentes, también proteínas, por lo que consideramos que sus valores están sobreestimados en la semilla desengrasada y subestimados en el aceite de chía, quizá por que es un método para ser aplicado en soluciones acuosas y alcohólicas.





## 5. CONCLUSIONES

- Se realizó exitosamente la optimización del método para la caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en la semilla de chía y en el aceite extraído de la misma, mediante el uso de la técnica de electroforesis capilar.
- La extracción del aceite de chía se realizó de forma eficiente utilizando el método de extracción Soxhlet. El aceite de chía y la harina desengrasada fueron de esta forma separadas y se realizó la identificación de los polifenoles presentes en fracción desengrasada y en el aceite de chía.
- La metodología desarrollada durante este trabajo incluye la separación de 11 compuestos fenólicos en un tiempo de análisis menor a 25 minutos.
- Se logró identificar los polifenoles presentes en las semillas de chía de diferentes localidades, tanto en la harina como en el aceite por comparación en sus tiempos de migración con los de los estándares, por fortificación de la muestra con el estándar y por comparación de las señales con su espectro de absorción correspondiente.
- La cuantificación de los compuestos fenólicos identificados en la harina como en el aceite de chía de diferentes localidades fue realizada exitosamente, a través de curvas de calibración empleando como estándar interno ácido gálico. Se evaluaron varios parámetros de validación del método probando con evidencia documental su confiabilidad.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Almaraz-Abarca N., M. da G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jimenez, J. Herrera Corral, L.S. González- Valadez. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybeecollected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 119-124.
- ✓ Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, L.S. González-Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee- collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29 (10): 574-n83.
- ✓ Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jimenez, J. Herrera-Corral, L. S. González- Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29 (10): 574-582.
- ✓ Alzellotti, D., R. Ibrahim. 2004. Molecular characterization and functional expression of flavonol 6-hydroxylase. *BMC Plant Biology* 4:20. Doi: 10.1186/1471-2229-4-20.
- ✓ Ayerza R. y Coates W., 2004. Semillas de chía: nueva fuente natural de ácidos grasos omega-3, antioxidantes y fibra dietética. Southwest Center of natural Products Research & Comercialization, Office of arid Land Studies, The University of Arizone.
- ✓ Ayerza, R. and W. Coates. 1996. New industrial crops: Northwestern Argentina Regional Project. p. 45-51. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- ✓ Beltrán M. y Romero M. 2003. La chía alimento milenario. *Industria alimentaria*. Septiembre – Octubre. PP. 20-29.
- ✓ Cahill, Joseph 2003: *Ethnobotany of Chía, Salvia hispánica L. (Lamiaceae)*, en *Economic Botany*, vol. 57, nº 4. pp. 604-618.
- ✓ Campos, R. M. G. 1997. *Caracterizacao do Pólen Apícola Pelo seu Perfil em compostos Fenólicos e Pesquisa de Algumas Actividades Biológicas*. Tesis de Doutorameto, Universidade de Coimbra, Portugal.



- ✓ Carrasco-Pancorbo A., Gómez-Caravaca A.M., Carretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. 2006. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra virgin olive oil. *J.Sep. Sci.* 29, 2221-2233.
- ✓ Carrasco-Pancorbo Alegria., Arráz-Román David., Segura-Carretero Antonio., Fernández-Gutiérrez Alberto. 2006. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis* 27, 2182–2196.
- ✓ Carrasco-Pancorbo, A., Cifuentes, A., Cortacero-Ramirez, S., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2007. *Talanta*. 71, 397-405.
- ✓ Castillo, R.M.A., Revilla, V. A. I, López, A.R. (2002). *Fundamentos de electroforesis capilar*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Castillo, R.M.A., Revilla, V.A. L, López A.R. (2002). *Fundamentos sobre electroforesis*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Cieslik E, Greda A, Adamus W. Contents of phenolics in fruit and vegetables. *Food Chemistry*. 2006, 94: 135 – 142.
- ✓ Cruz P. N.. 2008. *Compuestos fenólicos de la chía: efectos del método de extracción y temperatura sobre la actividad antioxidante*. Universidad Nacional autónoma de México. México
- ✓ Dao L y Friedman M. Chlorogenic acid contents of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J Agric Food Chem* 1992; 40; 2152-2156.
- ✓ Dewick, P. M. 1994. Isoflavonoids. In: *The Flavonoids. Advances in Research since 1986*. (Editor: Harborne, J. B.). Chapman & Hall London. pp 117-238.
- ✓ Fernández (2005) *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*. Eug. Granada.
- ✓ Fernandez-Gutierrez, A., 2006. *J. Pharm. Biom. Anal.*, 41, 1220-1234.
- ✓ Fonseca, FN., Tavares, MFM., Horvath, C., 2007. *J. Chrom. A*. 1154, 390-399.
- ✓ Foret. F.; Bocek, T y Krivánková, L.(1993). *Capillary Zone Electrophoresis*. Edit. VCH, Alemania.
- ✓ Garcia D, Vilorio Matos A, Belén D, Moreno-Álvarez M., 2003. Características físico-químicas y composición de ácidos grasos del aceite crudo extraído de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Grasas y Aceites* Vol 54(3) 259-263.



- ✓ Gomez-Caravaca, AM., Gomez-Romero., M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A.,
- ✓ González. 2011. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispánica* L.), mediante electroforesis capilar. Instituto Politécnico Nacional. Mexico.
- ✓ Hadacek, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science* 21:273-322.
- ✓ Harborne, J. B., B, L. Turner. 1984. *Plant Chemosystematics*. Academic Press. London. pp. 146-149.
- ✓ Harris D. C. 2012, *Análisis Químico Cuantitativo*. México. Editorial Reverte
- ✓ Heiger, N. (1997) *High performance capillary electrophoresis*. Tercera edición. Hp Co., Francia, 13-15, 36-42.
- ✓ Hertog MGL, Hollman PCH y Katan MB. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonols of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem*; 40: 2379-2383.
- ✓ Kähkönen, Marja; Anu I. Copia and Marina Heinonen. 2001. Berry fenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 49, 4076 – 4082.
- ✓ Kliebenstein, D. J. 2004. Secondary metabolites and plant-environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana Tinged Glasses. *Plant, Cell and Environment* 27 (6): 675.
- ✓ Macheix, J., Fleuriet, A. and Billiot, J.1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fl. EUA.
- ✓ Madhavi D.V., Despande S.S., Salunkhe D.K. In *Food antioxidants*, (Ed.). Marcel Dekker, New York 1996, pp. 1.
- ✓ Markham, K.R. 1982. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press London.
- ✓ Martínez I, Periago M, Ros G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN*. 50 (1):5-18.
- ✓ Morales S. D. y Gallo R. L. E. 2006. *Plataformas de Proteomica*. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 10-13.
- ✓ Núñez C.E. 2008. Extracciones con equipo Soxhlet, extraído de la URL: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>



- ✓ Macheix, J.-J.; Fleurut, A.; Billot, J., 1990 Fruit Phenolics; CRC Press; Boca Raton, Florida,
- ✓ Proestos, C.; N. Chorianopoulos; G. J. E. Nychas and M. Komaitis. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53,1190-1195.
- ✓ Rojas R. M. T. 1985. La tecnología agrícola mesoamericana en el siglo XVI. In: *Historia de la Agricultura. Época Prehispánica-Siglo XVI. Colección Biblioteca del INAH, Tomo 1. México, D.F. pp: 129-231.*
- ✓ Reyes-Caudillo, A. Tecante, M.A. Valdivia-Lopez. 2007. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry* 107, 656–663
- ✓ Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2866-2887.
- ✓ Ryals, J., S Ukness, E. Ward. 1994. Systemic acquired-resistance. *Plant Physiology* 104:1109-1112.
- ✓ Sanchez M. C. 2002. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. *Biodisponibilidad y Metabolismo, alimentaria* pp 19-17.
- ✓ Sánchez-Paniagua López M. 2008. Biosensores amperometricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. Universidad Complutense de Madrid. pp 5-14.
- ✓ Singleton V L & Rossi J A Jr. 1995. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.
- ✓ Stoggl., WM., Huck, CW., Stecher, G., Bonn, GK., **2006**. *Electrophoresis.* 27, 787-792.
- ✓ Strack D., V. Wray. 1994. The Antocyanins. In: *The Flavonoids. Advances in Research Since 1986.* (Ed. Harborne, J. B). Chapman & Hall. London. .1-22.
- ✓ Taiz L., E. Zeiger. 1991. *Plant Physiology.* The Benjamin/Cummings Publishing California.



- ✓ Velioglu, Y.S., Mazza, G.; Gao, L. and B.D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 4113-4117.
- ✓ Watson, D. G. (2005). "Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists". Segunda edición, Ed. Elsevier, China

**ÍNDICE DE ILUSTRACIONES**

Ilustración 1. Semilla de chía .....	10
Ilustración 2. Flor de chía .....	11
Ilustración 3. Semilla de chía .....	12
Ilustración 4. Estructura básica de los flavonoides .....	14
Ilustración 5. Estructura general de las antocianinas .....	15
Ilustración 6. Estructura general de los Flavonoles .....	16
Ilustración 7. Estructura general de las flavonas .....	16
Ilustración 8. Estructura general de las flavanonas .....	17
Ilustración 9. Estructura general de los isoflavonoides .....	17
Ilustración 10. Estructura general de ácidos benzoicos .....	17
Ilustración 11. Estructura general de los ácidos hidroxicinámicos .....	18
Ilustración 12. Estructura general de los estilbenos .....	18
Ilustración 13. Formación de compuestos fenólicos a partir de la fenilalanina .....	20
Ilustración 14. Biosíntesis de Polifenoles .....	21
Ilustración 15. Esquema representativo de las partes básicas de un sistema de electroforesis capilar .....	23
Ilustración 16. Representación esquemática de una separación por electroforesis capilar ..	24
Ilustración 17. Formación de la doble capa eléctrica .....	27
Ilustración 18. Extractor soxhlet .....	30
Ilustración 19. Equipo de Electroforesis Capilar utilizado en este estudio .....	32
Ilustración 20. Diagrama lineal de zonas de predominio para vainillina, ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, kaempferol, miricetina, ácido cumárico, ácido vainillinico, quercetina, ácido cafeíco, ácido gálico en función del pH. ....	43
Ilustración 21. Electroferograma de la mezcla de 11 estándares. ....	44
Ilustración 22. Electroferograma de la mezcla de 11 estándares. ....	45
Ilustración 23. Electroferograma de la mezcla de 11 estándares. ....	45
Ilustración 24. Electroferograma obtenido de dos estándares y estándar interno a partir de un ciclo de lavado de 15 minutos entre corridas. ....	48
Ilustración 25. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 125H. ...	49
Ilustración 26. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 287H. ..	50
Ilustración 27. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 094H ...	51
Ilustración 28. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 301A ..	52
Ilustración 29. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chía 125A. ....	53
Ilustración 30. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla de chía 287A. ....	54
Ilustración 31. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla de chía 094A. ....	55
Ilustración 32. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla de chía 301A. ....	56
Ilustración 33. Electroferograma de la mezcla de 9 estándares y el estándar interno. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 51.9 cm de longitud total, D.I. 50 µm, buffer 55 mM, pH 9.4 inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 28 kv, polaridad normal del capilar, 22°C. ....	58



Ilustración 34. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 125H fortificado con ácido trans-cinámico miricetina, ácido p-cumárico y ácido gálico.....	76
Ilustración 35. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 287H fortificado con ácido clorogénico, miricetina, ácido cumárico, quercetina y ácido gálico.	76
Ilustración 36. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 094H fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico .....	77
Ilustración 37. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 301H fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vainillínico, quercetina, ácido cafeico y ácido gálico. ....	77
Ilustración 38. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chía 125A fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico. ....	78
Ilustración 39. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chía 094A fortificado con ácido trans-cinámico. ....	79
Ilustración 40. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chía 301A fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido vainillínico, ácido cafeico y ácido gálico .....	79
Ilustración 41. Curva de calibración ácido trans-cinámico y ecuación del modelo lineal obtenido .....	81
Ilustración 42. Curva de calibración de ácido clorogénico y la ecuación del modelo lineal obtenido. ....	82
Ilustración 43. Curva de calibración de ácido ferúlico y la ecuación del modelo lineal. ....	83
Ilustración 44 Curva de calibración de miricetina y la ecuación del modelo lineal obtenido. ....	84
Ilustración 45. Curva de calibración de ácido cumárico y la ecuación del modelo lineal obtenido. ....	85
Ilustración 46. Curva de calibración de ácido vainillínico y la ecuación del modelo lineal obtenido. ....	86
Ilustración 47. Curva de calibración de quercetina y la ecuación del modelo lineal obtenido. ....	87
Ilustración 48 Curva de calibración de quercetina y la ecuación del modelo lineal obtenido. ....	88
Ilustración 49. Curva de calibración de ácido gálico y la ecuación del modelo lineal obtenido. ....	89



**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Abreviaturas .....	5
Tabla 2. Clasificación Taxonómica .....	12
Tabla 3. Análisis proximal de la semilla de chía .....	13
Tabla 4. Punto de ebullición de solventes .....	30
Tabla 5. Codificación de las muestras de semilla de chía a estudiar .....	33
Tabla 6. Activación de los grupos silanol. ....	35
Tabla 7. Procedimiento de lavado del capilar al inicio de cada sesión .....	35
Tabla 8. Instrucciones del Método de separación de los polifenoles en el equipo P/ACE MDQ de Electroforesis Capilar .....	35
Tabla 9. Concentraciones en la curva de calibración .....	37
Tabla 10. Preparación de los sistemas para las curvas de calibración de los estándares.....	39
Tabla 11. Condiciones iniciales reportadas en el trabajo previo de Gonzalez-Jiménez (2001). ....	41
Tabla 12. Condiciones electroforéticas óptimas para el análisis de muestras .....	46
Tabla 13. Comparación de la repetibilidad en las áreas y alturas, en función del tiempo del lavado del capilar entre corridas. ....	47
Tabla 14. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 125H .....	49
Tabla 15. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 287H .....	50
Tabla 16. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 094H .....	51
Tabla 17. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 301H .....	52
Tabla 18. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 125A. ....	53
Tabla 19. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 287A. ....	54
Tabla 20. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 094 <sup>a</sup> .....	55
Tabla 21. Resultados de los tiempos de migración, áreas y alturas obtenidos de la semilla 301A. ....	56
Tabla 22. Identificación de compuestos fenólicos presentes en el extracto de aceite y semilla de chía por fortificación de las muestras con adición de estándar. ....	57
Tabla 23. Resumen de los parámetros de linealidad de las curvas de calibración de los estándares.....	59
Tabla 24. Concentración de compuestos fenólicos presentes en las diferentes especies de aceites y semilla de chía. ....	59

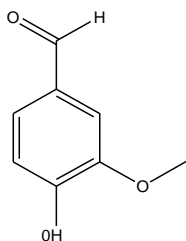


Tabla 25. Concentración de compuestos fenólicos presentes en las diferentes especies de aceites y semilla de chía. ....	60
Tabla 26. Contenido de fenoles totales en aceite y semilla de chía (mg/100g de muestra). 62	
Tabla 27. Relación de altura en función de la concentración obtenida para ácido trans-cinámico. ....	80
Tabla 28. Relación de área en función de la concentración obtenida para ácido clorogénico .....	81
Tabla 29. Relación de área en función de la concentración obtenida para ácido ferúlico... 82	
Tabla 30. Relación de la altura en función de la concentración obtenida para miricetina .. 83	
Tabla 31. Relación de área en función de la concentración obtenida para ácido cumárico 84	
Tabla 32. Relación de altura en función de la concentración obtenida para ácido vainillínico .....	85
Tabla 33. Relación de altura en función de la concentración obtenida para quercetina..... 86	
Tabla 34. Relación de área en función de la concentración obtenida para ácido cafeico ... 87	
Tabla 35. Relación de altura en función de la concentración obtenida para ácido gálico... 88	

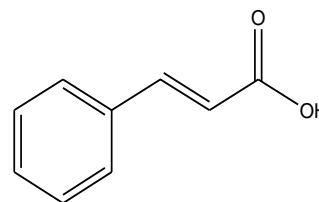


## ANEXO 1. Características de los compuestos químicos estudiados

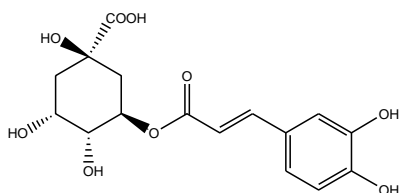
Nombre químico Vainillina  
Formula molecular  $C_8H_8O_3$   
Peso Molecular 152.15 g/mol  
Punto de fusión 81-83°C  
Punto de ebullición 170°C (15mmHg)  
pKa 7.78



Nombre químico ácido trans-cinámico  
Formula molecular  $C_9H_8O_2$   
Peso Molecular 148.16 g/mol  
Punto de fusión 132-135 °C  
pKa 3.88

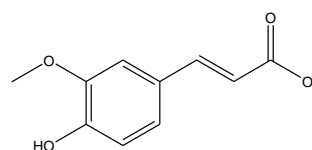


Nombre químico ácido clorogénico  
Formula molecular  $C_{16}H_{18}O_9$   
Peso Molecular 354.31 g/mol  
pKa 3.96, 8.44

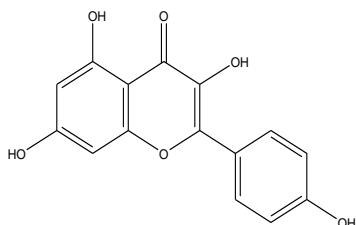


Nombre químico ácido ferúlico  
Formula molecular  $C_{10}H_{10}O_4$ 

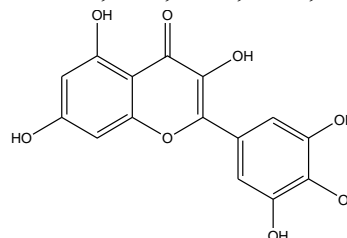
Peso Molecular 194.18g/mol  
Punto de fusión 168-172 °C  
pKa 4.04, 9.86



Nombre químico Kaempferol  
Formula molecular  $C_{15}H_{10}O_6$   
Peso Molecular 286.24 g/mol  
Punto de fusión 277 °C  
pKa 8.84, 9.17, 9.88, 10.44



Nombre químico Miricetina  
Formula molecular  $C_{15}H_{10}O_8$   
Peso Molecular 318.24 g/mol  
Punto de fusión > 300  
pKa 6.88,8.12, 8.94, 8.97,10.49,15.19





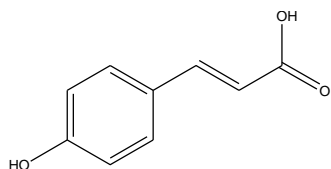
Nombre químico ácido p-cumarico

Formula molecular  $C_9H_8O_3$

Peso Molecular 164.16 g/mol

Punto de fusión  $214^{\circ}C$

Pka 4.10, 9.82



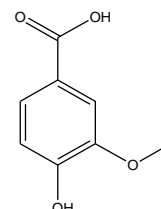
Nombre químico ácido vainillínico

Formula molecular  $C_9H_8O_3$

Peso Molecular 164.16 g/mol

Punto de fusión  $214^{\circ}C$

Pka 4.45, 9.27



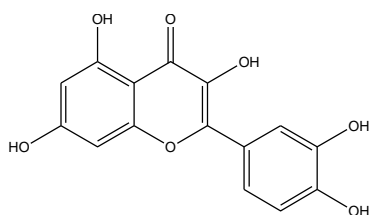
Nombre químico quercetina

Formula molecular  $C_{15}H_{10}O_8$

Peso Molecular 318.24 g/mol

Punto de fusión  $> 300$

pka 6.89, 8.13, 8.94, 9.49, 12.61



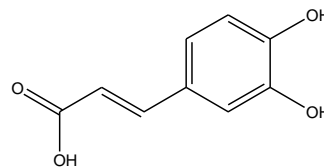
Nombre químico ácido cafeico

Formula molecular  $C_9H_8O_4$

Peso Molecular 180.16 g/mol

Punto de fusión  $211-213^{\circ}C$

pka 4.04, 9.69 y 12.71



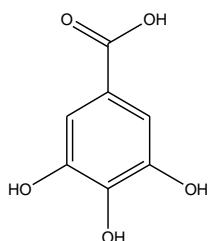
Nombre químico ácido gálico

Formula molecular  $C_7H_6O_5$

Peso Molecular 170.12 g/mol

Punto de fusión  $251^{\circ}C$

Pka 4.33, 8.95, 12.33, 14.43



## ANEXO 2. Electroferograma de las muestras fortificadas con adición del estándar a confirmar.

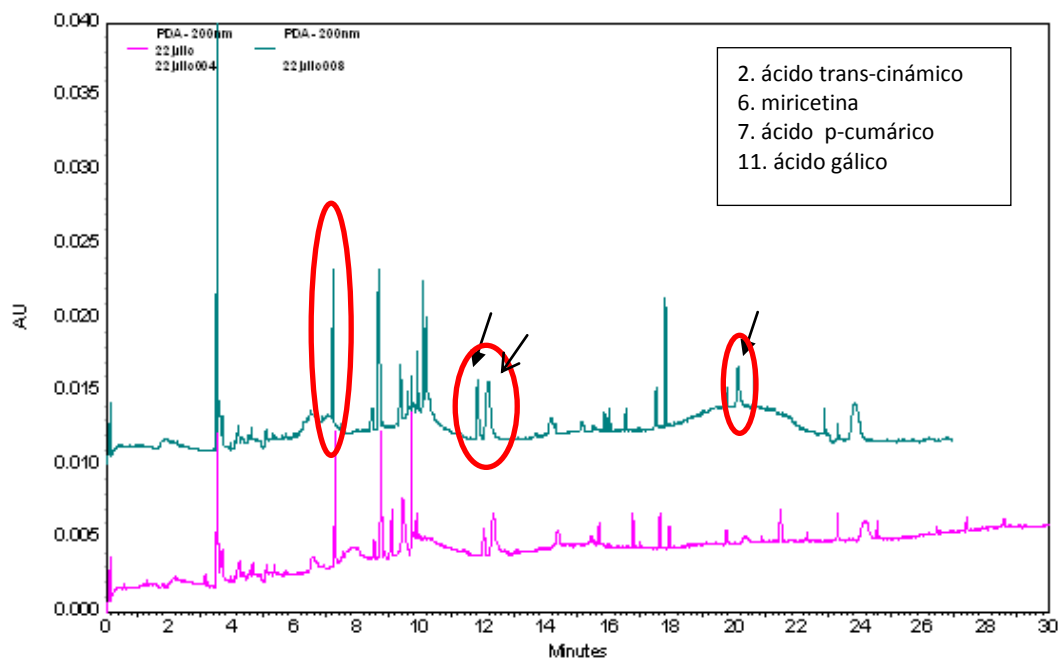


Ilustración 34. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 125H fortificado con ácido trans-cinámico, miricetina, ácido p-cumárico y ácido gálico.

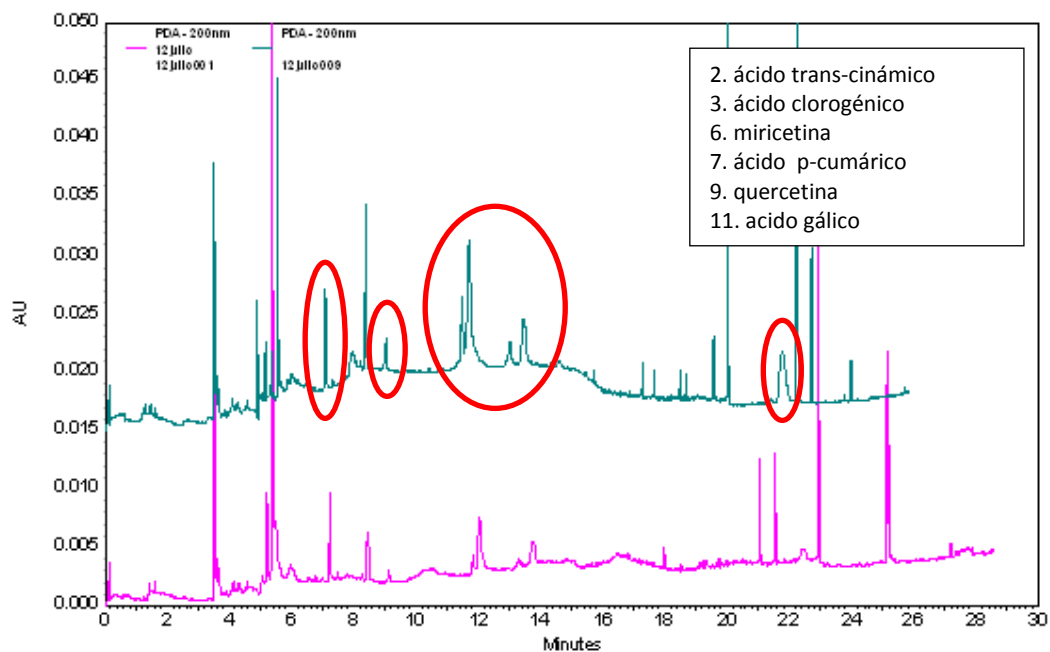


Ilustración 35. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 287H fortificado con ácido clorogénico, miricetina, ácido cumárico, quercetina y ácido gálico.

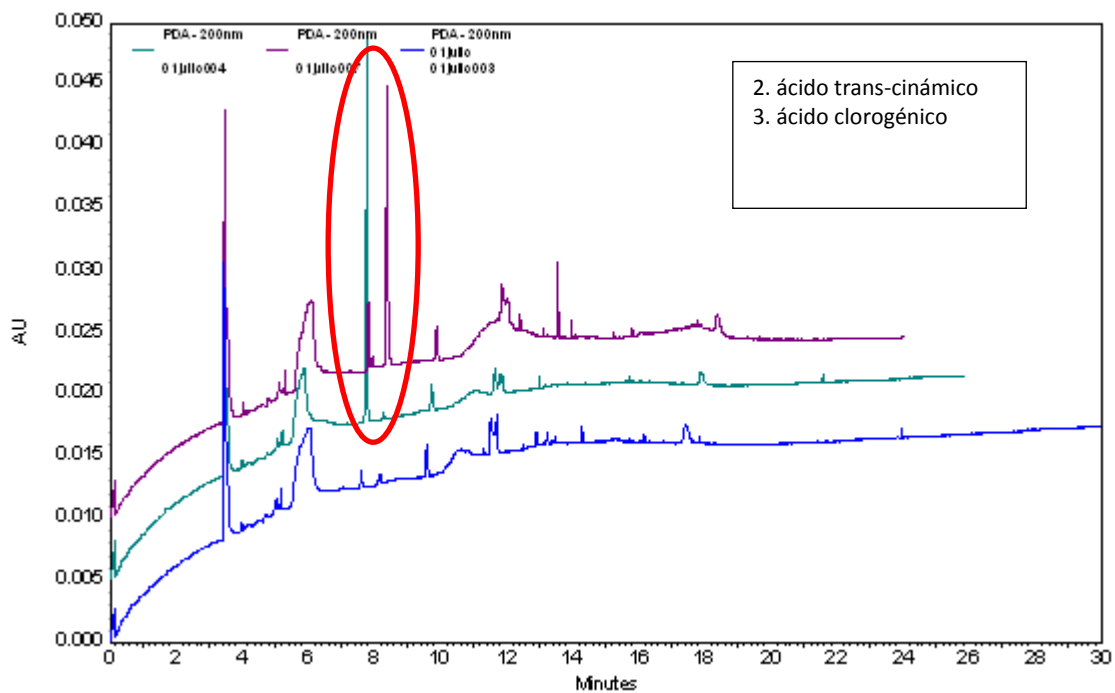


Ilustración 36. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 094H fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico

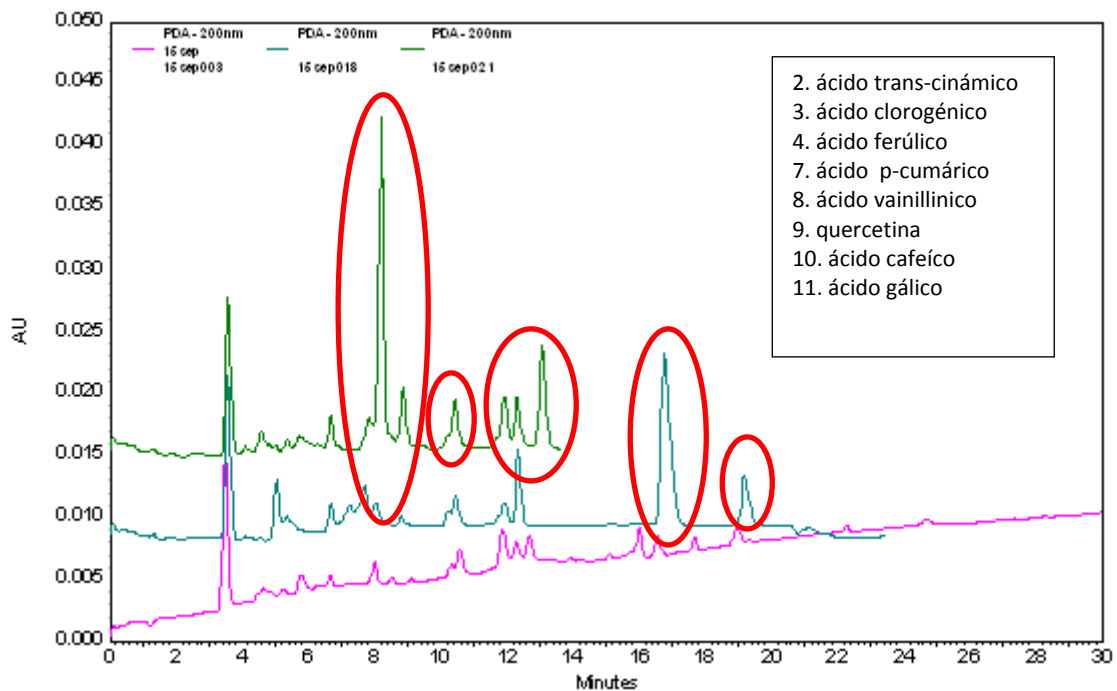


Ilustración 37. Electroferograma del extracto de la semilla de chía desengrasada 301H fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido vainillinico, quercetina, ácido cafeíco y ácido gálico.

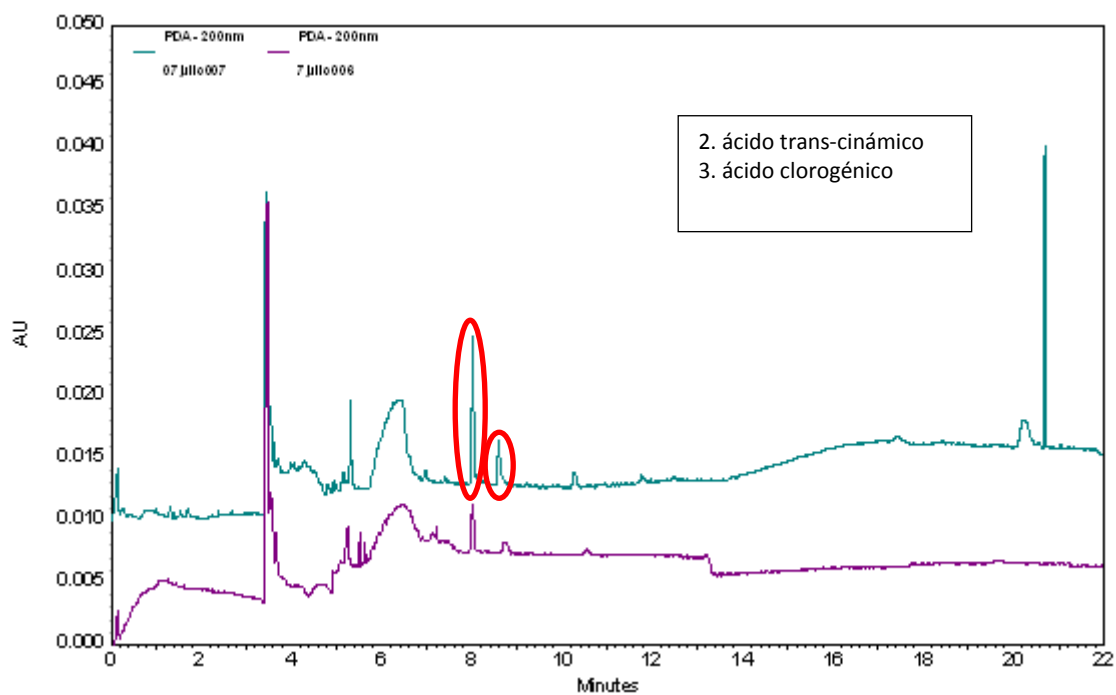


Ilustración 38. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chíá 125A fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico.

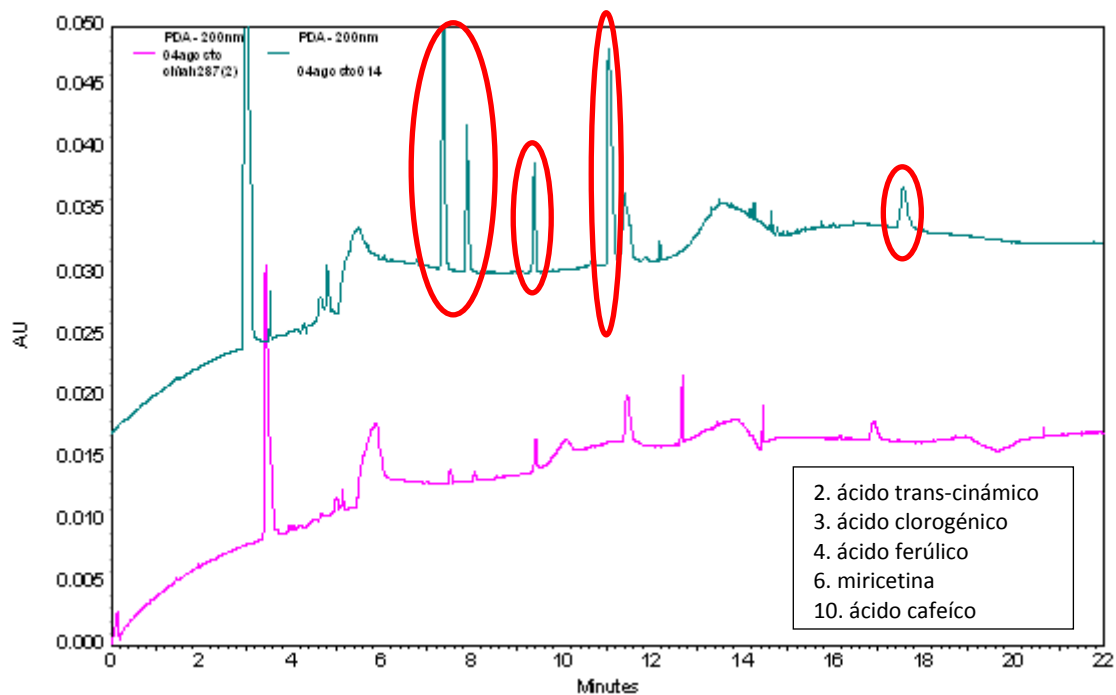


Ilustración 1. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chíá 287A fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, miricetina, ácido cafeíco.

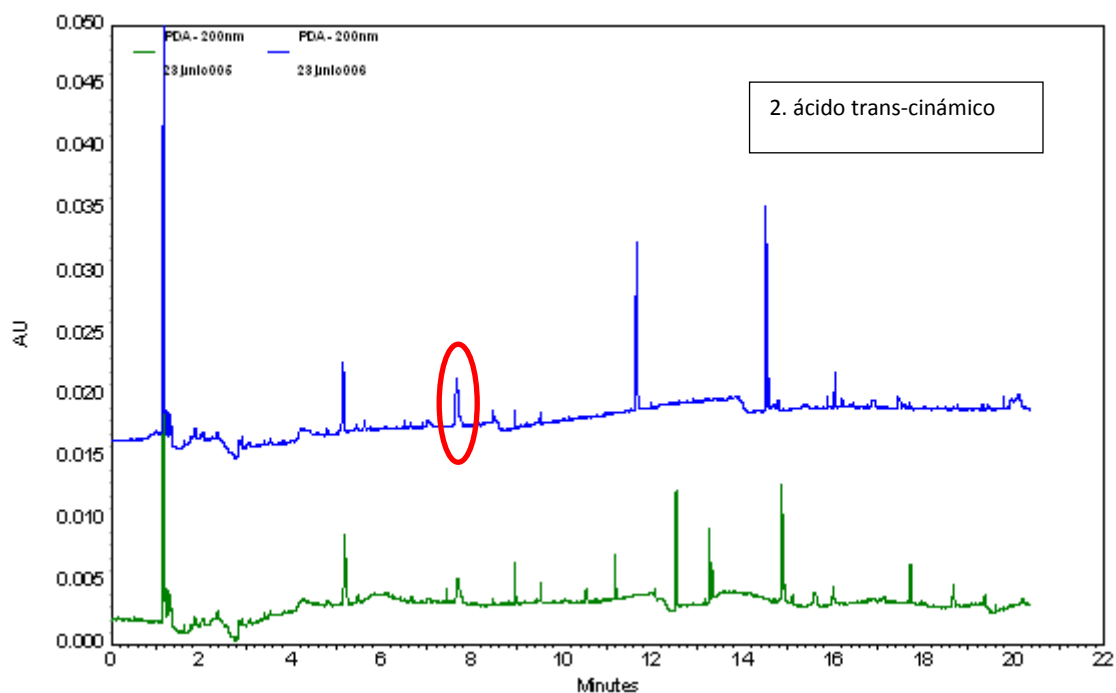


Ilustración 39. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chía 094A fortificado con ácido trans-cinámico.

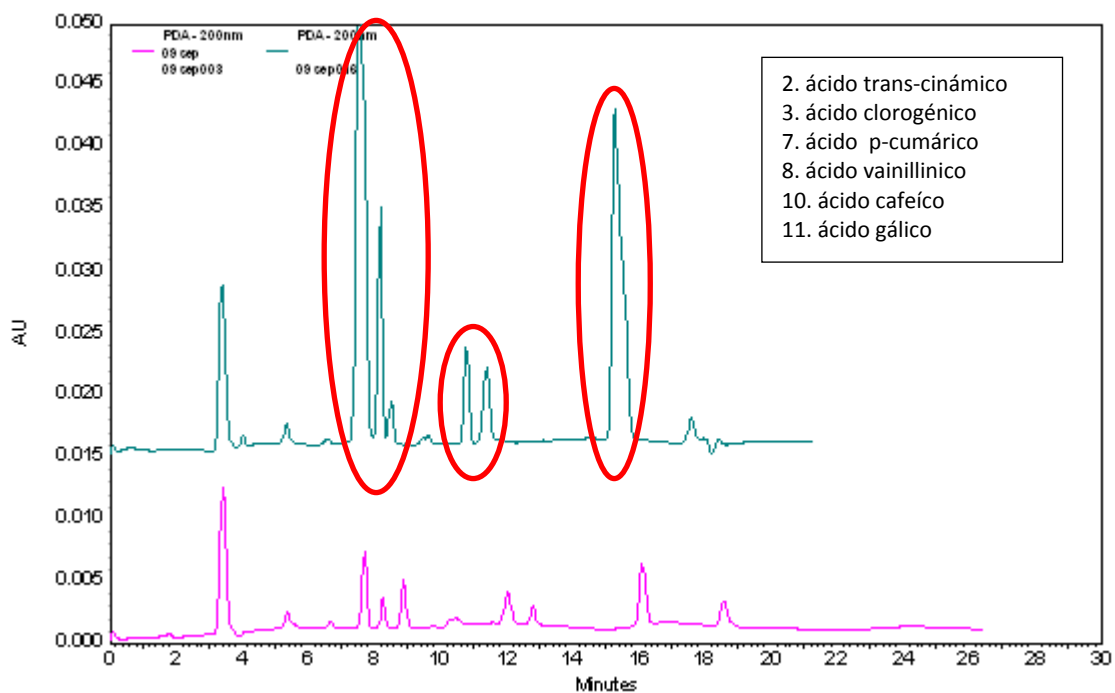


Ilustración 40. Electroferograma del extracto del aceite de la semilla chía 301A fortificado con ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido vainillínico, ácido cafeíco y ácido gálico





### ANEXO 3. Respuestas y curvas de calibración obtenidas para cada uno de los fenoles presentes en las muestras de chía.

Las Tablas 27 a 34 muestran los resultados de la medición de las curvas de calibración: expresados como relación de áreas y alturas en función de la concentración así como la ilustración de la curva obtenida.

**Tabla 27. Relación de altura en función de la concentración obtenida para ácido trans-cinámico.**

sistema	ácido trans-cinámico [mg/L]	altura ácido trans-cinámico/altura <sub>EI</sub>	C.V
1	10.2	0.1103	
1	10.2	0.1170	
1	10.2	0.1148	2.97
2	20.4	0.1694	
2	20.4	0.1641	
2	20.4	0.1597	2.97
3	40.08	0.2807	
3	40.08	0.2784	
3	40.08	0.2822	0.67
4	60.12	0.4425	
4	60.12	0.4413	
4	60.12	0.4538	1.54
5	100.2	0.6435	
5	100.2	0.6600	
5	100.2	0.6606	1.48
6	200.4	1.4303	
6	200.4	1.4037	
6	200.4	1.4409	1.35

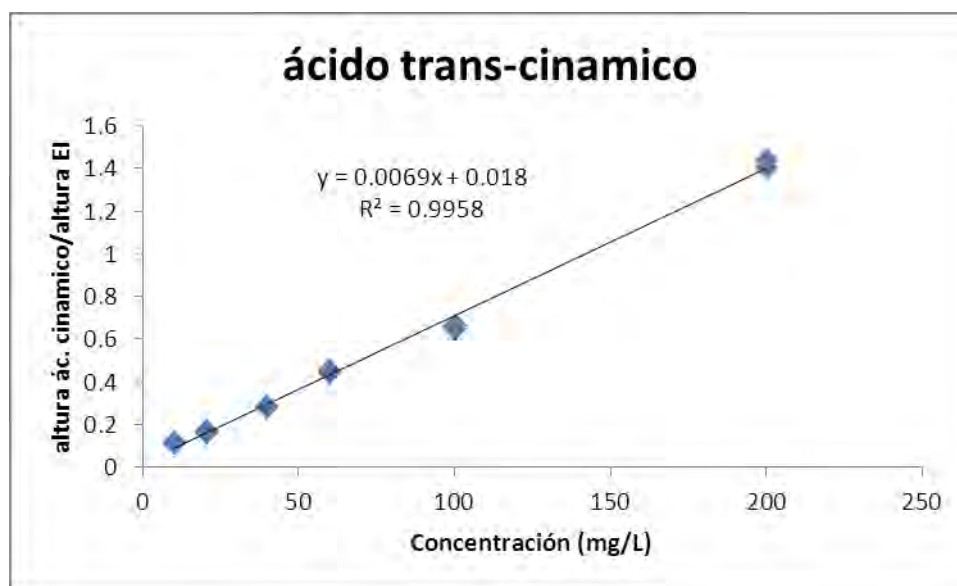


Ilustración 41. Curva de calibración ácido trans-cinámico y ecuación del modelo lineal obtenido

Tabla 28. Relación de área en función de la concentración obtenida para ácido clorogénico

sistema	ácido clorogénico [mg/L]	área ácido clorogénico/área EI	CV
1	10.2	0.1066	
1	10.2	0.1080	
1	10.2	0.1020	2.97
2	20.4	0.0927	
2	20.4	0.0941	
2	20.4	0.0892	2.76
3	40.08	0.1672	
3	40.08	0.1662	
3	40.08	0.1595	2.55
4	60.12	0.2443	
4	60.12	0.2400	
4	60.12	0.2421	0.90
5	100.2	0.4010	
5	100.2	0.4049	
5	100.2	0.4140	1.64
6	200.4	0.8561	
6	200.4	0.8421	
6	200.4	0.8700	1.63

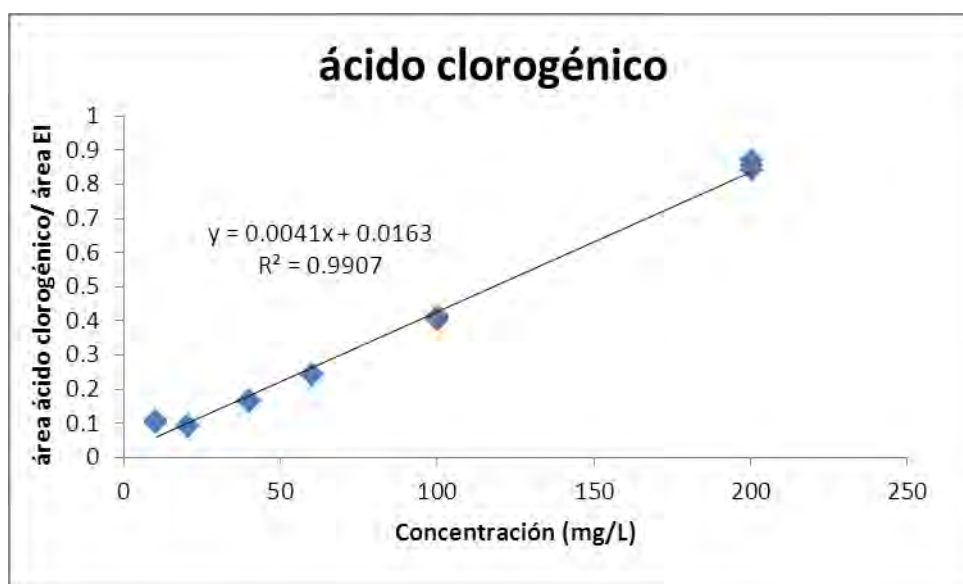


Ilustración 42. Curva de calibración de ácido clorogénico y la ecuación del modelo lineal obtenido.

Tabla 29. Relación de área en función de la concentración obtenida para ácido ferúlico

Sistema	ácido ferúlico [mg/L]	área ácido ferúlico/área EI	CV
1	4.025	0.0640	
1	4.025	0.0664	
1	4.025	0.0577	0.07
2	8.05	0.1014	
2	8.05	0.1047	
2	8.05	0.0986	0.10
3	16.1	0.3813	
3	16.1	0.3600	
3	16.1	0.3711	0.24
4	24.15	0.5587	
4	24.15	0.5415	
4	24.15	0.5435	0.41
5	32.2	0.7484	
5	32.2	0.7471	
5	32.2	0.7487	0.50
6	48.3	1.2487	
6	48.3	1.2186	
6	48.3	1.1764	0.76

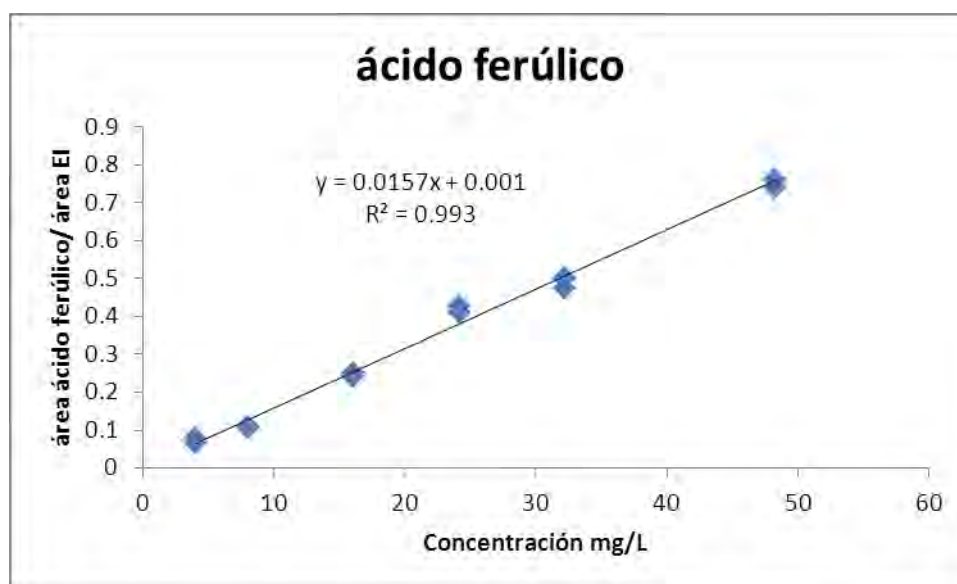


Ilustración 43. Curva de calibración de ácido ferúlico y la ecuación del modelo lineal.

Tabla 30. Relación de la altura en función de la concentración obtenida para miricetina

Sistema	miricetina [mg/L]	altura <sub>miricetina</sub> /altura <sub>EI</sub>	CV
1	3.775	0.0364	
1	3.775	0.0374	
1	3.775	0.0353	2.83
2	7.55	0.0754	
2	7.55	0.0769	
2	7.55	0.0726	2.93
3	15.1	0.2133	
3	15.1	0.2061	
3	15.1	0.2135	1.99
4	22.65	0.3118	
4	22.65	0.3262	
4	22.65	0.3116	2.65
5	30.2	0.4230	
5	30.2	0.4444	
5	30.2	0.4464	2.96
6	45.3	0.5931	
6	45.3	0.6072	
6	45.3	0.6005	1.18

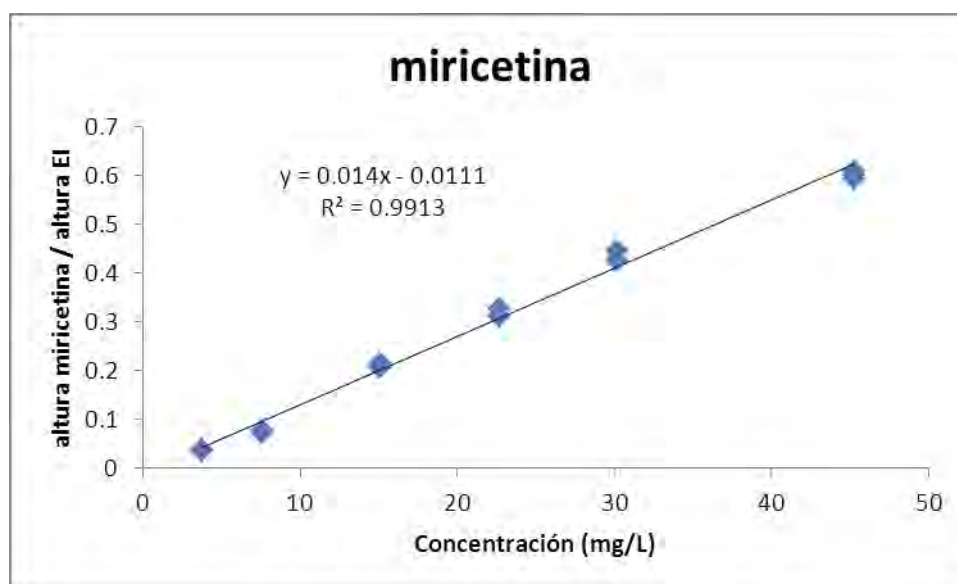


Ilustración 44 Curva de calibración de miricetina y la ecuación del modelo lineal obtenido.

Tabla 31. Relación de área en función de la concentración obtenida para ácido cumárico

sistema	ácido cumárico [mg/L]	área <sub>cumárico</sub> /área <sub>EI</sub>	CV
1	2.025	0.0640	
1	2.025	0.0664	
1	2.025	0.0577	2.76
2	4.05	0.1014	
2	4.05	0.1047	
2	4.05	0.0986	2.99
3	8.1	0.3813	
3	8.1	0.3600	
3	8.1	0.3711	2.87
4	12.15	0.5587	
4	12.15	0.5415	
4	12.15	0.5435	1.72
5	16.2	0.7484	
5	16.2	0.7471	
5	16.2	0.7487	0.12
6	28.35	1.2487	
6	28.35	1.2186	
6	28.35	1.1764	2.99

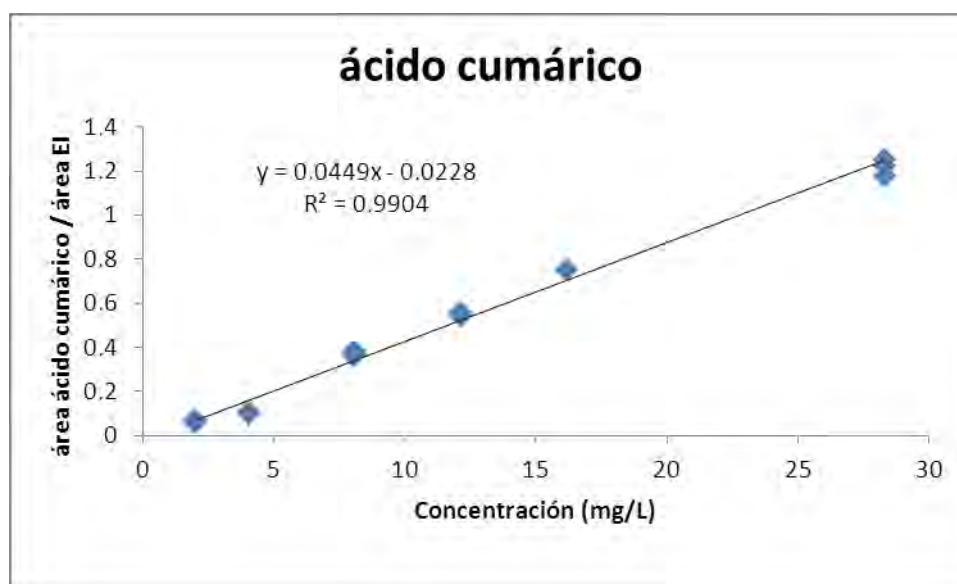


Ilustración 45. Curva de calibración de ácido cumárico y la ecuación del modelo lineal obtenido.

**Tabla 32. Relación de altura en función de la concentración obtenida para ácido vainillínico**

sistema	ácido vainillínico [mg/L]	altura ácido vainillínico/altura <sub>EI</sub>	CV
1	2.025	0.0557	
1	2.025	0.0583	
1	2.025	0.0556	2.72
2	4.05	0.1102	
2	4.05	0.1131	
2	4.05	0.1069	2.85
3	8.1	0.1523	
3	8.1	0.1607	
3	8.1	0.1599	2.93
4	12.15	0.2837	
4	12.15	0.3002	
4	12.15	0.2894	2.88
5	16.2	0.4066	
5	16.2	0.3972	
5	16.2	0.4047	1.23
6	24.3	0.5709	
6	24.3	0.5621	
6	24.3	0.5831	1.85

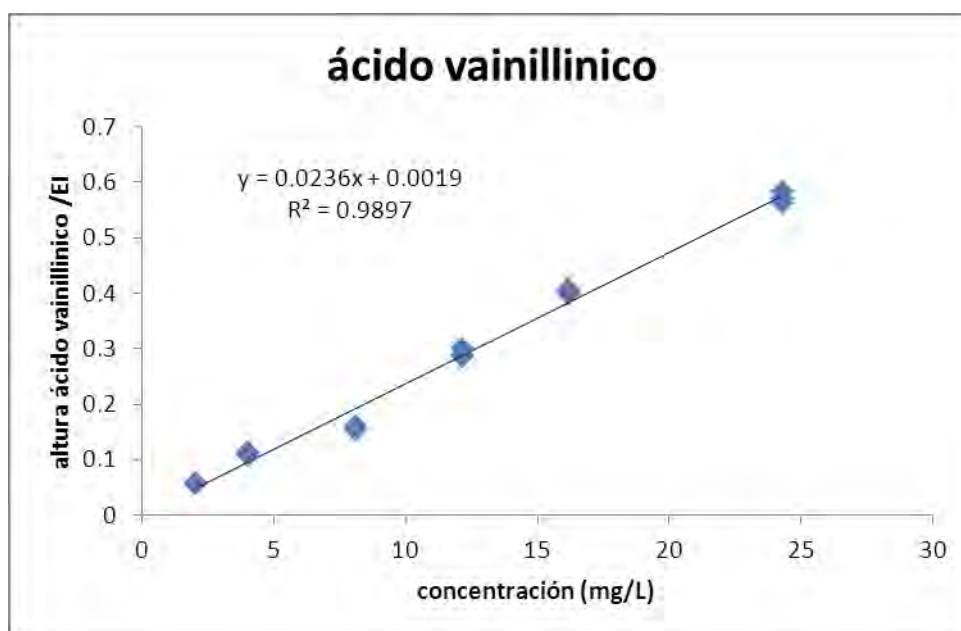


Ilustración 46. Curva de calibración de ácido vainillínico y la ecuación del modelo lineal obtenido.

**Tabla 33. Relación de altura en función de la concentración obtenida para quercetina**

sistema	quercetina [mg/L]	altura quercetina/altura EI	CV
1	2.775	0.0428	
1	2.775	0.0409	
1	2.775	0.0406	2.82
2	5.55	0.0908	
2	5.55	0.0928	
2	5.55	0.0881	2.59
3	11.1	0.1884	
3	11.1	0.1872	
3	11.1	0.1800	2.45
4	16.65	0.2744	
4	16.65	0.2842	
4	16.65	0.2839	1.99
5	22.2	0.3740	
5	22.2	0.3670	
5	22.2	0.3746	1.15
6	33.3	0.5407	
6	33.3	0.5382	
6	33.3	0.5313	0.91

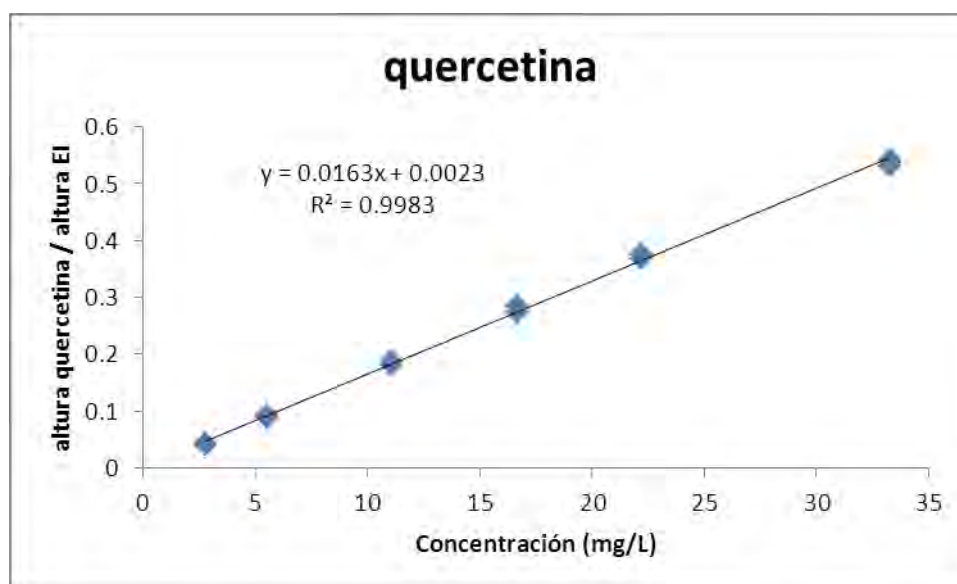


Ilustración 47. Curva de calibración de quercetina y la ecuación del modelo lineal obtenido.

Tabla 34. Relación de área en función de la concentración obtenida para ácido cafeico

sistema	ácido cafeico [mg/L]	área ácido cafeico/área EI	CV
1	29	0.1255	
1	29	0.1296	
1	29	0.1224	2.86
2	58	0.1556	
2	58	0.1593	
2	58	0.1504	2.90
3	116	0.4276	
3	116	0.4123	
3	116	0.4134	2.05
4	174	0.6800	
4	174	0.6498	
4	174	0.6569	2.38
5	232	0.8756	
5	232	0.8911	
5	232	0.9046	1.63
6	290	1.1254	
6	290	1.1097	
6	290	1.0810	2.04



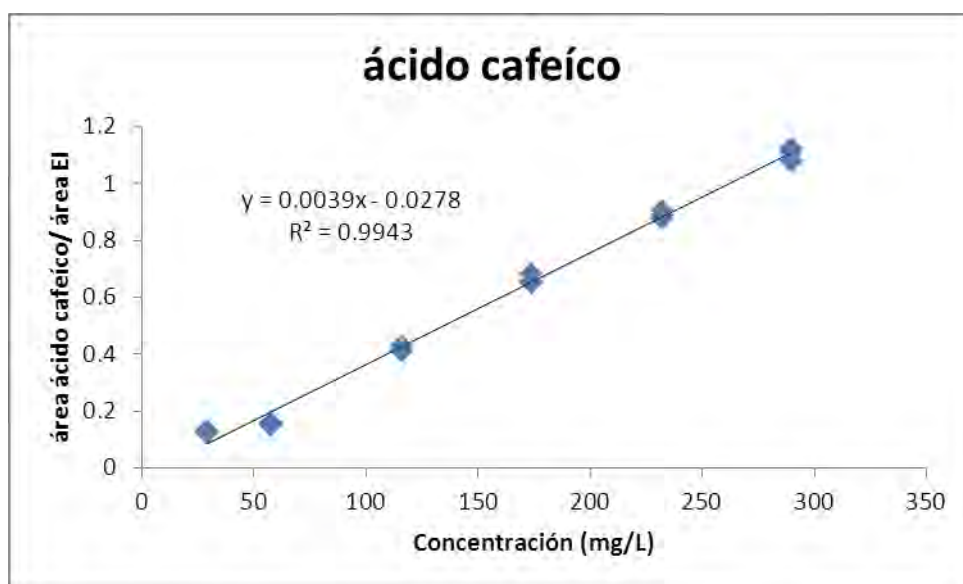


Ilustración 48 Curva de calibración de quercetina y la ecuación del modelo lineal obtenido.

Tabla 35. Relación de altura en función de la concentración obtenida para ácido gálico.

Sistema	ácido gálico [mg/L]	área ácido gálico/área EI	CV
1	29	0.1249	
1	29	0.1279	
1	29	0.1053	1.80
2	58	0.1681	
2	58	0.1678	
2	58	0.1606	2.57
3	116	0.3432	
3	116	0.3286	
3	116	0.3386	2.22
4	174	0.5382	
4	174	0.5258	
4	174	0.5124	2.45
5	232	0.7385	
5	232	0.7566	
5	232	0.7280	1.95
6	290	0.9917	
6	290	0.9847	
6	290	0.9802	0.59

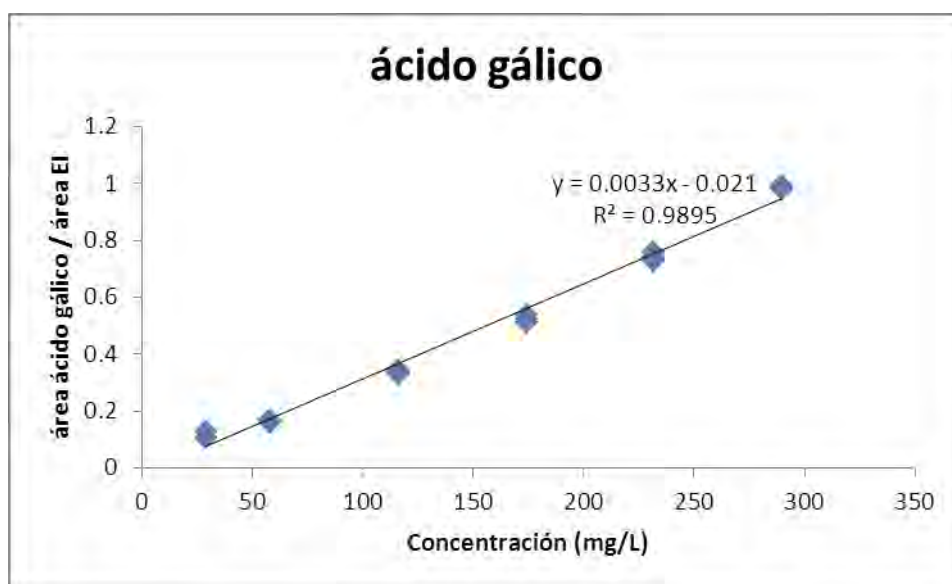


Ilustración 49. Curva de calibración de ácido gálico y la ecuación del modelo lineal obtenido.