

ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLICS COMPOUNDS FROM CHIA (*Salvia hispanica* L.) SEEDS AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE SEMILLAS DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Edith Corona-Jiménez¹, Nuria Martínez-Navarrete², Héctor Ruiz-Espinosa¹, José Carranza-Concha^{3*}

¹Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Avenida San Claudio y 18 Sur. C.P. 72570. Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla, Mexico. ²Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camí de Vera s/n, E46022 Valencia, Spain. ³Departamento de Nutrición, Universidad Autónoma de Zacatecas, Carretera Zacatecas-Guadalajara Km. 6, Ejido "La Escondida", Zacatecas, Zacatecas. C.P. 98160, Mexico. (joseconcha10@hotmail.com).

ABSTRACT

Extraction of phenolic compounds from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds using two solvents (methanol and n-hexane) was performed with or without high intensity ultrasound assistance. Conventional solid-liquid extraction and ultrasonic-assisted extraction at 50, 75 and 100 % of maximum power (400 W) were performed using chia seeds mixed with solvent (1:10 w/v) at three extraction times (5, 10 and 15 min). The highest phenolic concentration and the best antioxidant capacity were obtained using methanol as extraction solvent for both methods. When using the regular procedure, higher phenolic contents in both methanol and hexane, extracts were obtained at shorter extraction times, whereas antioxidant capacity increased with time. Efficiency of ultrasound-assisted extraction of phenolics increased with time and power output. Methanolic extracts obtained at the maximum power (100 %, 15 min) did not exhibit the best antioxidant capacity. The ultrasound-assisted process showed better extraction ability than conventional methods, which means that the extraction yield of phenolic compounds from chia seeds increased. This increase may lead to a wider application of *S. hispanica* L. as a high-quality functional ingredient in several industrial processes. Therefore, the ultrasound-assisted technique could be a reliable and novel method for phenolic compounds and antioxidants extraction from chia seeds, due to increases and improves extraction yield.

Key words: *Salvia hispanica* L., processing, phenolic compounds, antioxidant capacity, solvent extraction.

RESUMEN

La extracción de compuestos fenólicos se realizó desde semillas de chíá (*Salvia hispanica* L.) con dos disolventes (metanol y n-hexano) con o sin ultrasonido de alta intensidad. Esta se realizó en forma convencional sólido-líquido y con ultrasonido a 50, 75 y 100 % de potencia máxima (400 W) con las semillas de chíá mezcladas con disolvente (1:10 p/v), en tres tiempos de extracción (5, 10 y 15 min). La concentración mayor fenólica y la mejor capacidad antioxidante se obtuvieron con metanol como disolvente de extracción con ambos métodos. Los contenidos fenólicos mayores se obtuvieron en ambos extractos con el procedimiento convencional, en los tiempos de extracción cortos y la capacidad antioxidante aumentó con el tiempo. La eficiencia de la extracción de fenólicos asistida por ultrasonido aumentó con el tiempo y potencia de salida. Extractos metanólicos obtenidos con la potencia mayor (100 %, 15 min) no mostraron la capacidad antioxidante mejor. El proceso asistido por ultrasonido mostró mayor capacidad de extracción que los métodos convencionales; es decir, el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos con semillas de chíá aumentó. Este aumento puede conducir a una aplicación más amplia de *S. hispanica* L. como un ingrediente funcional de calidad alta en varios procesos industriales. Por lo tanto, la técnica asistida por ultrasonido podría ser un método fiable para la extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes desde semillas de chíá, porque aumenta y mejora el rendimiento de la extracción.

Palabras clave: *Salvia hispanica* L., procesamiento, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, extracción con disolventes.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: March, 2015. Approved: November, 2015.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 50: 403-412. 2016.

INTRODUCTION

Chia (*Salvia hispanica* L.) is herbaceous plant native from southern Mexico and northern Guatemala that belongs to the Lamiaceae family (Marineli *et al.*, 2014). Chia seeds are good sources of fiber, oil rich in polyunsaturated fatty acids and natural antioxidants including tocopherols, phytosterols, carotenoids and phenolic compounds, such as chlorogenic acid, caffeic acid, myricetin, quercetin and kaempferol (Capitani *et al.*, 2012). Along with corn (*Zea mays* L.), beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and amaranthus (*Amaranthus caudatus*), chia was a core component in the diet of many pre-Colombian civilizations in America, including the Mayan and Aztec; its seeds were valued as a source of oils for medicinal use (Cahill, 2003). In Mexico, chia seeds are used for their nutritional and medicinal properties, *i.e.* endurance for athletes, appetite suppressor, weight loss agent, blood glucose control, and intestinal regulation. The potential use of chia seeds as a good source of proteins with a remarkable thermal stability was reported by Sandoval-Oliveros and Paredes-López (2013).

Phenolic compounds are basically cataloged into several classes, of which phenolic acids, flavonoids and tannins are the main dietary phenolic compounds (Balasundram *et al.*, 2006). The antioxidant properties of phenolic compounds are attributed to their ability to scavenge free-radicals and to chelate metal ions involved in their production. Thus, the antioxidant activity of phenolic acids is due to their ability to donate a hydrogen anion, *i.e.*, an unpaired electron, and relocate it within the aromatic structure (Fernández-Panchón *et al.*, 2008; Cabrera-Soto *et al.*, 2009; Ignat *et al.*, 2011). Antioxidants are compounds that delay the oxidation process by inhibiting the initiation or propagation of oxidizing chain reactions, thus preventing many oxidative stress-related conditions, cardiovascular diseases, diabetes (Vuksan *et al.*, 2010), atherosclerosis, stroke, cancer and neurodegenerative diseases. In order to isolate these bioactive components, conventional and solvent-based extraction techniques are used. However, these methods have limitations including elevated solvent consumption and long extraction times. Thus, alternative ways are needed to improve the extraction process, thereby increasing both yield and quality of the extracts (Rodríguez-Bernaldo

INTRODUCCIÓN

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta herbácea originaria del sur de México y el norte de Guatemala, que pertenece a la familia Lamiaceae (Marineli *et al.*, 2014). Las semillas de chía son buena fuente de fibra, aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes naturales, incluyendo tocoferoles, fitosteroles, carotenoides y compuestos fenólicos, como ácido clorogénico, ácido caféico, miricetina, quercetina y kaempferol (Capitani *et al.*, 2012). Junto con el maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y amaranto (*Amaranthus caudatus*), la chía era un componente básico en la dieta de muchas civilizaciones precolombinas de América, incluso la maya y azteca; sus semillas fueron valoradas como fuente de aceites para uso medicinal (Cahill, 2003). En México, las semillas de chía se utilizan por sus propiedades nutritivas y medicinales, *i.e.*, para los atletas de resistencia, supresores del apetito, agentes de pérdida de peso, control de la glucosa en sangre, y regulación intestinal. El uso potencial de las semillas de chía como fuente adecuada de proteínas con estabilidad térmica notable está documentado (Sandoval-Oliveros y Paredes-López, 2013).

Los compuestos fenólicos se clasifican en varias clases, de ellos los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos son los principales compuestos fenólicos de los alimentos (Balasundram *et al.*, 2006). Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos se atribuyen a su capacidad para eliminar los radicales libres y para quelar iones de metales que intervienen en su producción. Así, la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos se debe a su capacidad para donar un anión de hidrógeno, *i.e.*, un electrón no apareado, y reubicarlo dentro de la estructura aromática (Fernández-Panchón *et al.*, 2008; Cabrera-Soto *et al.*, 2009; Ignat *et al.*, 2011). Los antioxidantes son compuestos que retardan el proceso de oxidación mediante la inhibición de la iniciación o propagación de reacciones de oxidación en cadena, así se evita oxidaciones mayores, que son condiciones relacionadas con el estrés, enfermedades cardiovasculares, diabetes (Vuksan *et al.*, 2010) aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Para aislar estos componentes bioactivos se usan técnicas de extracción convencionales y basadas en disolventes. Sin embargo, estos métodos tienen limitaciones como el consumo elevado de disolvente y tiempos

et al., 2010). Methods proposed are the use of supercritical fluids (Zulkafli *et al.*, 2014), microwaves (Setyaningsih *et al.*, 2015) and high-power ultrasound (Hussam *et al.*, 2013). There is an ongoing search for defining the adequate process variables of these emergent technologies to achieve the above defined goals.

Ultrasound-assisted extraction (UAE) is used for isolating compounds (Hussam *et al.*, 2013). Certain benefits in terms of solvent penetration arise from using UAE of food components including mass transfer intensification and sonocapillary effects. Extraction might also be improved as a consequence of the collapse of cavitation-formed bubbles near the cell walls (Toma *et al.*, 2001). Both extraction rate and yield might be improved by the optimal ultrasonic variables combination, such as intensity and time (Rodríguez-Bernaldo *et al.*, 2010). The extraction of phenolic compounds from chia seed was reported by Reyes-Caudillo *et al.* (2008) and they compared the effect of pressing and solvent. The application of the UAE has not been explored yet. Moreover, different solvents for extraction could lead to different compositions of phenolic compounds in extracts, because the solubility of each compound in a given solvent would be quite different, this implies that the phenolic compounds with more hydrophobic characteristics might occur in lower amounts than those with hydrophilic characteristics. Consequently, the bioactivity of an extract might also be affected (Lou *et al.*, 2014). The aim of this work was to quantify the UAE on the antioxidant capacity and the total phenolic content from chia seed using a polar (methanol) and a non-polar (hexane) solvent.

MATERIALS AND METHODS

Raw material, reagents and standards

Fresh chia seeds were purchased in a city local market (Zacatecas City, Mexico). The seeds were cleaned, ground and sieved to a particle size of 500 μm , packed in hermetic plastic bags and stored in the dark at room temperature (25 °C). Folin–Ciocalteu reagent (2N), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2 carboxylic acid (Trolox), gallic acid, potassium persulphate and sodium carbonate were analytical grade (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA); n-hexane and methanol were HPLC-grade (JT Baker).

largos de extracción. Entonces, se necesitan formas alternativas para mejorar el proceso de extracción, aumentando, el rendimiento y la calidad de los extractos (Rodríguez-Bernaldo *et al.*, 2010). Los métodos propuestos son el uso de fluidos supercríticos (Zulkafli *et al.*, 2014), microondas (Setyaningsih *et al.*, 2015) y ultrasonido de alta potencia (Hussam *et al.*, 2013). Hay una búsqueda continua de la definición de las variables adecuadas del proceso de estas tecnologías emergentes para alcanzar los objetivos definidos.

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) se usa para aislar compuestos (Hussam *et al.*, 2013). Ciertos beneficios en términos de penetración del disolvente surgen del uso en EAU de componentes de los alimentos, incluyendo la intensificación de transferencia de masa y efectos capilares. La extracción también podría mejorarse debido al colapso de las burbujas formadoras de cavitación, cerca de las paredes celulares (Toma *et al.*, 2001). La tasa de extracción y el rendimiento pueden mejorarse mediante la combinación óptima de variables de ultrasonidos, como la intensidad y el tiempo (Rodríguez-Bernaldo *et al.*, 2010). La extracción de compuestos fenólicos de semillas de chía fue documentado por Reyes-Caudillo *et al.* (2008) y ellos compararon el efecto del prensado y el disolvente. La aplicación de EAU no se ha explorado aún. Además, disolventes diferentes para la extracción podrían dar composiciones distintas de compuestos en los extractos, ya que la solubilidad de cada compuesto fenólico en un disolvente dado es diferente. Esto implica que los compuestos fenólicos con características más hidrofóbicas se pueden producir en cantidades menores que aquellos con características hidrofílicas. En consecuencia, la bioactividad de un extracto también se podría afectar (Lou *et al.*, 2014). El objetivo de este estudio fue cuantificar EAU en la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales de semillas de chía usando un disolvente polar (metanol) y uno no polar (hexano).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas, reactivos y estándares

Semillas frescas de chía se adquirieron en un mercado local de la ciudad de Zacatecas, México. Las semillas se limpiaron, molieron y tamizaron hasta tener partículas de 500 μm , se envasaron

Conventional extraction

Chia seeds flour (5 g) and 50 mL of n-hexane or methanol (1:10 w/v) was thoroughly mixed for 5, 10 or 15 min using an Ultraturrax homogenizer (T-25, IKA, Staufen, Germany) and then centrifuged (2701 x g; 4 °C) for 10 min. The supernatants were stored at 4 °C until their analysis (24 h).

Ultrasound-assisted extraction (UAE)

Ultrasonic device set-up

An ultrasonic probe device (UP400S, Hielscher, Teltow, Germany) working under controlled temperature conditions (25 °C) was used at 24 kHz, with maximum power output of 400 W, and an emitter surface of 3.8 cm² (Figure 1). The ultrasonic probe was immersed 1.5 cm into the solution and the vessel was kept in the dark in order to avoid potential light-induced damages of the extract.

The effective ultrasonic power transferred into the medium (P) was determined using a calorimetric procedure (Hussam *et al.*, 2013) (Equation 1) registering the temperature rise each second, for the first 3 min of ultrasonic application. P was calculated as:

$$P = (M C_p) (dT dt^{-1}) \quad (1)$$

where M (kg) is the solvent mass, C_p (J kg⁻¹ °C) is the heat capacity of solvent and $dT dt^{-1}$ is the slope of the logged temperature-time curve. Determinations were carried out in triplicate.

en bolsas herméticas de plástico y se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente (25 °C). Los reactivos Folin-Ciocalteu (2 N), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina de 6-sulfónico) (ABTS), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2 carboxílico (Trolox), ácido gálico, persulfato de potasio y carbonato de sodio fueron de grado analítico (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, EE.UU.); n-hexano y metanol fueron grado HPLC (JT Baker).

Extracción convencional

Harina de semillas de chía (5 g) y 50 mL de n-hexano o metanol (1:10 p/v) se mezclaron completamente por 5, 10 o 15 min, con un homogeneizador Ultraturrax (T-25, IKA, Staufen, Alemania) y luego se centrifugó (2701 x g, 4 °C) por 10 min. Los sobrenadantes se almacenaron a 4 °C hasta su análisis (24 h).

Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Puesta en marcha del dispositivo ultrasónico

Un dispositivo de ultrasonidos de sonda (UP400S, Hielscher, Teltow, Alemania) que trabaja en condiciones de temperatura controlada (25 °C) se utilizó, a 24 kHz, con potencia máxima de 400 W y un emisor de superficie de 3.8 cm² (Figura 1). La sonda ultrasónica se sumergió 1.5 cm en la solución y el recipiente se mantuvo en oscuridad, para evitar posibles daños, inducidos por la luz en el extracto.

La potencia ultrasónica eficaz transferida se determinó en el medio (P) con un procedimiento colorimétrico (Hussam *et al.*, 2013) (Ecuación 1) y registro del aumento de la temperatura cada segundo, durante los primeros 3 min de la aplicación de ultrasonido. P se calculó como sigue:

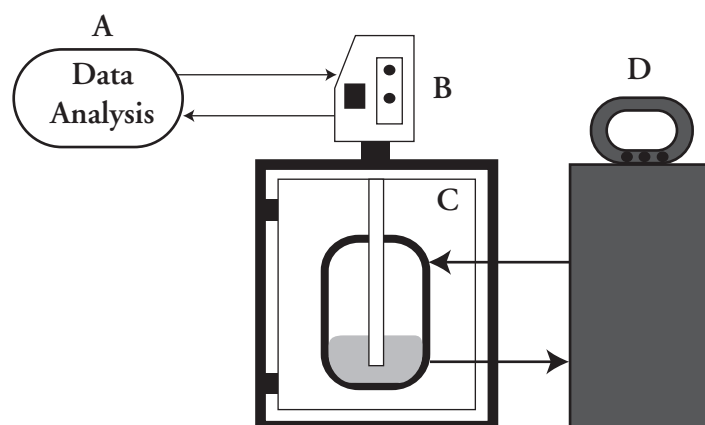


Figure 1. Experimental set-up for ultrasonic assisted extraction of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds phenolic compounds. A: Portable Computer; B: ultrasonic probe system; C: jacketed extraction vessel; D: chiller.

Figura 1. Equipo experimental para la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.). A: computadora portátil; B: sistema de sonda de ultrasonido; C: recipiente de extracción con camisa; D: enfriador.

Ultrasonic extraction

Experiments were carried out using the same chia seed flour (solvent ratio as before). Extract was placed in a jacketed extraction vessel and submitted to ultrasonic processing for 5, 10, and 15 min at amplitudes corresponding to 50, 75 and 100 % of power output (400 W). After extraction, the mixture was centrifuged (2701 x g; 4 °C) for 10 min. The supernatant obtained was stored (24 h) in opaque vials at 4 °C until analyzed.

Determination of total phenolic compounds (TPC)

Total phenolic content (TPC) was determined using the Folin-Ciocalteu method described by Hussam *et al.* (2013) with some modifications. Briefly, 250 μ L of extract was mixed with 15 mL deionized water and 1.25 mL of Folin-Ciocalteu phenol reagent. After 5 min, 3.75 mL of Na_2CO_3 (7.5 %) and bring to 25 mL with deionized water. Absorbance was measured at 765 nm in a spectrophotometer UV-Vis (Thermo Scientific 10S, Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Response variable was the TPC in the extracts expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per sample (100 g) using a regression equation and a gallic acid calibration curve. At least three replicates were made for each extract.

Antioxidant capacity (AC) and ABTS $^{\bullet+}$ scavenging ability

ABTS scavenging ability was determined as described by Fu *et al.* (2011). An ABTS radical cation (ABTS $^{\bullet+}$) was generated by reacting an ABTS aqueous solution (7 mmol L^{-1}) with $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2.45 mmol L^{-1} , final concentration) in the dark for 16 h, adjusting its absorbance at 734 nm to 0.700 ± 0.1 with ethanol. After addition of 900 μ L of diluted ABTS $^{\bullet+}$ solution to 100 μ L of extract, the absorbance reading was taken exactly 1 min after initial mixing. The percentage inhibition of absorbance at 734 nm is calculated and plotted as a function of concentration of antioxidants and of Trolox for the standard reference data. The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) was subsequently calculated. Results were expressed as mg Trolox 100 g^{-1} . Experiments were run in triplicate.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was factorial (3x3x2) and three replicates. All values expressed are means $\pm$ standard deviation. The data were used for to one-way and multifactorial ANOVA, and the differences between means was determined by Tukey's test ($p \leq 0.05$) using Statgraphics® Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Pearson's correlation test was carried out to determine the linear correlations between TPC and AC using the same software.

$$P = (M \text{ Cp}) (dT dt^{-1}) \quad (1)$$

donde M (kg) es la masa de disolvente, Cp ($\text{J kg}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}$) es la capacidad calórica del disolvente y $dT dt^{-1}$ es la pendiente de la curva temperatura-tiempo registrados. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Extracción por ultrasonidos

Los experimentos se realizaron con la misma harina de semillas de chía (relación de disolventes como se indicó antes). El extracto se colocó en un recipiente de extracción con camisa y se sometió a tratamiento de ultrasonido por 5, 10, y 15 min a amplitudes que corresponde a 50, 75 y 100 % de potencia de salida (400 W). Después de la extracción, se centrifugó la mezcla (2701 x g; 4 °C) por 10 min. El sobrenadante obtenido se almacenó (24 h) en viales opacos a 4 °C hasta su análisis.

Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC)

El contenido de fenoles totales (TPC) se determinó con el método Folin-Ciocalteu descrito por Hussam *et al.* (2013) con algunas modificaciones. En breve, 250 μ L de extracto se mezclaron con 15 mL de agua desionizada y 1.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu para fenoles. Después de 5 min, 3.75 mL de Na_2CO_3 (7.5 %) y se aforó a 25 mL con agua desionizada. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific 10S, Thermo Fisher Scientific Inc, EE.UU.). El valor TPC de los extractos se expresó como equivalentes de ácido gálico en mg (GAE) por muestra (100 g), para lo que se utilizó una ecuación de regresión y una curva de calibración de ácido gálico. Al menos tres réplicas se hicieron de cada extracto.

Capacidad antioxidante (AC) y capacidad secuestradora ABTS $^{\bullet+}$

La capacidad de eliminación de ABTS se determinó como lo describió Fu *et al.* (2011). Un radical cationico ABTS (ABTS $^{\bullet+}$) se generó mediante la reacción de una solución acuosa de ABTS (7 mmol L^{-1}) con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (concentración final 2.45 mmol L^{-1}) en oscuridad por 16 h, su absorbancia se ajustó a 734 nm a 0.700 ± 0.1 con etanol. Después de la adición de 900 μ L de solución diluida ABTS $^{\bullet+}$ a 100 μ L de extracto, la absorbancia se leyó exactamente 1 min después de la mezcla inicial. El porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm se calculó y se representó como una función de la concentración de antioxidantes y de Trolox por los datos de referencia estándar. La capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) se calculó posteriormente. Los resultados se expresaron como mg Trolox 100 g^{-1} . Los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTS AND DISCUSSION

Conventional extraction

A significant difference ($p \leq 0.05$) was observed between TPC of methanolic extracts and those obtained with hexane at all extraction times, with an average increment of 64.56 %; thus, phenolics in chia are thought to be polar in nature (Figure 2a). These results are in agreement with those of González-Jiménez *et al.* (2010). In ethanol-extracted chia samples, Reyes-Caudillo *et al.* (2008) obtained TPC values of 88.00 mg per 100 g of sample, while Marineli *et al.* (2014) reported TPC of 94 mg 100 g⁻¹. A significant ($p \leq 0.05$) difference in AC of methanol-extracted or hexane-extracted samples were observed (Figure 2B).

In order to compare the effect of solvent, average values of total phenolics and antioxidant activity were obtained from all values by conventional extraction. Methanolic extracts showed an AC of 8.27 ± 0.15 mg Trolox 100 g⁻¹ of chia (average value), whereas hexane extracts had an AC of 0.44 ± 0.05 mg Trolox 100 g⁻¹ of chia (average value), which is consistent with TPC results. Hexane extracts are rich in highly-unstable polyunsaturated fatty acids (PUFA) (González-Jiménez *et al.*, 2010). The oxidation-prone PUFAs would be responsible for such low AC values. These results agree with

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue factorial ($3 \times 3 \times 2$) y tres replicas. Todos los valores se expresaron como medias $\pm$ desviación estándar. Con los datos se realizaron un análisis multifactorial de una sola vía y ANDEVA, y la significancia de la diferencia entre las medias se determinó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con Statgraphics® Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, EE.UU.). La prueba de correlación de Pearson se realizó para determinar las correlaciones lineales entre TPC y AC con el mismo software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción convencional

Una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) se observó entre TPC de los extractos metanólicos respecto a los obtenidos con hexano en todos los tiempos de extracción, con incremento promedio de 64.56 %. Así, los compuestos fenólicos en chía serían de naturaleza polar (Figura 2A). Estos resultados coincidieron con los de González-Jiménez *et al.* (2010). Reyes-Caudillo *et al.* (2008) obtuvieron en muestras de chía extraídas con etanol valores TPC de 88.00 mg por 100 g de muestra, y Martinelli *et al.* (2014) documentaron TPC de 94 mg 100 g⁻¹. Una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) se observó en AC de muestras extraídas con metanol y hexano (Figura 2B).

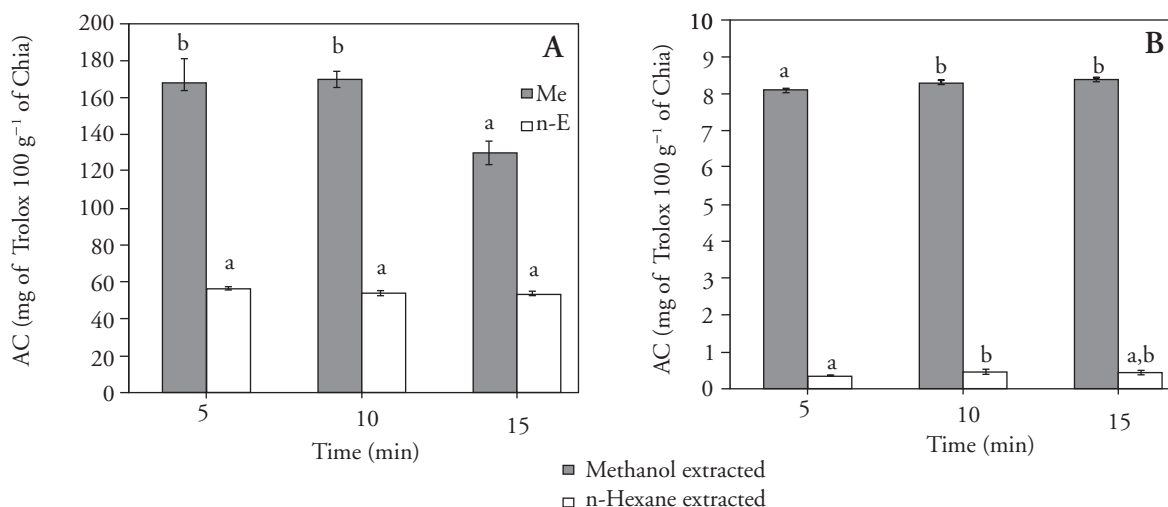


Figure 2. Effect of the type of solvent (n-hexane or methanol) at three different conventional extractions times on the average (A) TPC and (B) AC from samples of chia seeds. Average $\pm$ HSD ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Efecto del tipo de disolvente (n-hexano o metanol) en tres tiempos convencionales de extracciones promedio (A) TPC y (B) AC de muestras de semillas de chía. Promedio $\pm$ HSD ($p \leq 0.05$).

those obtained by González-Jiménez *et al.* (2010), who reported that oil fractions of chia seeds showed a minor AC related to the low TPC obtained with hexane and the high PUFAs content. Results showed (Figure 2A) a significant difference ($p \leq 0.05$) between methanol extractions for 5 and 10 min in comparison with the 15 min extraction. Meanwhile, for hexane samples, a significant ($p \leq 0.05$) increase of TPC was observed in 5-min hexane-extracted samples, whereas AC (Figure 2B) did not exhibit a significant influence ($p > 0.05$) of extraction time for both solvents used.

There is an influence of solvent polarity in the extraction process. Thus the higher TPC and AC were obtained in samples with methanol, while for the conventional extraction time, the TPC was decreasing in methanol samples and increasing in hexane samples, and the AC remained constant in both samples.

Ultrasonic assisted extraction

The effective ultrasonic power was in the range from 29.002 to 37.534 W. As expected, the ultrasound applied into the medium increased almost linearly ($R^2_{\text{Methanol}} = 0.8833$; $R^2_{\text{n-Hexane}} = 0.9972$) with supply of electric power to the transducer (Table 1).

Similar to conventional extraction, in order to compare the effect of solvent, average values of total phenolics and antioxidant activity were obtained from all values by UAE. Net ultrasonic power applied was always higher for hexane than methanol; this was attributed to differences in heat capacity. UAE results (Table 2) showed a significant difference ($p \leq 0.05$) on TPC and AC between methanolic extracts (149.95 ± 20.39 mg of GAE 100 g^{-1} and 9.90 ± 0.05 mg Trolox 100 g^{-1} of chia, average value) and hexane (60.31 ± 5.99 mg of GAE 100 g^{-1} and 1.11 ± 0.38 mg Trolox 100 g^{-1} of chia, average value). From other studies (Cárcel *et al.*, 2007; Hussam *et al.*, 2013), the ultrasonic power applied was considered one of the key factors affecting phenolics extraction efficiency. A higher ultrasonic power applied generates more intense cavitation which facilitates solvent penetration into the matrix and increases the extraction efficiency (Priego and Luque, 2004).

Best extraction parameters of TPC were obtained at 100 % ultrasonic power for 15 min using methanol (194.06 ± 11.11 mg of GAE 100 g^{-1} of chia);

Para comparar el efecto del disolvente, valores promedio de fenoles totales y actividad antioxidante se obtuvieron de todos los valores de la extracción convencional. Extractos metanólicos mostraron AC promedio de 8.27 ± 0.15 mg Trolox 100 g^{-1} de chía, y los extractos de hexano tuvieron AC promedio de 0.44 ± 0.05 mg Trolox 100 g^{-1} de chía, que es consistente con los resultados TPC. Los extractos de hexano son ricos en ácidos grasos poliinsaturados altamente inestables (PUFA) (González-Jiménez *et al.*, 2010). La propensión de PUFAs a oxidación sería responsable de los valores bajos de AC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por González-Jiménez *et al.* (2010), quienes informaron que las fracciones de aceite de semillas de chía mostraron AC menor, relacionada con TPC baja obtenida con hexano y contenido PUFA alto. Los resultados mostraron (Figura 2A) diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las extracciones de metanol por 5 min y 10 respecto a la extracción por 15 min. En las muestras con hexano hubo aumento significativo ($p \leq 0.05$) de TPC en las muestras extraídas con 5 min, mientras que AC (Figura 2B) no mostró influencia significativa ($p > 0.05$) del tiempo de extracción con ambos disolventes.

Hay una influencia de la polaridad del disolvente en el proceso de extracción. Así, los TPC y AC mayores se obtuvieron en muestras con metanol, mientras que en el tiempo de extracción convencional TPC fue disminuyendo en muestras de metanol e incrementando en las muestras de hexano, y AC se mantuvo constante en ambas muestras.

Extracción asistida por ultrasonido

La potencia ultrasónica efectiva estuvo en el intervalo de 29.002 a 37.534 W. Como se esperaba, el ultrasonido aplicado al medio aumentó casi linealmente ($R^2_{\text{metanol}} = 0.8833$; $R^2_{\text{n-hexano}} = 0.9972$) con el suministro de energía eléctrica al transductor (Cuadro 1).

Similar a la extracción convencional, para comparar el efecto del disolvente, valores promedio de fenoles totales y actividad antioxidante se obtuvieron de todos los valores por EAU. La potencia ultrasónica neta aplicada fue siempre mayor para hexano que para metanol; esto se atribuyó a diferencias en la capacidad calórica. Los resultados de los EAU (Cuadro 2) mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en TPC y AC entre los extractos metanólicos (en promedio

Table 1. Ultrasonic power (W) applied to the medium as function of the percentage of the total electric power (400 W) and time (3min) of ultrasonic application.**Cuadro 1. Potencia de ultrasonidos (W) aplicada al medio como función del porcentaje de la potencia total eléctrica (400 W) y tiempo (3 min) de aplicación de ultrasonido.**

Diameter (cm)	Emitter surface (cm ²)	Solvent	Electric power supplied to transducer		
			50 %	75 %	100 %
2.2	3.8	Methanol	29.002 ± 0.376	32.852 ± 0.256	33.727 ± 0.228
		n-Hexane	33.282 ± 0.093	35.214 ± 0.411	37.534 ± 0.925

Data are means ± standard deviation (n=3) ♦ Los datos son medias ± desviación estándar (n=3).

meanwhile, no influence ($p>0.05$) of ultrasonic application was observed for 5 and 15 min hexane extraction (68.14 ± 0.14 and 66.13 ± 2.14 mg of GAE 100 g⁻¹ of chia, respectively). Again, this was attributed to non-affinity of hexane polarity towards hydrophilic compounds of chia, as well as with the irradiation power, which might reduce the efficiency

149.95 ± 20.39 mg de GAE 100 g⁻¹ y 9.90 ± 0.05 mg de Trolox 100 g⁻¹ de chía) y hexano (en promedio 60.31 ± 5.99 mg de GAE 100 g⁻¹ y 1.11 ± 0.38 mg de Trolox 100 g⁻¹ de chía). De acuerdo con otros estudios (Cárcel *et al.*, 2007; Hussam *et al.*, 2013), la potencia ultrasónica aplicada se consideró un factor clave que afectan a la eficiencia de extracción de

Table 2. Influence of ultrasonic assisted extraction process parameters on the TPC and AC of Chia seeds with two different solvents (methanol and hexane).**Cuadro 2. Influencia de los parámetros del proceso de extracción asistida por ultrasonidos en el TPC y AC de semillas de chía con diferentes disolventes (metanol y hexano).**

Solvent	Time (min)	Amplitude (%)	TPC (mg of GAE 100 g ⁻¹)	AC (mg of Trolox 100 g ⁻¹)
Methanol	5	50	(144.9 ± 4.3)aB	(9.80 ± 0.04)aA
		75	(132.9 ± 6.2)aA	(9.95 ± 0.13)aB
		100	(133.4 ± 5.9)aA	(9.95 ± 0.08)aC
	10	50	(132.4 ± 2.6)aA	(9.88 ± 0.19)aA
		75	(146.6 ± 1.7)bA	(9.98 ± 0.08)aB
		100	(159.6 ± 5.04)cB	(9.89 ± 0.06)aC
	15	50	(136.8 ± 1.2)aA	(9.86 ± 0.06)aA
		75	(164.4 ± 7.9)bB	(9.89 ± 0.12)aB
		100	(194.06 ± 11.1)cC	(9.91 ± 0.11)aC
	5	50	(62.7 ± 3.8)abB	(1.39 ± 0.11)aAB
		75	(61.4 ± 1.9)aB	(1.24 ± 0.12)aB
		100	(68.1 ± 0.1)bB	(1.73 ± 0.15)bB
n-Hexane	10	50	(53.1 ± 1.25)aA	(1.44 ± 0.07)bB
		75	(53.7 ± 0.88)aA	(0.53 ± 0.1)aA
		100	(56.2 ± 0.88)bA	(0.7 ± 0.08)aA
	15	50	(66.8 ± 1.7)bB	(1.15 ± 0.13)aA
		75	(54.7 ± 0.72)aA	(0.84 ± 0.15)aA
		100	(66.1 ± 2.14)bB	(1.00 ± 0.17)aA

Data are means ± standard deviation (n=3). Different lower case letters in the same cell and the same column indicate significant differences between amplitudes at a time of extraction ($p\leq0.05$); while upper case letters in a different cell within a single column indicate statistically significant difference between times for the same amplitude ($p\leq0.05$) ♦ Los datos son medias ± desviación estándar (n=3). Las letras minúsculas diferentes en la misma celda y la misma columna indican diferencias significativas entre las amplitudes en el tiempo de extracción ($p\leq0.05$); las letras mayúsculas en una celda diferente dentro de una única columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de la misma amplitud ($p\leq0.05$).

of ultrasonic energy transmitted into the medium due to an increase in the bubble numbers in solvent during cavitation (Filgueiras *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2007). As expected, methanolic extracts exhibit the highest AC (9.90 ± 0.05 mg Trolox 100 g^{-1} of chia) (Table 2); however, no significant differences in ultrasonic power applied ($p > 0.05$) were observed. Besides, there was correlation between TPC and AC of chia seeds for both solvents used ($R = 0.939$; $n = 66$; $p = 0.000$) (Figure 3).

CONCLUSIONS

Ultrasound-assisted extraction with methanol could be used as an efficient alternative for obtaining phenolics from chia seeds with high antioxidant capacity. The ultrasonic effect was dependent on the effective ultrasonic power applied to the medium and extraction time.

The best total phenolic content extraction conditions were 100 % of total electric power for 15 min. Ultrasound-assisted extraction still presents some challenges for its industrial scale-up. Therefore, ultrasonic-assisted processes must be evaluated in

los compuestos fenólicos. Una potencia ultrasónica superior genera cavitación mayor, que facilita la penetración del disolvente en la matriz y aumenta la eficiencia de la extracción (Priego y Luque, 2004).

Los parámetros mejores de extracción de TPC se obtuvieron con 100 % de energía ultrasónica por 15 min y metanol (194.06 ± 11.11 mg de GAE 100 g^{-1} de chía), pero no hubo efecto ($p > 0.05$) con el ultrasonido aplicado por 5 y 15 min en la extracción con hexano (68.14 ± 0.14 y 66.13 ± 2.14 mg de GAE 100 g^{-1} de chía). Una vez más, esto se atribuyó a la falta de afinidad de la polaridad del hexano hacia compuestos hidrófilos de chía, así como con la potencia de irradiación, lo que podría reducir la eficiencia de la energía ultrasónica transmitida al medio por aumento en el número de burbujas en el disolvente durante la cavitación (Filgueiras *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2007). Como se esperaba, los extractos metanólicos exhibieron el AC mayor (9.90 ± 0.05 mg Trolox 100 g^{-1} de chía) (Cuadro 2), pero no hubo diferencias significativas en la energía ultrasónica aplicada ($p > 0.05$). Además, hubo correlación entre TPC y AC de semillas chía para los disolventes ($R = 0.9391$; $n = 66$; $p = 0.000$) (Figura 3).

CONCLUSIONES

La extracción con metanol asistida por ultrasonido se podría utilizar como una alternativa eficiente para obtener compuestos fenólicos, con capacidad antioxidante alta, de semillas de chía. El efecto del ultrasonido depende de la potencia ultrasónica que se aplique al medio y el tiempo de extracción.

Las mejores condiciones de extracción del contenido de fenoles totales fueron 100 % de la potencia eléctrica total durante 15 min. La extracción asistida por ultrasonido todavía presenta algunos retos para su escala industrial. Por lo tanto, los procesos asistidos por ultrasonido se deben evaluar para aumentar la probabilidad de aplicación en el procesamiento de alimentos.

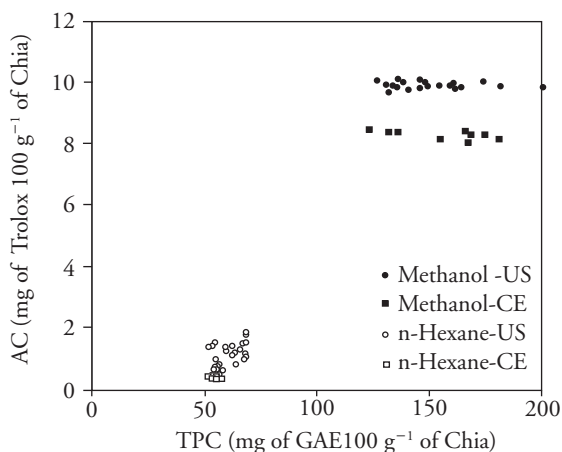


Figure 3. Relationship between the antioxidant capacity (mg of Trolox 100 g^{-1}) and total phenolic compounds (mg of GAE 100 g^{-1}) of chia seed extracts with two different type of solvent (n-hexane and methanol).

Figura 3. Relación entre la capacidad antioxidante (mg de Trolox 100 g^{-1}) y los compuestos fenólicos totales (mg GAE de 100 g^{-1}) de los extractos de semillas de chía con dos disolventes diferentes (n-hexano y metanol).

—Fin de la versión en Español—

—*—

order to increase the probability of applications in the food processing field.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge financial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (through the funds of Project 207279) and also show their appreciation to Tania Martínez- Ramos for their technical support in the UAE procedure.

LITERATURE CITED

- Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99: 191-203.
- Cabrera-Soto, M. L., Y. Salinas-Moreno, G. A. Velázquez-Cardelas, and E. Espinosa-Trujillo. 2009. Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia* 43: 827-839.
- Cahill, J. P. 2003. Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Econ. Bot.* 57: 604-618.
- Capitani, M. I., V. Spotorno, S. M. Nolasco, and M. C. Tomás. 2012. Physicochemical and functional characterization of by-products from Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *Food Sci. Technol.-Leb.* 45: 94-102.
- Cárcel J., A., J. Benedito, J. Bon, and A. Mulet. 2007. High intensity ultrasound effects on meat brining. *Meat Sci.* 76: 611-619.
- Fernández-Panchón, M.S., D. Villano, A. M. Troncoso, and M.C. García-Parrilla. 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to *in vivo* evidence. *Crit. Rev. Food Sci.* 48: 649-671.
- Filgueiras, A. V., J. L. Capelo, I. Lavilla, and C. Bendicho. 2000. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 53: 433-441.
- Fu, L., B. T. Xu, X. R. Xu, R. Y. Gan, Y. Zhang, E. Q. Xia, and H. B. Li. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chem.* 129: 345-350.
- González-Jiménez, F. E., M. C. Beltrán-Orozco, and M. G. Vargas. 2010. The antioxidant capacity and phenolic content of chia's (*Salvia hispanica* L.). *Integral seed and oil. J. Biotechnol.* 150: S315.
- Hussam Ahmad-Qasem, M., J. Cánovas, E. Barrajón-Catalán, V. Micol, J. A. Cárcel, and J. V. García-Pérez. 2013. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innov. Food Sci. Emerg.* 17: 120-129.
- Ignat, I., I. Volf, and V. I. Popa. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126: 1821-1835.
- Lou, S-N, Y-S. Hsu, and C-T. Ho. 2014. Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents. *J. Food Drug Anal.* 22: 290-295.
- Marineli, R.S., É. Aguiar-Moraes, S. Alves-Lenquist, A. Teixeira-Godoy, M. Nogueira-Eberlin, and M. R. Maróstica Jr. 2014. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean Chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *Food Sci Technol.-Leb.* 59: 1304-1310.
- Priego-Capote, F., and M. D. Luque De C.. 2004. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *Tra-Trend Anal. Chem.* 23: 644-653.
- Reyes-Caudillo, E., A. Tecante, and M. A. Valdivia-López. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chem.* 107: 656-663.
- Rodríguez-Bernaldo De Q., A., M. A. Lage-Yusty, and J. López-Hernández. 2010. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chem.* 121: 634-638.
- Sandoval-Oliveros, M. R., and O. Paredes-López. 2013. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 61: 193-201.
- Setyaningsih, W., I. E. Saputro, M. Palma, and C. G. Barroso. 2015. Optimization and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chem.* 169: 141-149.
- Toma, M., M. Vinatoru, L. Paniwnyk, and T. J. Mason. 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem.* 8: 137-142.
- Vuksan, V., A. L. Jenkins, A. G. Dias, A. S. Lee, E. Jovanovski, and A. L. Rogovik. 2010. Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia hispanica* L.). *Eur. J. Clin. Nutr.* 64: 436-438.
- Zhao, S., K. C. Kwok, and H. Liang. 2007. Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. *Sep. Purif. Technol.* 55: 307-312.
- Zulkafli, Z. D., H. Wang, F. Miyashita, N. Utsumi, and K. Tamura. 2014. Cosolvent-modified supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from bamboo leaves (*Sasa palmata*). *J. Supercrit Fluid.* 94: 123-129.