

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispánica L.*).

Ortega Villarreal A.S.* , López Hernández A.A., González-Martínez B.E.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Laboratorio de Alimentos (CINSP), Av. Dr. Aguirre Pequeño y Yuriria, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L., México.*ana_sofia1018@hotmail.com

RESUMEN:

La semilla de chía (*Salvia hispánica L.*) es considerada alimento funcional debido a su contenido de compuestos bioactivos. El objetivo de este estudio fue determinar el contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos alcohólicos de semilla de chía cultivada en el estado de Jalisco, México. Se realizaron extracciones metanólicas y etanólicas. Los polifenoles totales y flavonoides fueron cuantificados como equivalentes de ácido galico y como porcentaje de quercetina, respectivamente. Los compuestos fenólicos: ácido cafeico, ácido clorogénico, miricetina, quercetina y kaempferol, se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tanto para la forma libre de los antioxidantes (agliconas), como para los conjugados con azúcar (glicósidos), mediante una hidrólisis ácida. El extracto metanólico presentó la mayor cantidad de flavonoides y el etanólico de polifenoles totales. Se encontraron polifenoles en forma de agliconas y glicósidos. Los ácidos clorogénico y cafeico se encontraron en forma libre, mientras que la mayor parte de los flavonoles (miricetina, kaempferol y quercetina) fueron encontrados en forma de glicósido en los extractos. De acuerdo con lo anterior, la chía puede ser considerada como un buen componente de la dieta ya que presenta alto contenido de compuestos fenólicos.

ABSTRACT:

Chia seed (*Salvia hispánica L.*) is considered as a functional food due to its bioactive compounds content. The aim of this study was to determine the phenolic compounds content in alcoholic extracts of chia seed grown in Jalisco, Mexico. Methanolic and ethanolic extractions were obtained. Total phenolic and flavonoids content of extracts were assessed as gallic acid equivalents and quercetin percent, respectively. Phenolic compounds: caffeic acid, chlorogenic acid, myricetin, quercetin and kaempferol were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) for both free antioxidant form (aglycones) and sugar conjugated form (glycosides); an acid hydrolysis was effected. Methanolic extract exhibited the greater amount of flavonoids and ethanolic extract, of total polyphenols. Polyphenols were found as aglycones and as glycosides. Chlorogenic and caffeic acid were found in free form, while most of flavonols (myricetin, kaempferol and quercetin) were found as glycosides in extracts. According to above, chia may be considered as a good dietary component due to its high content of phenolic compounds.

Palabras clave:

Chía, HPLC, Antioxidantes

Keyword:

Chia, HPLC, Antioxidants

Área: Nutrición y nutraceuticos

INTRODUCCIÓN

Debido al creciente interés y preocupación de la salud pública a nivel mundial, la demanda de alimentos funcionales y nutraceuticos ha ido en aumento. El deseo por la salud y el bienestar han ocasionado el posicionamiento en el mercado de alimentos con alto contenido de compuestos bioactivos que proporcionen un bien para la salud (Crowe and Francis, 2013). Dentro de los compuestos de mayor importancia con actividad biológica se encuentran los antioxidantes. En general, su actividad se ve incrementada cuando existen grupos hidroxilo o

grupos donadores de hidrógeno en la estructura molecular del compuesto. Los polifenoles y los flavonoides son moléculas que poseen estas características e interfieren con el proceso de oxidación al reaccionar con radicales libres y a su vez, quelan metales catalíticos y capturan el oxígeno (Cedillo, 2006).

El consumo de fitoquímicos con propiedades antioxidantes incluidos en la dieta, además de aportar nutrientes esenciales para el buen funcionamiento de las actividades metabólicas, tiene también un efecto benéfico a mediano y largo plazo en la prevención de enfermedades coronarias y neoplásicas (Drago *et al.*, 2006).

La semilla de chía (*Salvia hispánica L.*) es uno de los alimentos autóctonos de México presente en la dieta desde épocas prehispánicas, incluido por sus múltiples beneficios para la salud, por lo tanto es considerado como un alimento funcional (Ayerza and Coates, 2009). Debido a que la eficacia y seguridad de los productos naturales debe ser validada por investigaciones científicas, en los últimos años han ido en aumento los trabajos científicos informando sobre las ventajas nutricionales de la chía sobre las otras fuentes de ω -3, sus propiedades y la comercialización de productos que la incluyen alrededor del mundo (Mohd *et al.*, 2012).

El presente trabajo aportará más información sobre los compuestos antioxidantes presentes en la semilla de chía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La semilla de chía utilizada fue cultivada y comercializada por una empresa del estado de Jalisco, México y fue adquirida en supermercados del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Se analizaron tres lotes diferentes de las muestras por triplicado.

Obtención de extractos metanólico y etanólico de semilla de chía

La semilla se dejó secar en un horno marca Felisa modelo FE-292D a 40° C durante 24 horas, posteriormente fue pulverizada por acción mecánica. Los extractos se elaboraron con 50 g de chía en 250 ml de metanol o etanol y se dejaron en maceración con agitación constante a 250 rpm durante 72 horas a 27° C (Incubadora Shel Lab Modelo 1575). Se filtraron mediante vacío y se llevaron a concentración en un rotavapor (Hanhvapor Mod: HS-2001 NS) (González, 2011).

Determinación de flavonoides expresados como porcentaje de quercetina

Se desarrolló de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Kostennikova (1983) el cual consistió en la comparación de los flavonoides contenidos en la muestra utilizando la quercetina (Sigma-Aldrich) como flavonoide de referencia.

Determinación de polifenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico

Se llevó a cabo de acuerdo al método 952.03 descrito por la AOAC (Association Of Analytical Chemists, 2000) basado en la cuantificación espectrofotométrica de polifenoles totales de la muestra, utilizando una curva de calibración de ácido gálico usado como referencia.

Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC

Escisión hidrolítica de glicósidos

Se siguió la metodología presentada por Taga *et al.*, (1984) que se basa en la hidrólisis ácida de los glicósidos y la extracción de las agliconas con éter dietílico, las cuales son evaporadas a sequedad. El residuo fue resuspendido en 1 ml de metanol 70 % grado HPLC (FERMONT), para su posterior análisis.

Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC

Se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de la marca Thermo Scientific provisto con detector UV/visible fijado en 350 nm y una columna Purospher Star RP-C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm) Merck.

Se empleó la técnica descrita por Hempel and Bohm (1996) realizando algunas modificaciones en el gradiente de elución, el flujo y el pH de la fase móvil. Se utilizaron los estándares: ácido cafeico, ácido clorogénico, miricetina, kaempferol y quercetina (Sigma-Aldrich). Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes: fase móvil: A) agua-ácido acético (98:2) (FERMONT); B) acetonitrilo (TEDIA) grado HPLC; el gradiente fue 90 % a 55 % de A y 10 % a 45 % de B en 3 minutos y 55 % a 90 % de A y 45 % a 10 % de B en 17 minutos; el flujo fue de 1ml/min. Las soluciones estándar y los extractos fueron filtrados con un filtro de 0.45 µm.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva, utilizando medidas de tendencia central (media) y medidas de dispersión (desviación estándar). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los datos obtenidos de la cuantificación de compuestos fenólicos, para comparar las concentraciones de los diferentes extractos.

RESULTADOS

Cuantificación de flavonoides y polifenoles totales

Se encontró diferencia significativa en el contenido de flavonoides en los extractos; la mayor concentración fue observada en el extracto metanólico con 60.49 % de quercetina. En cuanto al contenido de polifenoles totales también se encontraron diferencias significativas. El extracto etanólico presentó la mayor concentración con 1.33 mg/100 ml de equivalente de ácido gálico (Tabla I).

Tabla I. Contenido de flavonoides y polifenoles totales en extractos de semilla de chía

Extracto	mg/100 ml de ácido gálico	Porcentaje de quercetina (%)
Etanólico	1.33 ± 0.0002 ^a	28.89 ± 0.02 ^a
Metanólico	1.08 ± 0.0003 ^b	60.49 ± 0.05 ^b

N= Tres muestras independientes analizadas por triplicado

Los superíndices indican diferencias significativas (p<0.05)

Cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC

Se observó la presencia de polifenoles en forma libre (agliconas) y unidos a azúcares (glicósidos), por lo cual se cuantificaron previamente y después de realizar una hidrólisis con el fin de romper la unión. Se encontró de forma libre el ácido cafeico seguido del ácido clorogénico,

principalmente en los extractos sin hidrolizar. Posterior a la hidrólisis de los glicósidos se encontraron: miricetina, kaempferol y quercetina (Tabla II).

Tabla II. Contenido de antioxidantes en extractos de chía (mg/g)

Extracto	Ácidos hidroxicinámicos		Miricetina	Flavonoles		
	Ac. cafeico	Ac. clorogénico		Quercetina	Kaempferol	
No hidrolizado	Etanólica	15.15 ± 2.61 ^a	3.65 ± 1.00 ^a	0.40 ± 0.34 ^a	<0.0005	<0.0006
	Metanólica	34.74 ± 5.91 ^b	5.01 ± 1.68 ^b	0.24 ± 0.22 ^a	<0.0005	<0.0006
Hidrolizado	Etanólica	46.49 ± 8.65 ^a	0.59 ± 0.00 ^b	27.02 ± 14.00 ^b	15.71 ± 2.09 ^a	1.59 ± 0.91 ^a
	Metanólica	40.60 ± 05.92 ^a	0.10 ± 0.18 ^a	12.15 ± 8.91 ^a	27.07 ± 11.48 ^a	2.77 ± 1.21 ^a

N= Tres muestras independientes analizadas por triplicado. Los superíndices indican diferencias significativas en cada columna (p<0.05)

DISCUSIÓN

Cuantificación de flavonoides y polifenoles totales

La cuantificación de flavonoides expresado como porcentaje de quercetina ha sido descrita por Mota (2012), quien reportó concentraciones de flavonoides en extracto metanólico de chía con valores cinco veces menores a los encontrados en el presente estudio. Estas diferencias pueden deberse a numerosos factores como la exposición a la luz y los periodos prolongados de almacenamiento, los cuales pueden afectar el contenido de flavonoides debido a que se oxidan fácilmente, como pudiera ocurrir en la semilla de chía que es de cultivo anual. El grado de madurez también modifica la concentración de polifenoles, disminuyendo su proporción durante el proceso (Manach *et al.*, 2004).

Reyes-Caudillo *et al.*, (2007) cuantificó polifenoles totales en extracto etanólico de chía proveniente de Jalisco y Sinaloa, reportando concentraciones de 0.921 ± 0.040 y 0.881 ± 0.008 mg/100ml de ácido gálico, respectivamente. La chía analizada en el presente estudio contiene un 43 % y un 50 % más de estos compuestos.

Caracterización parcial de los principales compuestos fenólicos en extractos de semilla de chía mediante HPLC

La cuantificación e identificación de los diferentes compuestos fenólicos en semilla de chía ha sido reportada por otros autores con variaciones significativas en los resultados. Reyes-Caudillo *et al.*, (2007), cuantificaron mediante HPLC, mientras que Taga *et al.*, (1984) reportaron concentraciones de estos compuestos utilizando cromatografía de capa fina (TLC). Ambos autores reportaron la cuantificación de compuestos fenólicos antes y después de una hidrólisis ácida con el fin de obtener el máximo rendimiento de las agliconas. En todos los casos, las concentraciones obtenidas en el presente estudio superan a las mencionadas por otros autores. Es importante resaltar que Taga *et al.*, (1984) utilizaron un método de TLC, por lo que los valores inferiores pueden ser debidos a la baja sensibilidad del método usado; la diferencia entre los

resultados también puede ser atribuida a la variedad de la semilla, las condiciones de cultivo y las propiedades del suelo.

A pesar de la información existente acerca de las propiedades de los antioxidantes, aún no han sido establecidos valores de recomendación de compuestos fenólicos. La empresa certificadora de alimentos antioxidantes SCS Global Services sugirió en el año 2000 un aporte de 500 mg/día para mantener un nivel óptimo de antioxidantes. Hertog *et al.*, (1993) calcularon la ingesta diaria promedio de 23 mg de flavonoides en población holandesa. Tomando en cuenta los resultados del presente estudio, se estima que la semilla de chía posee una concentración de compuestos fenólicos de 91.4 ± 25.65 mg/g.

CONCLUSIONES

La mayor parte de los flavonoles fueron encontrados en forma de glicósidos, el tratamiento de hidrólisis aumentó el contenido de miricetina, kaempferol y quercetina por la liberación de sus agliconas, indicando que solo una fracción de los flavonoles se encontraba en forma libre.

El extracto etanólico con hidrólisis presentó la mayor concentración de miricetina y ácido cafeico.

El extracto metanólico presentó antes de su hidrólisis la mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico y ácido cafeico).

Se estima que el consumo de 5 g de semilla de chía aporta una concentración de compuestos fenólicos equivalente al 91 % de las recomendaciones establecidas por la empresa de alimentos SCS Global Services. De acuerdo a lo anterior, la chía puede ser considerada como un buen componente de la dieta ya que presenta un alto contenido de compuestos fenólicos los cuales pueden ser benéficos para la salud.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC Association of Official Analytical Chemists. 2000. Método oficial. 952.03. Determinación de Polifenoles. Official methods of analysis of AOAC International (17a ed). Estados Unidos de América: AOAC, International.
- Ayerza R, Coates W. 2009. Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica L.*) selections. *Industrial Crops and Products* 30:321-324.
- Cedillo C. 2006. Identificación de los compuestos fenólicos en el *capulín prunus* (serotonina) EHRH y evaluación de su capacidad antioxidante y estabilidad en mermeladas. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Distrito Federal, México.
- Crowe K, Francis C. 2013. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 113(8):1096-1103.
- Drago M, López M, Saíenz T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37:58-68.

- González V. 2011. Efecto hipotensor e inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I de extractos de semillas de *Salvia hispánica L.* *in vitro* e *in vivo*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Hempel J, Bohm H. 1996. Quality and quantity of prevailing flavonoid glycosides of yellow and green french beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(8):2114-2116.
- Hertog L, Hollman H, Van de Putte B. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41(8):1242-1246.
- Kostennikova Z. 1983. UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya* 33(6):83-86.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition* 79(1):727-747.
- Mohd N, Keong S, Yong W, Kee B, Wei S, Guan S. 2012. The promising future of chia, *Salvia hispánica L.* *Journal of Biomedicine and Biotechnology* ID:171956.
- Mota J. 2012. Determinación del efecto vasorelajador del extracto metanólico de *Salvia hispánica L.* en anillos aislados de aorta en ratas. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Monterrey, México.
- Reyes-Caudillo E, Tecante A, Valdivia-López M. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispánica L.*) seeds. *Food Chemistry* 10:656-663.
- SCS Global Services. 2000. Certificación Antioxidant Superfoods (online). Disponible en: http://www.scsglobalservices.com/files/brochures/COM_FA_INF_Antioxidant_V1-0_020513_ESP.pdf
- Taga M, Miller E, Pratt D. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 61(5):928-931.