



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Capacidad antioxidante y antihiperглиcemiante *in vitro* del arabinosilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la “chicha de jora”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Juan Jharol SEGOVIA HUARCAYA

Lilian Silvana VALENTIN SOTO

ASESORES

Dr. Oscar HERRERA CALDERÓN

Dr. César Máximo FUERTES RUITÓN

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Segovia J, Valentin L. Capacidad antioxidante y antihiperlicemiante *in vitro* del arabinosilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la “chicha de jora” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor 1	
Nombres y apellidos	Juan Jharol Segovia Huarcaya
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76674328
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7816-1208
Datos de autor 2	
Nombres y apellidos	Lilian Silvana Valentin Soto
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74324781
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4458-2834
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Oscar Herrera Calderón
Tipo de documento de identidad	DNI:
Número de documento de identidad	40556214
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7264-0961
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	César Máximo Fuertes Ruitón.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15289369
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6170-3549
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07371298
Miembro del jurado 1	

Nombres y apellidos	Carmen Gladys Peña Suasnabar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	20904674
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Hugo Félix Milla Flores
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08070390
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Mónica Guadalupe Retuerto Figueroa
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09481617
Datos de investigación	
Línea de investigación	Recursos y productos naturales con potencial farmacéutico, alimentario, cosmético y terapéutico
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), laboratorio de investigación sección carbohidratos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 - Lima Latitud: -12.0561741 Longitud: -77.0233785
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Noviembre 2020 - Febrero 2022
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Capacidad antioxidante y antihiperlipémica *in vitro* del arabinosilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la "chicha de jora"

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**JUAN JHAROL SEGOVIA HUARCAYA Y
LILIAN SILVANA VALENTIN SOTO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

18 (dieciocho) Aprobado con mención honrosa

de conformidad con el Art. 14.º del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR (R.D. N.º 000831-2021-D-FFB/UNMSM)

- Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
- Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar
- Mg. Hugo Félix Milla Flores
- Mg. Mónica Guadalupe Retuerto Figueroa

Lima, 16 de febrero de 2022.



Firmado digitalmente por FELIX
VELIZ Luis Miguel Visitacion FAU
20143092262 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 16.02.2022 19:23:44 -05:00

Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Presidente

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis está dedicado:

A mi mamita Florentina y mi papito Juan por su apoyo incondicional, palabras de aliento y ejemplo de vida; quienes supieron entender mi ausencia durante esta aventura de 7 años lejos de mi querido hogar. Los quiero mucho.

A mis hermanas Soledad y Margoth por motivarme e inspirarme a ser una mejor persona cada día.

A mis profesores por su sabiduría compartida durante mi formación profesional.

Pero ante todo se lo dedico a Dios por permitirme el aliento de vida.

Atte. Juan Jharol Segovia Huarcaya

DEDICATORIA

A mi querida familia:

Mi madre, Karin, que siempre ha sido mi guía.

Mi padre, José Luis, por todas sus enseñanzas.

Mis padrinos, tíos y primos, por todo su cariño y consejos.

A mis abuelos, en especial a mis abuelitas Lilia y Mercedes.

A mis amigos, por ser como hermanos de corazón.

A todos aquellos quienes enfocan su energía en desarrollar la Investigación en el Perú.

A Dios, por todo.

Atte: Lilian Silvana Valentin Soto

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales al Dr. Oscar Herrera y al Dr. César Fuertes; nuestros asesores de tesis, por sus sabios consejos y apoyo brindado durante el desarrollo y culminación de la presente tesis.

Al equipo de Investigación NATURE del departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y sus distinguidos miembros quienes nos proporcionaron las facilidades para ejecutar la parte experimental de la tesis.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a todo su personal por permitirnos lograr crecimiento personal y académico.

A todas las maravillosas personas que han apoyado directa o indirectamente en la realización de la tesis.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Planteamiento del problema	1
I.1.1. Formulación del problema.....	2
I.2. Objetivos.....	2
I.2.1. Objetivo general	2
I.1.1. Objetivos específicos.....	2
I.3. Importancia y alcance de la investigación.....	3
I.4. Limitaciones de la investigación	4
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
II.1. Marco teórico	4
II.1.1. Arabinoxilano ferulado (AXF)	4
II.1.1.1. Estructura química	4
II.1.1.2. Biosíntesis.....	5
II.1.1.3. Clasificación del arabinoxilano	6
II.1.1.3.1. Arabinoxilano extraíble en agua (AXEA)	6
II.1.1.3.2. Arabinoxilano no extraíble en agua (AXNA).....	7
II.1.1.4. Interacción del AXF con otros constituyentes de la pared celular	7
II.1.1.5. Métodos de extracción	8
II.1.1.6. Potenciales aplicaciones del arabinoxilano	9
II.1.2. La chicha de jora (CJ)	9
II.1.2.1. Maíz de jora y la germinación	9
II.1.2.1.1. Bioquímica de la germinación del maíz.....	10
II.1.2.2. Elaboración	10

II.1.3.	Antioxidantes y radicales libres (RL)	12
II.1.3.1.	Los RL y sus formas de producción	12
II.1.3.2.	Estrés oxidativo (EO) y estrés nitrosativo (EN)	13
II.1.3.3.	Dianas moleculares de los RL	13
II.1.3.4.	Antioxidantes	14
II.1.3.4.1.	Líneas de defensa antioxidante ⁵¹	14
II.1.4.	Medicamentos para la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM T2)	15
II.1.4.1.	DM T2	15
II.1.4.1.1.	Criterios para el diagnóstico de la diabetes	16
II.1.4.1.2.	Fisiopatología de la DM T2 ⁵⁴	16
II.1.4.1.3.	Complicaciones de la DM T2	17
II.1.4.2.	Medicamentos antidiabéticos orales ⁵⁵	17
II.1.4.2.1.	Clasificación	18
II.1.4.2.1.1.	Los agentes hipoglucemiantes	18
II.1.4.2.1.2.	Los agentes antihiperглиcemiantes	18
II.2.	Antecedentes del estudio	20
II.3.	Glosario de términos	22
III.	HIPÓTESIS Y VARIABLES	23
III.1.	Hipótesis	23
III.2.	Variables	23
III.3.	Operacionalización de variables	23
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
IV.1.	Área de estudio	23
IV.2.	Diseño de investigación	24
IV.3.	Población y muestra	24
IV.3.1.	Población:	24
IV.3.2.	Muestra	25
IV.4.	Metodología	25
IV.4.1.	Obtención de la muestra de BCJ y extracción del AXF	25
IV.4.1.1.	Pretratamiento de la muestra de bagazo de chicha de jora	25
IV.4.1.2.	Extracción química del AXF	26
IV.4.1.2.1.	Desengrasado y remoción de almidón	26
IV.4.1.2.2.	Extracción del AXF	27
IV.4.2.	Caracterización del polisacárido aislado	28
IV.4.2.1.	Solubilidad	28

IV.4.2.1.1. Solubilidad en solventes de diferente polaridad.....	28
IV.4.2.1.2. Solubilidad a diferentes temperaturas	29
IV.4.2.2. Contenido de humedad	30
IV.4.2.3. pH	30
IV.4.2.4. Cenizas	30
IV.4.2.5. Proteínas.....	30
IV.4.2.6. Análisis micromerítico	30
IV.4.2.6.1. Ángulo de reposo	30
IV.4.2.6.2. Densidad aparente y densidad compactada	31
IV.4.2.6.3. Índice de Hausner (IH)	32
IV.4.2.6.4. Índice de Carr (IC, %).....	32
IV.4.2.7. Viscosidad	32
IV.4.2.8. Determinación del contenido fenólico total.....	33
IV.4.2.9. Identificación de monosacáridos por cromatografía de capa fina (CCF).....	33
IV.4.2.10. Análisis por HPLC–MS/MS	34
IV.4.2.10.1. Pretratamiento del AXF por metanólisis ácida	34
IV.4.2.10.2. Condiciones HPLC–MS/MS	35
IV.4.2.11. Análisis por espectroscopia UV-vis	36
IV.4.2.12. Análisis por espectroscopía infrarroja (IR).....	36
IV.4.2.13. Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	36
IV.4.2.13.1. Capacidad de inhibición del radical DPPH*	36
IV.4.2.13.2. Capacidad de inhibición del radical ABTS*+	37
IV.4.2.13.3. Ensayo de FRAP	38
IV.4.2.14. Determinación de la capacidad antihiperlicemiantes <i>in vitro</i>	38
IV.4.2.14.1. Capacidad de adsorción de glucosa (CAG)	38
IV.4.2.14.2. Capacidad de inhibición de la difusión de glucosa.....	39
IV.4.2.14.3. Capacidad de inhibición de α -amilasa.....	39
IV.5. Análisis estadístico	40
V. RESULTADOS	40
V.1. Presentación y análisis de los resultados	40
V.1.1. Pretratamiento y extracción química	40
V.1.2. Caracterización fisicoquímica del polisacárido aislado.....	43
V.1.2.1. Solubilidad.....	43

V.1.2.2.	Humedad.....	45
V.1.2.3.	pH.....	45
V.1.2.4.	Cenizas totales.....	45
V.1.2.5.	Proteínas.....	45
V.1.2.6.	Análisis micromerítico.....	45
V.1.2.7.	Viscosidad.....	46
V.1.2.8.	Contenido fenólico total.....	47
V.1.2.9.	Identificación de monosacáridos por cromatografía de capa fina (CCF).....	48
V.1.2.10.	Análisis por HPLC–MS/MS.....	50
V.1.2.11.	Espectroscopia UV-vis.....	55
V.1.2.12.	Espectroscopia infrarroja.....	56
V.1.3.	Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	57
V.1.3.1.	Capacidad de inhibición del radical DPPH [•]	57
V.1.3.2.	Capacidad de inhibición del radical ABTS ^{•+}	59
V.1.3.3.	Ensayo de FRAP.....	60
V.1.4.	Determinación de la capacidad antihiperglicemiante <i>in vitro</i>	64
V.1.4.1.	Capacidad de adsorción de glucosa (CAG).....	79
V.1.4.2.	Capacidad de inhibición de la difusión de glucosa.....	65
V.1.4.3.	Capacidad de inhibición de α -amilasa.....	67
VI.	DISCUSIÓN.....	69
VII.	CONCLUSIONES.....	82
VIII.	RECOMENDACIONES.....	83
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
X.	ANEXOS.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del arabinoxilano ferulado ¹⁴	5
Figura 2. Etapas para la elaboración de la CJ artesanal (Elaboración propia).....	12
Figura 3. Esquema del proceso de extracción del AXF a partir del BCJ (Elaboración propia).....	28
Figura 4. Flujograma de la solubilidad del AXF pulverizado de acuerdo con la monografía <5.11> de la Farmacopea Europea 10.4 (Elaboración propia).	29
Figura 5. Muestra del BCJ sin pretratamiento (izquierda) y luego separar los componentes fibrosos correspondientes al pericarpio de maíz germinado (derecha).....	41
Figura 6. Rendimiento durante el proceso de extracción del AXF. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).....	42
Figura 7. Muestra de BCJ seca, pulverizada y tamizada obtenida al final del pretratamiento (a); muestra del BCJ luego de la etapa de desengrasado (b); muestra de BCJ luego de la eliminación de almidón (c); y muestra del AXF secada en estufa y pulverizada (d).....	42
Figura 8. Solubilidad del AXF en solventes de diferente grado de polaridad tales como: agua acidificada, pH=5 (a); agua destilada, pH=7 (b); agua alcalinizada, pH=10 (c); metanol (d); etanol (e); cloroformo (f); acetona (g); y acetato de etilo (h).....	43
Figura 9. Influencia de la temperatura (25 - 100 °C) sobre el tiempo de disolución del AXF pulverizado. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3)....	44
Figura 10. Viscosidad intrínseca a diferentes concentraciones del AXF extraído. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).....	47
Figura 11. Curva de calibración para la determinación del contenido fenólico total. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).....	48
Figura 12. Separación por CCF de L-Arabinosa:D-Xilosa:D-Glucosa (Ara:Xil:Glu), L-Arabinosa (Ara), D-Xilosa (Xil), D-Glucosa (Glu), L-Arabinosa:D-Xilosa (Ara:Xil) y la muestra de AXF hidrolizado.	49

Figura 13. Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total de los estándares de azúcares (a) y del AXF antes de la metanólisis ácida (b).	51
Figura 14. Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total del AXF después de la metanólisis ácida entre t_R 0 – 27 min. Asimismo, se muestra el perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total recortada entre t_R 2.50 – 18 min con los picos de mayor abundancia relativa.	52
Figura 15. Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total recortada del AXF hidrolizado con t_R desde 2,5 min hasta 18,0 min (a); Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total MS^{2-} recortada del AXF hidrolizado entre t_R de 2,5 y 18,0 min (b); y espectros de masas en modo de ionización ESI (-) de los picos cromatográficos obtenidos por PRM de iones precursores a m/z 163,06 [M-H] ⁻ ordenados de acuerdo al t_R (c.1 – c.5).....	53
Figura 16. Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total recortado del AXF hidrolizado entre t_R desde 2,5 min hasta 18,0 min (a); Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total MS^{2-} recortado del AXF hidrolizado entre t_R desde 2,5 min hasta 18,0 min (b); y espectros de masas en modo de ionización ESI (-) de los picos cromatográficos obtenidos por PRM de iones precursores a m/z 193,05 [M-H] ⁻ ordenados de acuerdo al t_R (c.1 – c.5).....	54
Figura 17. A la izquierda se presenta la fragmentación del ion molecular con m/z 163,0611967 [M-H] ⁻ en $t_R = 7,21$ (a); y a la derecha se presenta la fragmentación en el espectro de masas del ion molecular con m/z 193,0506321 [M-H] ⁻ en $t_R = 10,86$ min (b). Ambos en modo de ionización ESI(-).....	55
Figura 18. Espectro de absorción UV-vis del AXF extraído	56
Figura 19. Espectro infrarrojo del AXF extraído	57
Figura 20. Curvas de Inhibición del radical DPPH [•] del AXF extraído y estándar de Trolox. Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).....	58
Figura 21. Inhibición del radical ABTS ^{•+} del AXF extraído y estándar. Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).....	60
Figura 22. Curva de calibración mediante el ensayo de FRAP empleando ácido ascórbico a concentraciones entre 100 y 1000 $\mu\text{mol/L}$. L. Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).....	62

Figura 23. Curva de calibración mediante el ensayo de FRAP empleando sulfato ferroso a concentraciones entre 25 y 1000 $\mu\text{mol/L}$. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3)..	62
Figura 24. Poder antioxidante reductor férrico del AXF extraído y de la vitamina C a diferentes concentraciones. Los valores se presentan como la media \pm D.E. (n=3).....	63
Figura 25. Capacidad de adsorción de glucosa del AXF en soluciones de diferente concentración de glucosa anhidra. Los resultados se expresan como la media \pm D.E (n=3).....	65
Figura 26. Capacidad de inhibición de la difusión de glucosa de diferentes concentraciones de AXF, control y control positivo evaluada en diferentes tiempos. Los resultados se expresan como la media \pm D.E (n=3).....	66
Figura 27. Resultados de inhibición de α -amilasa del AXF y acarbosa. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Solubilidad en solventes de diferente polaridad del AXF extraído	44
Tabla 2: Caracterización fisicoquímica del AXF extraído por el método de peróxido de hidrógeno alcalino	46
Tabla 3: Distancias de migración, valores Rf y RG de los monosacáridos presentes en las muestras sembradas.....	50
Tabla 4: Resultados de la inhibición del radical DPPH• del AXF extraído y estándar de Trolox	58
Tabla 5: Resultados de la inhibición del radical ABTS ^{•+} del AXF extraído y estándar.....	59
Tabla 6: Resultados de absorbancia del AXF extraído y Ácido Ascórbico	61
Tabla 7: Resultados de absorbancia del AXF extraído y Sulfato Ferroso	61
Tabla 8: Capacidad antioxidante del AXF extraído determinado por los ensayos de DPPH•, ABTS ^{•+} y FRAP	64
Tabla 9: Capacidad de adsorción de glucosa del AXF	65
Tabla 10: Capacidad de inhibición de α -amilasa	67
Tabla 11: Valores IC ₅₀ para la inhibición de la enzima α -amilasa del AXF extraído y la acarbosa.....	68

ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido ferúlico
AMP	Adenosín monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
AX	Arabinoxilano
AXF	Arabinoxilano ferulado
BCJ	Bagazo de chicha de jora
CJ	Chicha de jora
DM T2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidasa IV
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EN	Estrés nitrosativo
EO	Estrés oxidativo
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FRAP	Poder antioxidante reductor del hierro
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagón
GP	Glutathion peroxidasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IMC	Índice de Masa Corporal
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MC	Membrana Celular
OMT	O-metil transferasa
p.s.	Peso seco
PGH	Producción de Glucosa Hepática
PPARγ	Receptor activado por proliferador peroxisoma
RL	Radicales libres

SOD	Superóxido dismutasa
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox
UDP-Araf	UDP- Arabinofuranosa
UDP-Arap	UDP-Arabinopiranososa
UDP-D-Xil	Uridin-difosfoxilosa
UDP-L- Ara	Uridin-difosfoarabinosa

RESUMEN

El bagazo es un subproducto generado durante el proceso de elaboración de la bebida tradicional andina chicha de jora (CJ) y es una fuente potencial para la extracción del arabinoxilano ferulado (AXF). En el presente trabajo, se llevó a cabo la extracción y caracterización del AXF del bagazo, y se determinó su capacidad antioxidante y antihiperlipémica *in vitro*. El AXF extraído de peso molecular $\geq 3,5$ kDa presentó resultados de contenido de humedad, pH, cenizas totales, proteínas y contenido fenólico total con valores de 8,00 %; 5,81; 2,68 %; 3,78 % y 5,72 mg EAG/g p.s.; respectivamente. La cromatografía en capa fina permitió identificar los monosacáridos L-Arabinosa y D-Xilosa. El análisis por HPLC-MS/MS del AXF luego de la metanólisis demostró un perfil de fragmentación correspondiente a metil-pentofuranosidos o metil-pentopiranosidos. El espectro FT-IR presentó bandas características del AXF. El AXF mostró capacidad antioxidante determinada por los ensayos de DPPH[•] (IC₅₀ 6,59 mg/mL, TEAC 7,7844 μ mol/g muestra), ABTS^{•+} (IC₅₀ 6,50 mg/mL y TEAC 35,34 μ mol/g muestra) y FRAP (Valor FRAP 14,08 μ mol AA/g y 36,63 μ mol FeSO₄/g). Adicionalmente, el AXF presentó capacidad de adsorción de glucosa, inhibición de la difusión de glucosa e inhibición de la enzima α -amilasa (IC₅₀ 4,73 mg/mL) *in vitro*. Los resultados demostraron que el AXF extraído a partir del bagazo generado durante la elaboración de la CJ presenta capacidad antioxidante y antihiperlipémica *in vitro*.

Palabras clave: Arabinoxilano ferulado, bagazo, chicha de jora, antioxidante e antihiperlipémica.

ABSTRACT

Bagasse is a by-product generated during the process of making the traditional Andean drink named chicha de jora (CJ) which is a potential source for the extraction of ferulated arabinoxylan (AXF). The aim of this study was to extract and characterize the AXF from bagasse, and determinate antioxidant and antihyperglycemic capacity *in vitro*. As results, AXF of molecular weight ≥ 3.5 kDa presented moisture content, pH, total ash, proteins and total phenolic content with values of 8.00 %; 5.81; 2.68 %; 3.78 % and 5.72 mg EAG/g ps; respectively. Thin layer chromatography identified the monosaccharides L-Arabinose and D-Xylose. HPLC-MS / MS analysis of AXF after methanolysis confirmed the presence of methyl-pentofuranosides or methyl-pentopyranosides. The FT-IR spectrum presented characteristic bands of AXF. The AXF showed antioxidant capacity determined by the DPPH[•] assay (IC_{50} =6.59 mg / mL, TEAC 7.7844 μ mol / g sample), ABTS^{•+} (IC_{50} =6.50 mg / mL and TEAC 35.34 μ mol / g sample) and FRAP (14.08 μ mol AA / g and 36.63 μ mol FeSO₄ / g). On the other hand, AXF showed glucose adsorption capacity, inhibition of glucose diffusion and inhibition of the enzyme α -amylase (IC_{50} =4.73 mg / mL). The results showed that the AXF extracted from the bagasse generated during the production of the CJ have antioxidant and anti-hyperglycemic capacity *in vitro*.

Key words: Ferulated arabinoxylan, bagasse, chicha de jora, antioxidant and antihyperglycemic.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Planteamiento del problema

En el Perú la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria vienen utilizando los recursos naturales propios de la biodiversidad peruana para elaborar productos con valor agregado. Los recursos naturales pasan a lo largo de una cadena de valor de producción en la que se generan derivados o subproductos residuales que en su amplia mayoría simplemente se eliminan; sin embargo, su aprovechamiento puede generar interés farmacéutico, alimentario y cosmético dependiendo de su origen¹. Por ejemplo, el uso del maíz (*Zea mays*) en la producción industrial de almidón, aceite, alcohol-combustible, harinas y sémolas genera un subproducto, el salvado de maíz; el cual posee componentes con propiedades biológicas y su aprovechamiento supone disminución en la eliminación de residuos, mayor eficiencia y aumento de la sostenibilidad del proceso productivo. Actualmente, se ha extraído bioactivos a partir de subproductos como el salvado de maíz, salvado de trigo, rastrojos de cebada y cáscara de soya, lo cual ha beneficiado económicamente a la empresa por el agregado de valor a los subproductos o residuos generados.

Durante la producción artesanal e industrial de la chicha de jora (CJ) se genera un subproducto denominado bagazo de la chicha de jora (BCJ), mismo que es empleado como alimento para animales o es desechado. Por lo cual la reutilización de este subproducto fundamentado en el potencial biológico del bioactivo que contiene (polisacárido no amiláceo), contribuye a que el BCJ se convierta en un residuo aprovechable y de valor agregado para el sector artesanal e industrial que elabora CJ. Además de ayudar a revalorar a la bebida tradicional andina CJ. Hasta la fecha, no se ha planteado el aprovechamiento de este subproducto debido a que no existe ningún reporte en la literatura científica que avale sus beneficios potenciales, desconociéndose, por lo tanto, la factibilidad de poder extraer un bioactivo a partir de este subproducto. Por esta razón, en el presente trabajo de investigación se planteó extraer el arabinoxilano ferulado (AXF) del BCJ y evaluar su capacidad antioxidante y antihiperlipémica *in vitro*.

I.1.1. Formulación del problema

¿El arabinoxilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la “chicha de jora” posee capacidad antioxidante y antihiperlipémica *in vitro*?

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante y antihiperlipémica *in vitro* del arabinoxilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la “chicha de jora”.

I.1.1. Objetivos específicos

1. Obtener el arabinoxilano ferulado por el método de peróxido de hidrógeno alcalino a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la “chicha de jora”.
2. Caracterizar el arabinoxilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la “chicha de jora” por métodos fisicoquímicos y espectrofotométricos.
3. Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del arabinoxilano ferulado extraído mediante los ensayos de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH^{*}), ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzo-tiazolína-6-sulfónico) (ABTS^{**}) y poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).
4. Determinar la capacidad antihiperlipémica *in vitro* del arabinoxilano ferulado extraído mediante los ensayos de capacidad de adsorción de glucosa (CAG), inhibición de difusión de glucosa e inhibición de la enzima α -amilasa.

I.3. Importancia y alcance de la investigación

Los resultados de esta investigación permiten que la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética considere al AXF extraído del BCJ como una materia prima con excelentes propiedades fisicoquímicas que podría ser considerado como agente viscosante, agente emulsionante, agente preservante y formador de sistemas nanoparticulados de liberación controlada de drogas; pero también, como ingrediente farmacéuticamente activo por las propiedades biológicas que se le atribuyen. Por otra parte, los resultados favorables de esta investigación permiten que la empresa artesanal e industrial (nacional o extranjera) productora de la CJ disminuya la generación de residuos, optimice el desarrollo de sus procesos e incluso mejore las oportunidades en la generación de ingresos considerando el alto valor agregado del bioactivo extraído a partir del residuo de bagazo derivados de la elaboración de la CJ el cual posee una potencial aplicación en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Asimismo, permite que la población pueda conocer y obtener un producto de origen natural y de bajo costo, como una alternativa novedosa para neutralizar los efectos desencadenados por la formación de radicales libres (envejecimiento, inflamación, cáncer, etc) producto del actual estilo de vida. Además, el AXF puede contribuir en mitigar los desórdenes metabólicos de carbohidratos característicos de un cuadro diabético, cuya tasa de incidencia en nuestro país viene incrementándose. Complementariamente el presente estudio sirve como antecedente para la formulación de nuevas y futuras investigaciones que busquen añadir valor agregado al residuo de BCJ y que busquen nuevas fuentes de recursos con potenciales propiedades biológicas, ya que la metodología empleada en este estudio puede orientar su desarrollo.

Este trabajo de investigación inicia con la obtención de los residuos de BCJ proporcionados amablemente por una empresa del sector privado hasta la extracción del AXF y evaluación *in vitro* de su capacidad antioxidante y antihiperlipémica.

I.4. Limitaciones de la investigación

El presente trabajo de investigación está limitado al AXF extraído a partir de los residuos de BCJ desecados mediante estufa y de un peso molecular $\geq 3,5$ kDa. Por lo cual, no se abarca la caracterización fisicoquímica de los residuos de bagazo per se.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

II.1.1. Arabinoxilano ferulado (AXF)

El AXF es un heteropolisacárido hemicelulósico no amiláceo encontrado principalmente en la pared celular de los granos de cereales como el maíz, trigo, cebada, avena, arroz y centeno; asimismo, forma parte del complejo de carbohidratos que no pueden ser catabolizados por enzimas endógenas, considerándose un elemento importante de la fibra dietaria^{2,3}. El AXF se encuentra ligado por interacciones covalentes y no covalentes con otros componentes de la pared celular como microfibrillas de celulosa, β -glucanos, pectina, lignina y proteínas; conformando una compleja red que otorga rigidez e integridad de la pared celular⁴. Por otra parte, este polisacárido presenta variabilidad de sus características fisicoquímicas y actividad biológica en función de la especie de cereal fuente y su genotipo. Además, de las condiciones ambientales de exposición durante las etapas de crecimiento y maduración del grano⁵.

II.1.1.1. Estructura química

El AXF está constituido por una cadena lineal de monosacáridos β -D-xilano piranosos (Xilp) unidos mediante enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ glicosídicos y puede estar mono o disustituido lateralmente con residuos de α -L-arabinofuranosa (Araf) unido por enlace glucosídico $\alpha(1 \rightarrow 2)$, $\alpha(1 \rightarrow 3)$ ⁶ y/o $\alpha(1 \rightarrow 5)$ ^{7,8}. Se han encontrado sustituciones pocas frecuentes de ácido α -D-glucurónico en posición $C(O) - 2$ o su derivado ácido metil D -glucurónico en $C(O) - 4$ ^{9,10}, entre otros sustituyentes menos frecuentes están: D -galactosa, D -glucosa y

residuos de grupos acetilos¹¹. Adicionalmente, el ácido 5-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido ferúlico, AF) puede incorporarse al polisacárido a través de un enlace éster entre el ácido carboxílico de su estructura y el alcohol primario del residuo de *Araf* en el carbono 5^{2,12} (ver Figura 1). El AF es el ácido hidroxicinámico característico del AXF; en los cereales, el 90% de este componente fenólico se encuentra unido al AX¹³; sin embargo, el ácido *p*-coumárico y sinapínico también tienen la capacidad de formar enlaces éster en la misma posición de la cadena¹¹.

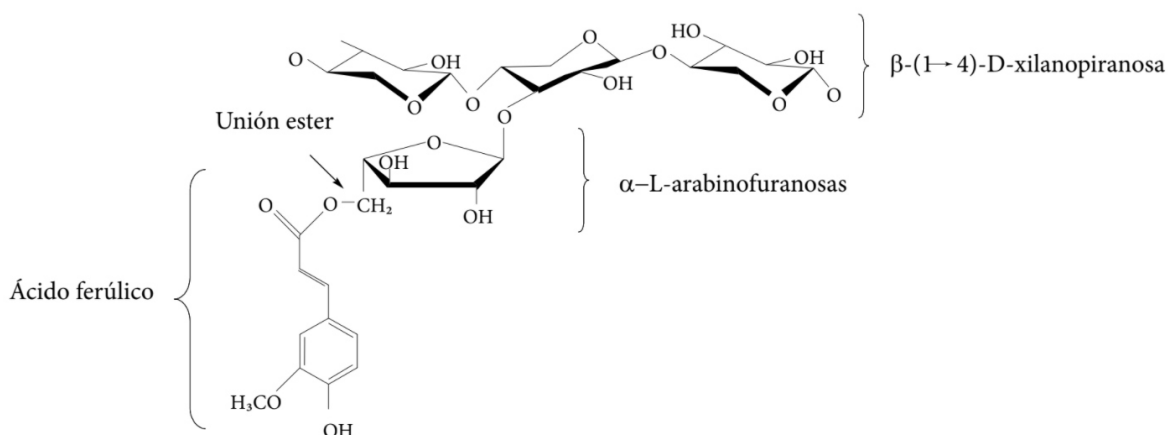


Figura 1. Estructura química del arabinoxilano ferulado¹⁴.

II.1.1.2. Biosíntesis

La biosíntesis de este polisacárido se lleva a cabo en el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático de la célula vegetal. Las principales enzimas implicadas son la xilosiltransferasa y arabinosiltransferasa^{8,15}. El transporte de los monosacáridos de xilosa y arabinosa es realizado por uridin-difosfoxilosa (UDP-D-Xil) y uridin-difosfoarabinosa (UDP-L-Ara), respectivamente.

El proceso de polimerización del AX se inicia con la actividad de la enzima xilosil transferasa o xilanosintasa transfiriendo xilosa de la UDP-D-Xil a una cadena de xilooligosacárido exógena la cual se va formando por acoplamiento de estos monosacáridos mediante enlaces glicosídicos⁸. Para la formación de *Araf*, la síntesis de *novo* indica que la UDP-L-Arap proviene de la UDP-D-Xil transformada por la enzima UDP-Xil-4 epimerasa (UXE1) en el lumen del aparato de Golgi¹⁶. Por otro lado, la vía alternativa de rescate implica la obtención de UDP-L-Arap a partir de arabinosa libre, producto de la degradación y

metabolismo de carbohidratos por acción de las enzimas arabinoquinasa y azúcar-UDP pirofosforilasa. Debido a que en las plantas la arabinosa se encuentra bajo la forma de furanosa, la UDP-Arap es transportada al citosol para ser convertida a UDP- Arabinofuranosa (UDP-Araf) a través de la enzima UDP-Ara mutasa; posteriormente regresa al golgiso para introducir los residuos de arabinosa en la cadena de xilosas¹⁷, se propone que esta sustitución es mediada a través de arabinosiltransferasa; sin embargo, aún se requieren más estudios para identificar las enzimas involucradas en la biosíntesis del AXF¹⁸.

Se reconocen dos posibles donantes del feruloilo: el ácido ferúlico proveniente del ácido cafeico mediante la acción de una O-metil transferasa (OMT) o producto del coniferaldehído por la coniferaldehído deshidrogenasa (ALDH); y el FeruloilCoA, producido por la Cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT) a partir de CafeoilCoA. La literatura expone que el grupo feruloilo puede acoplarse tanto al arabinoxilano como a la UDP-Araf y que puede ser mediada por feruloiltransferasas, familia genética de aciltransferasas BAHD¹⁵. La unión del feruloilo a los arabinoxilanos puede llevarse a cabo dentro del sistema de endomembranas, pero también en la pared celular⁸.

II.1.1.3. Clasificación del arabinoxilano

De acuerdo con su solubilidad, el AX se clasifica en dos tipos: arabinoxilano extraíble y no extraíble en agua.

II.1.1.3.1. Arabinoxilano extraíble en agua (AXEA)

El AXEA es soluble en agua a temperatura de ambiente o menor a 40 °C⁵. Presenta una débil interacción con componentes de la pared celular de los cereales, por lo que se extraen fácilmente en agua. Además, presenta un bajo peso molecular que puede estar en el rango de 10 a 10 000kDa, mientras que los arabinoxilanos no extraíbles en agua superan estos valores¹⁹. Estos presentan una mayor proporción de monosacáridos arabinosa y xilosa (Ara/Xil), debido al mayor grado de sustitución con arabinosas se favorece la interacción del polisacárido con las moléculas de agua. Cuando la proporción Ara/Xil llega al valor

límite de 0,43, la solubilidad disminuye abruptamente; por otro lado, otros autores señalan que en una proporción de 0,1 este polisacárido precipita¹⁴. El AXEA se encuentra en el endospermo del grano de los cereales en una cantidad de 0 a 3 % (p/p). En especies como el trigo, el endospermo y el salvado presentan entre 6 % y 30 % de AXEA, respectivamente¹¹.

II.1.1.3.2. Arabinoxilano no extraíble en agua (AXNA)

El AXNA no se puede extraer fácilmente con tratamiento acuoso debido a la fuerte interacción de naturaleza covalente y no covalente con otros constituyentes de la pared celular como celulosa, lignina y proteínas. Para lograr su separación es necesario realizar hidrólisis con ácidos o álcalis, a elevadas temperaturas. Se localizan en la capa aleurona y pericarpio, esta última concentra el mayor contenido de AXNA entre 20 y 30 % (p/p)¹⁴.

II.1.1.4. Interacción del AXF con otros constituyentes de la pared celular

Los principales constituyentes de la pared celular son la celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina e incluso proteínas. Básicamente, la celulosa presenta un esqueleto sobre el cual se asocian los demás componentes²⁰.

La celulosa puede asociarse al AX en regiones lineales no sustituidas de las cadenas mediante interacción hidrófoba, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, un xilano lineal no sustituido favorece la adsorción del AX a la celulosa²¹. La asociación entre AXFs continuos se origina a través de enlaces covalentes entre AFs por puentes de ácido diferúlico que forman deshidrodímeros, isómeros de deshidrotrímeros y tetrámeros^{15,22-25}. El AX se enlaza de forma covalente a través de enlace éter – éster con la lignina^{24,26}. Las proteínas y el AX se unen por uniones amida principalmente entre la tirosina y el ácido ferúlico. Se ha evidenciado una interacción por puentes de hidrogeno entre AXEA y β -glucanos, sugiriéndose interacción cadena-cadena con la formación de un complejo xilano/ β -glucano¹⁸.

II.1.1.5. Métodos de extracción

Entre los métodos de extracción del AX se destacan la extracción acuosa, química, enzimática y otros del tipo mecánico. Las uniones covalentes y no covalentes entre los componentes de la pared celular determinan la liberación de polisacárido y el rendimiento final de la extracción.

La extracción acuosa permite la extracción del AX soluble en agua, que se encuentra interactuando en la matriz de la pared celular principalmente por puentes de hidrógeno. Por lo general, se realiza a bajas temperaturas, pero el aumento de la temperatura de extracción incrementa el rendimiento. Se reportan rendimientos de 1 % o menores²⁷.

En la extracción química se rompen puentes de hidrógeno y también enlaces covalentes tipo éster²⁸. El tratamiento con álcali (NaOH, KOH, Ca(OH)₂, Ba(OH)₂) es el más empleado. Adicionalmente, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es agregado al tratamiento con álcali para favorecer la delignificación, el anión activo hidropéroxido produce la oxidación de los constituyentes de la lignina y la posterior liberación del AX. En estudios recientes se ha empleado solución de amoníaco el cual actúa selectivamente sobre los enlaces C-O-C de lignina, y enlaces éster y éter en complejos lignina-carbohidrato²⁹.

En el método enzimático, la principal enzima empleada es la 1,4- β -endoxilanasas; la cual rompe los enlaces glicosídicos β (1 - 4) de la cadena lineal de xilasas. Entre otras xilasas utilizadas en este procedimiento se encuentran: α -L arabinofuranosidasa, β -D xilosidasa y feruloil esterasa³⁰. La acción de las xilasas despolimeriza los AXEA y solubiliza los AXNA para lograr su extracción. En un estudio se concluyó que aplicar enzimas como α -L arabinofuranosidasa y la feruloil esterasa, que ejercen su acción sobre los residuos de arabinofuranósidos y los enlaces éster, respectivamente, puede mejorar la bioactividad del AX³¹.

II.1.1.6. Potenciales aplicaciones del arabinoxilano

En la industria farmacéutica, el AXF puede usarse como matriz de liberación controlada y agente encapsulante de bacterias probióticas debido a su elevada capacidad gelificante³². En la industria alimentaria es utilizado como agente estabilizante y aditivo, debido a sus características fisicoquímicas presenta la capacidad de estabilizar emulsiones mediante el incremento de la viscosidad de la fase continua¹⁹. Adicionalmente, el AXF puede ser agregado como ingrediente en alimentos funcionales³³. Se conoce que a nivel del colon el AX es degradado mediante hidrólisis enzimática a arabino-xilooligosacárido (AXO), el cual posee capacidad prebiótica^{34,35} cumpliendo con los criterios de no ser digeribles, ser fermentables por la microbiota del intestino y estimular selectivamente el crecimiento de bacterias beneficiosas para la salud³⁶.

En otras industrias se ven implicados en la producción de biocombustibles; en la producción de papel actuando como material reforzante y en los envases se utilizan como películas que actúan de barrera al oxígeno³³.

II.1.2. La chicha de jora (CJ)

La CJ es una bebida alcohólica tradicional andina clara, amarillenta, efervescente y con contenido alcohólico bajo, por lo general menos de 5%³⁷. Para su elaboración se emplea principalmente el maíz amarillo, el cual es germinado, triturado y fermentado hasta obtener un líquido final, la CJ. Al maíz germinado popularmente se le conoce como maíz de jora. En la actualidad, la producción de chicha de jora aún no está industrializada, llevándose a cabo en lugares de producción artesanal denominadas chicherías³⁸.

II.1.2.1. Maíz de jora y la germinación

El grano de maíz es una monocotiledónea que sufre germinación del tipo hipógea, cuyo endospermo sufre poca modificación y actúa como un tejido de absorción, digestión y de transporte de nutrientes hacia el embrión. A diferencia de las dicotiledóneas en las que el endospermo se encoge y son los cotiledones quienes cumplen las funciones antes mencionadas. El maíz de jora es la materia

prima principal usada en la elaboración de la CJ y es obtenida por un proceso de germinación del grano de maíz (en su mayoría de la variedad amarilla). La germinación tiene como objetivo sintetizar una maquinaria enzimática para descomponer la pared celular, degradar proteínas y almidón³⁹.

II.1.2.1.1. Bioquímica de la germinación del maíz

El proceso de germinación inicia por imbibición de agua sobre el pericarpio del grano. El embrión produce ácido giberélico (AG) una fitohormona que estimula la elongación celular y su crecimiento. Es sugerido que el AG causa una supresión en la actividad de la enzima peroxidasa evitando la dimerización de residuos de ácido ferúlico lo que origina menor interacción intermolecular en la red de hemicelulosa, favoreciéndose la expansión de la pared celular⁴⁰. El AG difunde hacia el cotiledón y aleurona pasando por el endospermo, y es en el cotiledón donde inicia la producción de la maquinaria enzimática. Las enzimas α -amilasa y β -amilasa inician su actividad hidrolizando el almidón mientras la β -glucanasa hidroliza β -glucanos y al arabinosilano de la pared celular exponiendo componentes proteicos que son degradados por enzimas proteolíticas y peptidasas⁴¹. De esta manera se proporcionan nutrientes y componentes estructurales para formar las primeras raíces del grano. A partir de la radícula (raíz germinal) se forman entre 3 a 4 raíces primarias⁴².

II.1.2.2. Elaboración

La elaboración de la CJ se puede agrupar en tres grandes etapas (ver Figura 2):

1. **Etapa inicial de germinación:** Los granos de maíz se remojan en agua entre 12 y 18 h, son cubiertos con plástico y/o telas para retener humedad y favorecer la producción de calor (aprox. 6 – 8 días). El proceso concluye cuando los granos presentan raicillas entre 5 y 10 cm de longitud, y un sabor dulce. Se exponen al sol para el secado (entre 2 y 3 h), y se trituran, tradicionalmente se utilizan rocas denominadas

batan. El tiempo de germinado y secado varía en función de las condiciones climáticas, temperatura, humedad, altitud⁴³.

2. Etapa intermedia de pretratamiento para la fermentación: El maíz de jora triturado es llevado a ebullición por una a dos horas bajo agitación, es posible agregar haba y cebada tostada, canela, clavo de olor, quinua, cascara de piña, trozos de naranja y esencias de hierbas⁴⁴. Seguidamente, es enfriado parcialmente y tamizado con ayuda de un colador o tela. La masa de residuos del grano que quedan luego del filtrado es lo que se conoce como bagazo, afrecho o *sutuchi* y es empleado como alimento para animales.

3. Etapa final de fermentación: EL líquido filtrado es colocado en recipientes de barro y son los microorganismos presentes en las paredes laterales del recipiente que inician la fermentación espontánea aproximadamente durante 3- 6 días. Las bacterias *Lactobacillus* y *Leuconostoc* son los actores principales en esta etapa⁴⁴. Una vez terminada la fermentación la bebida esta lista para consumir⁴⁵.

Cabe resaltar que la elaboración de la CJ es un proceso arduo y laborioso que varía ampliamente a lo largo de la región andina.

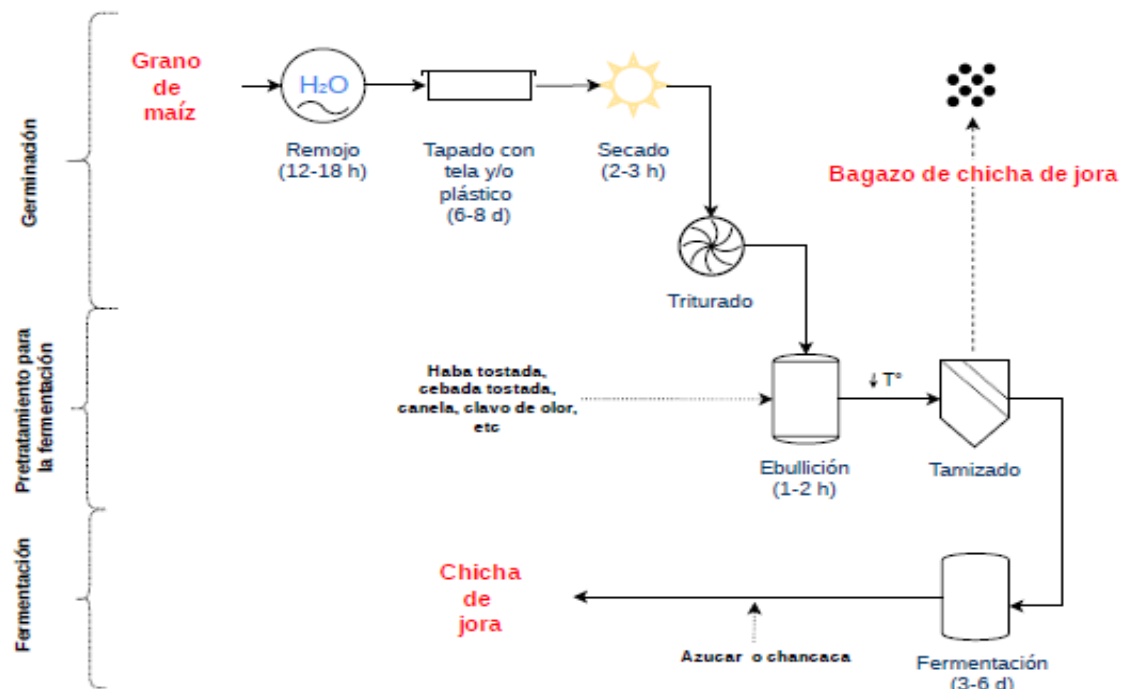


Figura 2. Etapas para la elaboración de la CJ artesanal (Elaboración propia).

II.1.3. Antioxidantes y radicales libres (RL)

II.1.3.1. Los RL y sus formas de producción

Los RL son aquellos átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, capaces de tener existencia independiente. Su reactividad, vida media e inestabilidad se relacionan con el número de electrones impares que posee. Los RL se estabilizan atrayendo electrones de otros compuestos, mecanismo asociado a su alta reactividad, el compuesto que pierde su electrón se convierte en RL generándose así una serie de reacciones en cadena. Los principales RL son las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Dentro de las ERO se tiene al radical hidroxilo (OH^{\bullet}), anión superóxido (O_2^-) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y como ERN se incluye al óxido nítrico (NO^{\bullet}), catión nitrosil (NO^+) y otros⁴⁶.

Los RL se pueden producir por fenómenos endógenos (metabolismo oxidativo basal, ejercicio intenso, mediadores inflamatorios como prostaglandinas, y reacciones enzimáticas como la reacción de Fenton) o por fuentes exógenas (radiación ionizante, contaminación ambiental, pesticidas, medicinas, cigarrillos)⁴⁷.

II.1.3.2. Estrés oxidativo (EO) y estrés nitrosativo (EN)

El EO es un estado alterado del equilibrio entre la producción de ERO y los mecanismos antioxidantes que la evitan, en la que existe una inclinación hacia la producción. Esta pérdida de equilibrio se relaciona con el aumento excesivo de RL y/o con la incapacidad de los mecanismos antioxidantes para evitar que aumenten, pudiendo ocasionar una alteración grave en los sistemas biológicos si ocurre a gran escala y por largo periodo de tiempo. El estrés nitrosativo ocurre de manera análoga, pero tiene como agentes desencadenantes a las ERN⁴⁸.

II.1.3.3. Dianas moleculares de los RL

Las ERO y ERN al ser altamente reactivas pueden dañar macromoléculas tales como lípidos, proteínas, ADN y ARN⁴⁹.

- ✓ **Lípidos:** La oxidación se da principalmente en lípidos poliinsaturados por poseer dobles enlaces con hidrógenos reactivos mediante el proceso llamado peroxidación lipídica. La reacción inicia por ataque de un radical sobre el grupo metileno (CH₂) del lípido (LH) formándose un radical lipídico (L[•]) que reacciona con el O₂ para generar un radical peroxil lipídico (LOO[•]), y finalmente luego de una serie de reacciones se genera el tóxico malondialdehído. La peroxidación lipídica puede disminuir la fluidez de la membrana y/o inactivar a receptores o enzimas unidas a la membrana⁴⁹.

- ✓ **Proteínas:** La oxidación de las proteínas puede originar formación de uniones proteína-proteína, desnaturalización e inactivación de proteínas transportadoras y de enzimas. Los aminoácidos de metionina y cisteína son más susceptibles de ser oxidados, pero también son los únicos que pueden reducirse por acción enzimática. Los grupos carbonil en las proteínas son indicadores de su oxidación⁴⁹.

- ✓ **ADN:** El ADN mitocondrial es más susceptible de ser atacado por RL debido a su cercanía con el principal centro de producción de ERO. El OH^{*} actúa directamente sobre las bases nitrogenadas originando ruptura en la cadena bicatenaria del ADN. La 8-hidroxi deoxiguanosina (aducto de purina y del OH^{*}) es el principal biomarcador de daño oxidativo del ADN asociado a carcinogénesis, mutagénesis y envejecimiento⁴⁹.

- ✓ **ARN:** El ARN al ser monocatenario, no presentar mecanismos activos de reparación y poseer menor protección proteica que el ADN es mucho más susceptible de ser atacado por ERO. La 7, 8-dihidro-8-oxo-guanosina es un biomarcador de daño del ARN⁴⁹.

II.1.3.4. Antioxidantes

Los antioxidantes son cualquier sustancia con una alta capacidad de interactuar con RL y contrarrestar sus efectos dañinos. Los antioxidantes pueden ser endógenos [superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CT), glutatión peroxidasa (GP), glutatión, vitamina C, entre otros] y exógenos (compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas y minerales como selenio y zinc). Los antioxidantes exógenos ayudan a compensar el déficit o acción fallida de los endógenos⁵⁰.

II.1.3.4.1. Líneas de defensa antioxidante⁵¹

Teniendo en consideración el nivel de respuesta defensiva en los sistemas biológicos, los antioxidantes pueden ser de primera, segunda, tercera y cuarta línea de defensa.

1. Primera línea de defensa antioxidante

Este grupo evita o suprime la formación de RL de manera rápida e inmediata. Incluyen a tres enzimas clave: la SOD (citosólica con cofactor cobre/zinc y mitocondrial con cofactor de manganeso), CT (peroxisomal) y GP (mitocondrial). Además de proteínas de unión a metales como la transferrina y ceruloplasmina las cuales quelan al hierro y cobre respectivamente.

2. Segunda línea de defensa antioxidante

Estos capturan y neutralizan RL por donación de electrones convirtiéndose ellos mismos en RL, pero menos dañinos o fácilmente neutralizables. La mayor parte de antioxidantes tales como el ácido ascórbico (vitamina C), glutatión y ácido úrico de naturaleza hidrofílica, y la vitamina E (tocoferol) y ubiquinol de naturaleza hidrofóbica pertenecen a esta categoría.

3. Tercera línea de defensa antioxidante

Esta clase de antioxidantes actúan solo frente al daño ya causado por los RL sobre las biomoléculas, son conocidas como las enzimas *de novo*. Su acción incluye degradar y eliminar proteínas alteradas. Ejemplos comunes son las enzimas reparadoras del ADN (polimerasas y nucleasas) y enzimas proteolíticas (proteasas y peptidasas) ambos ubicadas en el citosol y mitocondria.

4. Cuarta línea de defensa antioxidante

Estos antioxidantes evitan la producción y reacción de RL mediante el uso de la cascada de señalización producida para la generación de radicales libres. La señalización induce la generación y transporte del antioxidante apropiado al sitio de acción correcto.

II.1.4. Medicamentos para la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM T2)

II.1.4.1. DM T2

La DM T2 llamada también no insulino-dependiente o de adultos, se define como un trastorno metabólico diferenciado por un estado de hiperglucemia crónica asociada con la alteración de la secreción y/o acción de la insulina. La etiología de la DM T2 tiene un fuerte componente genético, aunque también la

epigenética, edad (> 45 años), IMC (> 25 Kg/m²) y comorbilidades son factores que la predisponen⁵².

II.1.4.1.1. Criterios para el diagnóstico de la diabetes

La Asociación Americana de la Diabetes (ADA)⁵³ considera como criterios para diagnosticar la diabetes a los siguientes: a) Glucosa plasmática en ayuno \geq 126 mg/dL (7,0 mM), o b) Glucosa plasmática en 2 horas \geq 200 mg/dL (11,0 mM) durante el test de tolerancia a la glucosa oral, o c) HbA1C \geq 6,5 %, o d) Síntomas clásicos de hiperglucemia más concentración de glucosa sanguínea aleatoria \geq 200 mg/dL (11,0 mM). Para el diagnóstico las pruebas de glucemia en ayuno, glucemia luego de la administración de glucosa oral y la HbA1C requieren 2 resultados anormales de la misma muestra o en 2 pruebas diferentes, con síntomas de hiperglucemia inequívoca.

II.1.4.1.2. Fisiopatología de la DM T2⁵⁴

La DM T2 se produce debido a que la acción de la insulina no mantiene las concentraciones de glucosa dentro del rango normal. La acción de la insulina está determinada por la función de las células β pancreáticas (relacionada a la concentración de insulina en sangre y su efecto) y por los tejidos diana tales como el músculo, tejido adiposo e hígado (relacionado con la resistencia de estos tejidos hacia la insulina).

- a. Alteración de la función de las células β :** La reducción en la sensibilidad de las células β a la glucosa y la disminución en la respuesta a estímulos como las hormonas insulino-trópicas del intestino genera que se tenga cantidades insuficientes de insulina en la sangre. Existe también una disminución crónica de la masa y función de las células β , añadido a una excesiva secreción de glucagón.

- b. Resistencia a la insulina:** Es la falta de capacidad de la insulina en concentraciones normales de generar la respuesta esperada. La resistencia se basa en una menor captación de glucosa plasmática

principalmente por el músculo y tejido adiposo (en la cual ocurre mayor lipólisis y liberación de ácidos grasos). La resistencia en el hígado se refiere a la disminución en la supresión de glucosa hepática. La adiposidad favorece la resistencia a la insulina, y a nivel intracelular los lípidos interrumpen la señalización de la insulina. A nivel celular, la resistencia a la insulina involucra una alteración dentro de la cascada de señalización desde el receptor de tirosina quinasa de insulina hasta la translocación de los transportadores GLUT-4.

- c. Desregulación del metabolismo hepático de la glucosa:** El hígado se hace resistente a la acción de la insulina con lo cual pierde la capacidad de suprimir la producción de glucosa hepática (PGH) y de promover la síntesis de glucógeno después de las comidas, además existe descenso en la captación de glucosa hepática. El exceso de glucagón e insuficiente insulina favorecen esta desregulación. El glucagón y la resistencia favorecen la glucogénesis y glucogenólisis hepática elevada, así como un incremento de glucosa en ayuno. El efecto lipogénico de la insulina se mantiene, lo que puede generar esteatosis hepática.

II.1.4.1.3. Complicaciones de la DM T2

La hiperglucemia no controlada crónica puede llevar a complicaciones microvasculares especificadas y macrovasculares no específicas. Las complicaciones microvasculares incluyen a la retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética. Las macrovasculares se asocian a la aterosclerosis, tales como infarto de miocardio y derrame cerebral⁵⁴.

II.1.4.2. Medicamentos antidiabéticos orales⁵⁵

Son medicamentos orales empleados para tratar la DM T2 cuando los cambios en el estilo de vida no son suficientes para alcanzar los objetivos de la terapia.

II.1.4.2.1. Clasificación

Los antidiabéticos orales se pueden clasificar en dos grupos conocidos como los agentes hipoglucemiantes y antihiperoglucemiantes.

II.1.4.2.1.1. Los agentes hipoglucemiantes

Actúan aumentando la secreción de insulina y una dosis alta puede causar que la glucemia caiga por debajo de lo normal. En este grupo se incluye a las sulfonilureas y a las meglitinidas.

a. Sulfonilureas (*Gliburida o glibenclamida, glipizida, glimepirida*)

Mecanismo de acción: Estimulan la liberación de insulina al unirse a la subunidad SUR1 del canal de K⁺ dependiente de ATP causando su bloqueo y despolarizando la MC. La despolarización causada facilita el incrementándose el Ca⁺⁺ intracelular por apertura de su canal, lo cual conlleva al aumento en la exocitosis de insulina. *Reacción adversa a medicamentos (RAM):* Hipoglucemia, aumento de peso, ictericia colestática, anemia aplásica y hemolítica. *Información de importancia clínica:* Contraindicado en embarazo y lactancia. Requiere ajuste de dosis en insuficiencia hepática/renal.

b. Meglitinida o glinidas (*Repaglinida y nateglinida*)

Mecanismo de acción: Aumentan la liberación de insulina mediante unión a la subunidad SUR1 del canal de K⁺ dependiente de ATP, pero la interacción se da solo con el grupo benzamídico ya que estos carecen del grupo sulfonilurea. Al tener menor afinidad su efecto hipoglucemiante es menor y tienen una acción corta. *RAM:* Hipoglucemia. *Información de importancia clínica:* La insuficiencia renal crónica no es una contraindicación. Puede ocurrir falla secundaria.

II.1.4.2.1.2. Los agentes antihiperoglucemiantes

Actúan evitando o reduciendo la hiperglicemia, pero no causan hipoglucemia. La reducción de los niveles de glucosa se logra por una

mayor captación de glucosa en los tejidos (mejora en la acción de la insulina), menor absorción de la glucosa intestinal y por disminución de la PGH. En este grupo se encuentran las biguanidinas, tiazolidinedionas, inhibidores de DPPH-4 e inhibidores de la α -glucosidasa.

a. Biguanidinas (*Metformina*)

Mecanismo de acción: Produce reducción en la PGH limitando la gluconeogénesis. En la respiración mitocondrial disminuye el ATP y aumenta el AMP activándose la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) favoreciendo la oxidación de ácidos grasos hepáticos, metabolismo no oxidativo de glucosa, aumento de la translocación del receptor GLUT-4 a la MC, reducción de lipogénesis y de gluconeogénesis. *RAMs:* Diarrea, náusea, acidosis láctica, puede provocar déficit de Vit. B₁₂. *Información de importancia clínica:* Contraindicado en pacientes con TFG < de 30 mL/min.

b. Tiazolidinedionas o glitazonas (*Rosiglitazona y pioglitazona*)

Mecanismo de acción: Activan el receptor PPAR γ lo cual genera apoptosis de grandes adipocitos para generar adipocitos pequeños que liberan menos citoquinas y ácidos grasos. Dado que estos últimos favorecen la resistencia a la insulina, las tiazolidinedionas estimulan el uso de la glucosa periférica. *RAM:* Edema periférico, insuficiencia cardíaca congestiva, aumento de peso, fracturas en mujeres y edema macular. *Información de importancia clínica:* Contraindicado en pacientes con falla cardíaca moderada a intensa.

c. Inhibidores de la DPP-4 (*Sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, vildagliptina*)

Mecanismo de acción: Inhiben a la enzima DPP-4 lo cual incrementa la concentración de los péptidos intestinales insulíntrópicos: GIP y GLP-1. Esto favorece la secreción de insulina y disminuye los niveles de glucagón. *RAM:* Dolor extremo en las articulaciones. *Información de importancia clínica:* Requiere ajuste de dosis en pacientes con insuficiencia renal

d. Inhibidores de la α -glucosidasa (Acarbosa, miglitol y voglibose)

Mecanismo de acción: Disminuyen la absorción intestinal del almidón, dextrinas y disacáridos por inhibición de la enzima del borde en cepillo intestinal α -glucosidasa. *RAMs:* Flatulencia, diarrea e hinchamiento abdominal. *Información de importancia clínica:* Contraindicado en pacientes con insuficiencia renal. No producen aumento de peso ni acción significativa en los lípidos del plasma

II.2. Antecedentes del estudio

La bebida tradicional andina CJ es producida por fermentación del grano de maíz germinado, triturado, hervido y tamizado; antes de la fermentación se genera un subproducto llamado bagazo, el cual está compuesto por restos de almidón del endospermo y residuos fibrosos del pericarpio del maíz germinado⁵⁶. La fibra de la cáscara del maíz y por ende los residuos fibrosos del bagazo de la chicha de jora (BCJ) están compuestos por polisacáridos no amiláceos, tales como la celulosa, hemicelulosa y lignina. El polisacárido hemicelulósico más representativo es el AXF, el cual puede ser aislado y derivado a un producto de alto valor agregado con potencial aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética⁵⁷. El AXF químicamente consiste en una cadena lineal de D-xilosas unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$, con sustituyentes de D-arabinosas por enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow3)$ o $\alpha(1\rightarrow2)$, o ambos; algunos sustituyentes de D-arabinosa tienen residuos esterificados de AF en posición C-5, con lo cual se da origen al AXF⁶.

En años recientes se han descrito diferentes métodos para la extracción exitosa del AXF. Ganguli y Turner⁵⁸ extrajeron el AX por el método acuoso a partir de la harina de trigo. En la investigación de Du *et al.*⁵⁹ se realizó la extracción del AXF con peróxido de hidrógeno alcalino a partir del salvado de trigo. Zhou *et al.*⁶⁰ realizaron la extracción enzimática del AXF empleando xilanasas, esta enzima hidroliza aleatoriamente la cadena lineal de xilosas. El rendimiento de la extracción y las características fisicoquímicas del AXF extraído varían en función del método de extracción empleado.

El AXF tiene propiedades biológicas reportadas en la literatura científica, tales como la actividad antioxidante, antidiabética, anticoagulante, antiinflamatoria, antimicrobiana, inmunoreguladora y anticancerígena⁶. Si *et al.*⁶¹ evidenciaron que la capacidad antioxidante del AXF extraído a partir del salvado de maíz con peróxido de hidrógeno alcalino se correlaciona proporcionalmente con la presencia de compuestos fenólicos, esto luego de evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* por los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+} y determinar el contenido fenólico total con el ensayo de Folin–Ciocalteu. Kamboj *et al.*⁶² evidenciaron que el AXF aislado del salvado de maíz tiene un potencial antioxidante superior a polisacáridos como la goma guar, goma guar sulfatada y al oligosacárido de xantano. Bernhardt *et al.*⁶³ confirmaron que la actividad antioxidante del AXF de la cáscara de maíz no solo se debe a la presencia de monómeros de AF esterificados sobre los residuos de arabinosa del polisacárido, sino también a otros compuestos fenólicos como el ácido *p*-cumárico y cinámico los cuales se encuentran en menor proporción con respecto al AF. Herrera *et al.*⁶⁴ encontraron que el tiempo de extracción afecta al contenido de ácido AF y la capacidad antioxidante del AXF, se reportó mayor poder reductor a las 2 horas de tratamiento con álcali, esto luego de usar el pericarpio de maíz obtenido por nixtamalización para extraer el AXF con álcali. Adicionalmente, Li *et al.*⁶⁵ evaluaron la capacidad antioxidante del AXF del salvado de maíz por el ensayo de peroxidación lipídica encontrándose que la presencia del AF no es el único factor que determina la capacidad reductora del AXF, ya que se observó que características como el peso molecular del polisacárido y grado de polimerización influyen de manera directamente proporcional, y que la relación de monosacáridos de arabinosa y xilosa (Ara/Xil) influye de manera inversa.

Respecto a la actividad antihiperlipémica; Huang *et al.*⁶⁶ investigaron el efecto antidiabético *in vivo* de oligosacáridos ferulados del salvado de maíz, obtenidos por suspensión en solución de ácido oxálico y ultrafiltración, en ratas macho inducidas a diabetes por estreptozotocina (STZ); concluyendo que una dosis de 600 mg/Kg/día disminuye significativamente los niveles de glucosa, insulina, LDL e incrementa los niveles de HDL. Malunga *et al.*⁶⁷ concluyeron que el AXF

del salvado de maíz tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la sucrasa y maltasa *in vitro*, y que también puede inhibir a los Transportadores de Glucosa Independientes de Sodio 2 (GLUT2) en ovocitos con sobreexpresión de GLUT2. Ha sido informado por Nie *et al.*⁶⁸ que el AXF de *Plantago asiática* mejora el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y aminoácidos en ratas inducidas a diabetes tipo II con STZ y una dieta alta en grasas.

Sin embargo, hasta la fecha, aún no existe ningún reporte en la literatura científica concerniente a la extracción del AXF a partir del BCJ. Este proyecto de investigación tiene por objetivo extraer y caracterizar fisicoquímica y espectrofotométricamente el AXF del BCJ. Además, se determinará su capacidad antioxidante y antihiperlipidémica *in vitro*.

II.3. Glosario de términos

Antioxidante: Sustancia que inhibe o retrasa reacciones de oxidación no deseadas⁶⁹, actúa indirectamente elevando las defensas antioxidantes, inhibiendo la producción de radicales libres o eliminándolos directamente⁷⁰.

Antihiperlipidémica: Agente antidiabético que reduce el elevado contenido de glucosa en sangre, pero no produce hipoglucemia⁷¹.

Arabinoxilano ferulado Es un polisacárido hemicelulósico y la principal fibra no digerible de los cereales como el trigo, arroz, centeno, maíz y avena. Se compone de una cadena de xilosa sustituida con residuos de arabinosa, a la cual se puede unir el ácido ferúlico mediante un enlace éster⁷².

Diana: Es una entidad molecular que contiene el sitio de unión de un fármaco. Un ejemplo son las proteínas de membrana o receptores, canales iónicos, enzimas, moléculas transportadoras y ácidos nucleicos⁷³.

Glucogénesis: Es el proceso de síntesis de glucógeno a partir de glucosa, el glucógeno es almacenado en la mayoría de las células hepáticas y musculares⁷⁴.

Glucogenólisis: Proceso en el que el glucógeno es degradado a glucosa-1-fosfato mediante la acción de las enzimas fosforilasa quinasa y glucógeno fosforilasa⁷⁵.

Gluconeogénesis: Proceso dado principalmente en el hígado en el que se produce glucosa a partir de sustratos no glúcidos como lactato, glicerol, piruvato y aminoácidos glucogénicos⁷⁴.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

El arabinoxilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la “chicha de jora” posee capacidad antioxidante y antihiperlipémica *in vitro*.

III.2. Variables

Variable dependiente:

Capacidad antioxidante y antihiperlipémica *in vitro*.

Variable independiente:

El arabinoxilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo de la chicha de jora.

III.3. Operacionalización de variables

La matriz de operacionalización de variables es presentada en el Anexo 1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio

Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), laboratorio de investigación sección carbohidratos.

Coordenadas en grados decimales (GD):

- Distrito: Cercado de Lima
- Provincia: Lima
- Departamento: Lima
- Latitud: -12.0561741
- Longitud: -77.0233785

IV.2. Diseño de investigación

El presente estudio corresponde a un tipo de investigación experimental, analítico y transversal.

- ✓ **Experimental:** Es experimental debido a que se empleó diferentes concentraciones de arabinosilano ferulado extraído para determinar el efecto sobre la capacidad antioxidante y antihiperlipémica.
- ✓ **Analítico:** Es analítico puesto que su finalidad fue evaluar la presunta relación causal entre diferentes concentraciones de arabinosilano ferulado extraído y la capacidad antioxidante y antihiperlipémica.
- ✓ **Transversal:** Es transversal porque los resultados de los ensayos analíticos realizados se obtuvieron en un momento temporal único.

IV.3. Población y muestra

IV.3.1. Población:

La población está conformada por residuos de bagazo derivados del proceso de elaboración artesanal de la chicha de jora del distrito de Santiago, provincia del Cusco y departamento del Cusco.

IV.3.2. Muestra

La muestra consistió en 7 kilogramos de bagazo derivados del proceso de elaboración artesanal de la chicha de jora del distrito de Santiago, provincia del Cusco y departamento del Cusco, la misma que fue muestreada por conveniencia.

Criterios de aceptación en la obtención de la muestra:

- ✓ La muestra del residuo de bagazo de chicha de jora debe ser de reciente eliminación (no mayor a las 6 horas).
- ✓ La materia prima para la elaboración del maíz germinado (jora) debe ser maíz de la variedad amarilla.

IV.4. Metodología

IV.4.1. Obtención de la muestra de BCJ y extracción del AXF

IV.4.1.1. Pretratamiento de la muestra de bagazo de chicha de jora.

La muestra del bagazo de chicha de jora fue proporcionada por la empresa Misky S.A.C. con RUC: 20526970340 (distrito de Santiago, provincia del Cusco del departamento de Cusco, Perú) (ver Anexo 2), previo muestreo por conveniencia. Inmediatamente, la muestra fue secada a temperatura ambiente durante 72 horas. Luego, se envolvió en papel Kraft y se acondicionó para su transporte por vía terrestre al Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM (Lima-Perú), laboratorio de investigación sección carbohidratos.

Una vez en el laboratorio, la muestra fue secada en estufa de aire circulante a 40°C por 48 horas para posteriormente ser pesada. Seguidamente, se procedió a separar manualmente los restos fibrosos correspondientes al pericarpio del maíz germinado para lo cual la muestra fue lavada con agua corriente de caño sobre una tela de muselina blanca, se trabajó con los componentes sólidos del bagazo que quedaron sobre la tela. La fracción separada de pericarpio de maíz

germinado se secó a 40°C por 48 horas y luego se calculó el porcentaje (% p/p) que representó respecto a la muestra bagazo seco. Finalmente, se redujo el tamaño de partícula hasta pasar por un tamiz N°40 (apertura 425 µm) según norma de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés).

IV.4.1.2. Extracción química del AXF

IV.4.1.2.1. Desengrasado y remoción de almidón

El desengrasado se realizó de acuerdo a lo descrito por Liu *et al.*⁷⁶. La muestra triturada y tamizada por una malla N° 40 (25 g) se mezcló en un matraz con 175 mL de *n*-hexano. El matraz fue sellado con parafilm y luego se llevó al agitador magnético (MS-H-S10, Scilogex, Estados Unidos) a 300 rpm por 2 horas y a 50 °C. Después, la muestra se filtró al vacío a través de papel filtro Whatman N° 3 acoplado a un embudo Buchner. La muestra con solvente residual fue secada en estufa a 40 °C por 24 horas.

La eliminación de almidón se efectuó mediante tratamiento con α -amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) de acuerdo a lo descrito por Zhang *et al.*⁷⁷. La muestra previamente desengrasada (75 g) se agitó entre 85–90 °C en 750 mL de H₂O destilada, previo ajuste del pH a 6,5 por adición de NaOH al 50 % (aprox. 0,2mL). Se añadió la enzima (4,5mL de enzima/100g de muestra) y se agitó a 300 rpm durante 2,5 horas (la ausencia de almidón fue confirmada mediante reacción negativa al reactivo de Lugol). Luego se sometió a ebullición por 15 min con la finalidad de parar la reacción enzimática. La fibra fue separada usando una tela de muselina blanca, se lavó dos veces con agua caliente y una vez con alcohol 96 % para separar la maltodextrina (de color marrón). Finalmente, se secó en una estufa a 50°C por 24 horas.

IV.4.1.2.2. Extracción del AXF

Los polisacáridos se extrajeron usando un proceso modificado basado en el trabajo de Kamboj *et al.*⁶². La muestra de BCJ pretratada, desengrasada y sin almidón (50 g) se añadió a 500 mL de H₂O destilada con 4 g de NaOH de manera que estuvo presente 2 mEq de álcali/gramo de fibra en el medio de extracción, se sometió a ebullición por 1 h con agitación constante. Una vez enfriada, se llevó a la centrifuga (Sorvall™ ST 16, Thermo Scientific™, Estados Unidos) a 6 000 x g por 20 min. El sobrenadante fue recuperado por decantación y al remanente se le añadió 400 mL de H₂O para luego ebullicirla con agitación por 5 min, esta última también se centrifugó. La fracción decantada se mezcló con el sobrenadante inicial (extracciones repetidas sobre el precipitado pueden mejorar el rendimiento).

A la fracción decantada se agregó 17 mL de H₂O₂ al 30%, se ajustó el pH a 11,5 con NaOH al 50% (aprox. 1,5mL) y se agitó a temperatura ambiente por 2 h. Luego se ajustó el pH entre 4-4,5 agregando HCl concentrado (aprox. 7 mL), se esperó entre 15 y 30 min para precipitar la hemicelulosa A, la cual se separó mediante centrifugación a 7 100 x g por 20 min. Al sobrenadante se añadió lentamente dos volúmenes de etanol 96% con agitación para precipitar la fracción principal de AXF, hemicelulosa B. Se dejó que la fracción de Hemicelulosa B se deposite como un precipitado floculante blanco (aprox. 30-60 min) en frío, se separó por filtración al vacío sobre una tela de muselina y se lavó con etanol 96%. El AXF extraído, se dializó en una membrana de diálisis con un corte de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés) de 3,5 kDa y 16 mm de diámetro circular interno (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, Thermo Scientific™, Estados Unidos) durante 48 h en agua corriente y 48 h en agua destilada. La muestra dializada se secó en estufa de aire circulante a 50 °C por 48 h, seguidamente fue triturada y pasada por un tamiz N° 40.

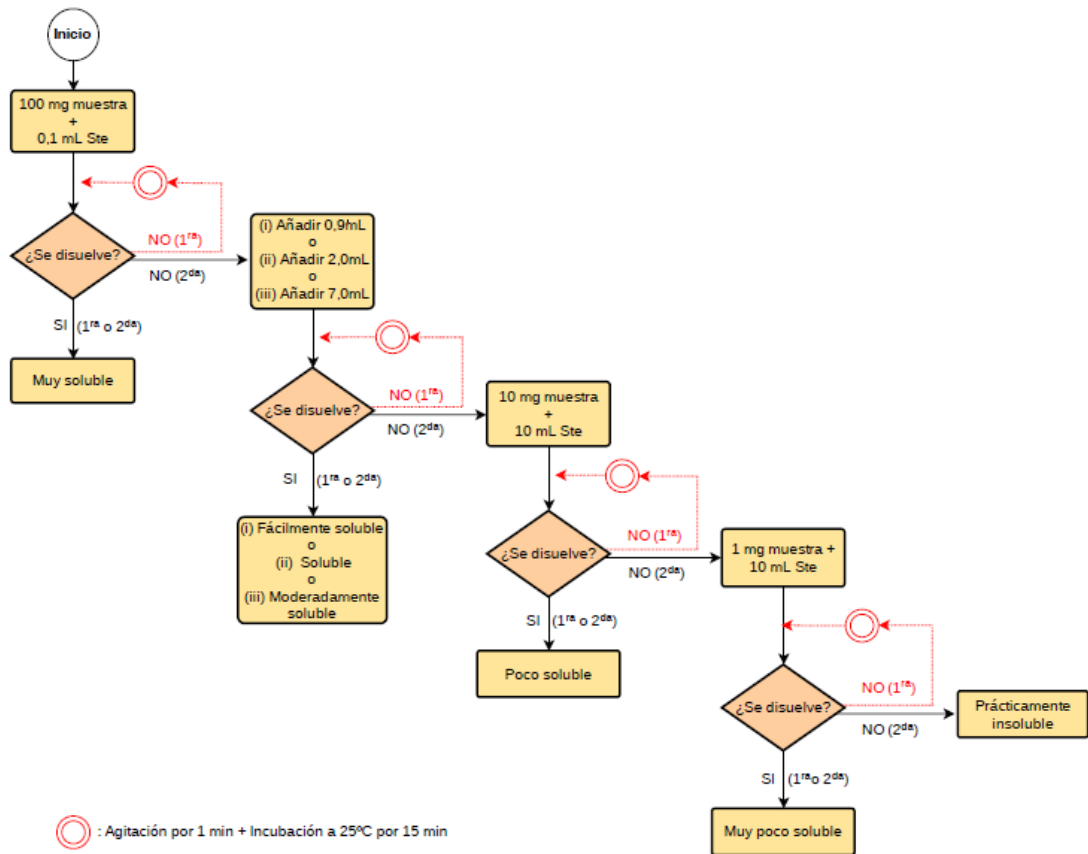


Figura 4. Flujograma de la solubilidad del AXF pulverizado de acuerdo con la monografía <5.11> de la Farmacopea Europea 10.4 (Elaboración propia).

IV.4.2.1.2. Solubilidad a diferentes temperaturas

La evaluación de la solubilidad a diferentes temperaturas se realizó conforme a lo detallado por Kong *et al.*⁷⁹ con ligeras modificaciones. En un inicio, se mezcló 100 mg de muestra y 50 mL de agua destilada bajo agitación constante a 150 rpm a temperaturas de 25, 40, 60, 80 y 100 °C hasta evidenciar su total disolución. El ensayo se realizó por triplicado (n=3).

IV.4.2.2. Contenido de humedad

Se empleó el método de desecación por estufa descrito por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, por sus siglas en inglés)⁸⁰, para lo cual 2 g de AXF extraído fueron colocados sobre placas Petri de peso conocido en una estufa a 105 °C durante 3 h. El peso de la muestra y la placa Petri fue tomada luego de que estos enfriaran dentro de un desecador. Los ensayos fueron realizados por triplicado (n=3) y los resultados se expresaron en % (p/p).

IV.4.2.3. pH

Se determinó el pH en una solución de polisacárido al 1% (p/v) utilizando un pH-metro digital. El agua empleada en la disolución de la muestra fue previamente hervida para eliminar el contenido de CO₂. La medición se realizó por triplicado (n=3)⁸¹.

IV.4.2.4. Cenizas

Se utilizó el método de gravimetría (920.03) de la AOAC⁸⁰ para cuantificar cenizas, el cual fue llevado a cabo en el Centro de Control Analítico (CCA) de la Facultad de Farmacia Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El ensayo se realizó por triplicado (n=3)

IV.4.2.5. Proteínas

Se utilizó el método de Kjeldahl (960.52) de la AOAC⁸⁰ para cuantificar proteínas, el cual fue llevado a cabo en el Centro de Control Analítico (CCA) de la Facultad de Farmacia Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El ensayo fue realizado por triplicado (n=3)

IV.4.2.6. Análisis micromerítico

IV.4.2.6.1. Ángulo de reposo

El cálculo del ángulo de reposo estático fue efectuado siguiendo el método de flujo en embudo indicado en la monografía <1174> de la USP 41⁸². Inicialmente, se acondicionó una superficie plana cubierta con papel y un embudo cuya punta se mantuvo a 2 cm de distancia respecto

a la superficie. Se dejó que la muestra (10 g) fluya libremente sobre el embudo hasta que se forme un cono simétrico que alcance la punta del embudo. La altura (h) y radio de la base (r) del cono formado fueron medidos y reemplazados en la ecuación (1), donde θ es el ángulo de reposo.

$$\theta = \text{Tan}^{-1} \frac{h}{r} \quad (1)$$

Al ángulo de reposo obtenido se le atribuyó una característica de fluidez considerando la siguiente escala: flujo excelente ($\theta < 30^\circ$), flujo bueno (θ entre $31 - 35^\circ$), flujo justo (θ entre $36 - 40^\circ$), flujo pasable (θ entre $41 - 45^\circ$) y flujo pobre (θ entre $46 - 55^\circ$).

IV.4.2.6.2. Densidad aparente y densidad compactada

La densidad aparente (ρ_a) y la densidad compactada (ρ_c) se calcularon en base a la técnica de medición en probeta descrito por Ijaz *et al.*⁸³ con algunas modificaciones. Inicialmente, 10 g de muestra fueron agregados cuidadosamente en una probeta de 50 mL y se midió el volumen ocupado por la muestra (V_a). Luego, se golpeó mecánicamente la probeta sobre una superficie plana, el volumen se leyó luego de 500 golpeteos al evidenciarse un volumen constante (V_c). La ecuación (2) y (3) permitieron obtener los cálculos respectivos.

$$\rho_a = \frac{W}{V_a} \quad (2)$$

$$\rho_c = \frac{W}{V_c} \quad (3)$$

Dónde: W es la masa de muestra (g), V_a es volumen aparente (mL) y V_c es el volumen compactado (mL).

IV.4.2.6.3. Índice de Hausner (IH)

El IH fue calculado empleando la ecuación (4). El valor del IH permitió identificar la característica de flujo de la muestra considerándose lo siguiente: flujo excelente (IH entre 1.00 - 1.11), flujo bueno (IH entre 1,12 – 1,18), flujo justo (IH entre 1,19 – 1,25), flujo pasable (1,26 – 1,34) y pobre (IH > 1,35)⁸⁴.

$$\text{Índice de Hausner (IH)} = \frac{\rho_a}{\rho_c} \quad (4)$$

Dónde: ρ_a es la densidad aparente y ρ_c es la densidad compactada.

IV.4.2.6.4. Índice de Carr (IC, %)

El índice de compresibilidad de Carr fue calculado empleando la ecuación (5). El valor del IC permitió identificar la característica de flujo de la muestra considerándose lo siguiente: flujo excelente (IC \leq 10), flujo bueno (IC entre 11 -15), flujo justo (IC entre 16 – 20), flujo pasable (IC entre 21 - 25) y pobre (IC > 26)⁸⁴.

$$\text{Índice de Carr (IC, \%)} = \frac{(\rho_c - \rho_a)}{\rho_c} \times 100 \% \quad (5)$$

Dónde: ρ_a es la densidad aparente y ρ_c es la densidad compactada.

IV.4.2.7. Viscosidad

Para determinar la viscosidad intrínseca se prepararon soluciones de concentraciones de 0,1; 0,4 y 0,8% p/v del AXF obtenido y se procedió de acuerdo con lo detallado por Van-Craeyveld⁸⁵. El tiempo de flujo de la muestra fue medido a 30°C utilizando un viscosímetro de Ostwald. El ensayo se realizó por triplicado (n=3). Se calculó la viscosidad relativa (η_{rel}) de la muestra frente al agua destilada y la siguiente fórmula permitió el cálculo de la viscosidad específica (η_{sp}):

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (6)$$

Por último, la viscosidad intrínseca aparente (η_{int} , dL/g) fue determinada mediante la ecuación de Morris (7):

$$\eta_{int} = 1/c \times [2 \times (\eta_{sp} - \ln\eta_{rel})]^{0.5} \times 10 \quad (7)$$

IV.4.2.8. Determinación del contenido fenólico total

El contenido fenólico total fue llevado a cabo de acuerdo con el procedimiento de Si *et al.*⁶¹, empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Brevemente, 100 μ L de solución de la muestra (1% p/v, en agua destilada) se mezclaron con 150 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:10, v/v), la mezcla se dejó reposar por 5 min. Luego, se agregó 150 μ L de carbonato de sodio saturado al 7,5% y 3600 μ L de agua destilada, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 min, después de lo cual se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (Genesys™ 150, Thermo Scientific, Estados Unidos). Se empleó el agua destilada como blanco. El contenido fenólico se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG / g ps), basado en una curva estándar de calibración de 0,03125; 0,0625; 0,125 y 0,25 mg/mL de ácido gálico. El análisis se realizó por triplicado (n=3).

IV.4.2.9. Identificación de monosacáridos por cromatografía de capa fina (CCF)

Inicialmente, la muestra fue sometida a hidrólisis ácida de acuerdo con lo referido por Buksa *et al.*⁸⁶, para lo cual 25 mg del AXF extraído se trataron con 2 mL de ácido trifluoroacético (ATF) 2 M a 100 ° C por 2,5 h. La separación e identificación de los monosacáridos del AXF se realizó en placas de vidrio con sílica gel de 20 x 20 cm (TLC Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck, Alemania) pre-lavadas con la fase móvil, esta última conformada por cloroformo, ácido acético y agua (3:3,5:0,5, v/v/v). Se sembró L-Arabinosa:D-Xilosa:D-Glucosa (1:1:1, v/v/v), L-Arabinosa (0,5%), D-Xilosa (0,5%), D-Glucosa (0,5%), L-Arabinosa:D-Xilosa

(1:1, v/v) y la muestra de AXF hidrolizada. El solvente ascendió dos veces con los sembrados hasta 12,8 cm, se retiró la placa y se secó completamente entre los dos ascensos (100 °C por 30 min). Los monosacáridos fueron revelados mediante aspersion de una mezcla preparada con 1 g de difenilamina y 1 mL de anilina en 100 mL de acetona, a la cual se añadió ácido ortofosfórico al 85% (10 mL) antes de usarse; una vez rociado se secó la placa a 100 °C por 10 min.

IV.4.2.10. Análisis por HPLC–MS/MS

IV.4.2.10.1. Pretratamiento del AXF por metanólisis ácida

El AXF pulverizado seco fue sometido a hidrólisis parcial por metanólisis ácida de acuerdo a lo descrito previamente por Eugene *et al.*⁸⁷ con ligeras modificaciones. Inicialmente, se preparó una solución stock de 20 mg/mL del AXF, con agua ultrapura Mili-Q dentro de un eppendorf de 2,0 mL, con ayuda de un agitador tipo vórtex por aprox. 5 min. Luego, este fue colocado en baño de ultrasonido por 5 min a 30 °C hasta completa disolución, seguidamente se llevó al agitador tipo vórtex por 1 min. Una vez disuelta, se preparó una solución de concentración final 100 µg/mL a partir de la solución stock.

Una alícuota de 200 µL de la muestra diluida fue colocada en un tubo de ensayo de vidrio con tapa rosca (capacidad 10 mL). Después fue llevada a secar con nitrógeno (N₂) en un equipo automatizado de vaporización de solventes (TurboVap[®] LV, Biotage, Suecia). Una vez seca, se añadió 300 µL del reactivo HCl metanólico 3M[®] (ácido clorhídrico 3M en metanol), e inmediatamente se cerró con la tapa. Seguidamente, fue llevada a la estufa Heratherm[®] (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos) a 65 °C por 1 h, y se llevó hasta sequedad con nitrógeno (N₂). Finalmente, se adicionó 200 µL del solvente (Acetonitrilo:H₂O, 9:1) y se mezcló con ayuda del agitador tipo vórtex por 1 min. Se llevó la muestra al inserte para vial (250 µL) y se centrifugó a 9000 rpm por 15 min. Para el análisis por HPLC-MS/MS se usó 150 µL del sobrenadante.

IV.4.2.10.2. Condiciones HPLC—MS/MS

El análisis del AXF hidrolizado por metanólisis ácida se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) para lo cual se utilizó un Cromatógrafo Líquido Dionex UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos) acoplado a espectrómetro de masas Thermo QExacte™ Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) con fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo negativo.); este análisis fue realizado por el Centro de Análisis Químico de la Universidad Federal de Rio de Janeiro en Brasil.

Para la cromatografía líquida se empleó una columna cromatográfica Water XBridge® Amide BEH (150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm) con fase móvil de solvente A (0,1 % hidróxido de amonio en 95 % de agua y 5 % acetonitrilo) y B (0,1 % hidróxido de amonio en 95 % de acetonitrilo y 5% de agua). Método de elución en gradiente: 0-2 min B 95 %; 2-17,0 min B 50 %; 17-20,0 min B 50 %; 20,0-21,0 min B 95 %; 21,0-27,0 min B 95 %. Velocidad de flujo 500 µL/min e inyección de 8 µL. Temperatura del horno de la columna a 45 °C.

El análisis ESI—MS/MS fue llevado a cabo por escaneo total combinado con fragmentación de modo de ionización negativa por electrospray (ESI⁻). Los parámetros de la fuente ESI se describen a continuación: voltaje de spray 3,6 kV (-); caudal del gas envolvente 50 (valores arbitrarios); tasa de flujo del gas auxiliar; 10 (valores arbitrarios); voltaje de la lente del tubo 50 V; temperatura del calentador de la sonda 400°C y temperatura de capilaridad 300°C.

Otros parámetros usados en la espectrometría de masas fueron: parámetros del modo Full MS: resolución 35000 (FWHM), ACG target: 5e5, máximo IT: 100 ms y rango m/z 100-1000; parámetros del modo dd-MS² (experimento de adquisición dependiente de datos – DDA):

resolución 17500 (FWHM) | ACG target: 1e5, máximo IT: 50 ms, loop count 3, ventana de aislamiento m/z 1.2, topN 3 y NCE: 15, 20, 30; y parámetros del monitoreo de reacción paralela (PRM, por sus siglas en inglés)-MS²: resolución 35000 (FWHM), ACG target: 2e5, máximo IT: 100 ms, ventana de aislamiento: m/z 1.2 y (N)CE = 10, 30.

IV.4.2.11. Análisis por espectroscopia UV-vis

La muestra del AXF en solución acuosa (0,5 %, p/v) fue colocada en cubetas de cuarzo para realizar un barrido del espectro entre 250 y 500 nm con un espectrofotómetro UV/Vis (Genesys™ 150, Thermo Scientific, Estados Unidos)⁸⁸.

IV.4.2.12. Análisis por espectroscopía infrarroja (IR)

El polisacárido seco fue analizado mediante espectroscopia IR con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) empleando la técnica de muestreo de reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés). La muestra pulverizada fue triturada con bromuro de potasio a razón 1:20 (p/p), seguidamente se prensó para formar pellets de 1mm de espesor. La resolución del escaneo fue de 4 cm^{-1} , con barrido entre 4000 y 400 cm^{-1} en el espectrofotómetro IR (Spectrum 100 FT-IR, PerkinElmer, Estados Unidos); este análisis fue realizado por el laboratorio del Centro Nacional de Control de Calidad (CNCC) del Instituto Nacional de Salud del Perú (INS).

IV.4.2.13. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*

IV.4.2.13.1. Capacidad de inhibición del radical DPPH[•]

La capacidad de inhibición del radical DPPH[•] fue determinada por el método adoptado por Marquez-Escalante y Carvajal-Millan⁸⁹ en la que se evita la precipitación del DPPH[•] y del AXF. En un principio, el polisacárido se disolvió en H₂O destilada con ayuda de un vórtex para preparar una solución stock y obtener concentraciones de 0,5; 1; 2; 4; 5; 6; 8 y 10 mg/mL. Se preparó 50 mL de solución DPPH[•] 45 μM con metanol:agua (60:40). Una vez disuelta mediante agitación vigorosa, se filtró por papel Whatman N° 1 y se utilizó luego de 1 h, manteniéndose en la oscuridad y a temperatura ambiente. Cuatrocientos μL de

AXF se mezclaron con 350 μ L de metanol y se añadió 750 μ L de DPPH \cdot seguido de una incubación por 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Se determinó la capacidad de captación de radical DPPH \cdot del trolox, a concentraciones entre 0,001 y 0,002 mg/mL para elaborar una curva de inhibición. El control contenía todos los reactivos excepto la muestra, mientras que el agua y metanol fueron empleados como blanco del espectro. La absorbancia se midió a 515 nm empleando el espectrofotómetro UV/Vis (Genesys™ 150, Thermo Scientific, Estados Unidos). El % de inhibición del radical DPPH \cdot fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH}\cdot = \left(\frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \times 100 \% \quad (8)$$

Donde, $A_{control}$ es la absorbancia del control y $A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra o del estándar. La concentración de muestra que inhibe el 50% del radical (IC_{50}) se determinó mediante interpolación en la curva de % inhibición, los resultados también se expresaron como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC, μ mol/g muestra) El corrido de la muestra y el estándar se realizó por triplicado (n=3).

IV.4.2.13.2. Capacidad de inhibición del radical ABTS \cdot^+

La capacidad de inhibición del radical ABTS \cdot^+ fue realizado teniendo en consideración lo previamente reportado por Malunga y Beta⁹⁰. La solución activa del radical ABTS \cdot^+ se produjo dejando reaccionar una solución etanólica de ABTS \cdot^+ 7mM con persulfato de sodio ($Na_2S_2O_8$) para una concentración final de 2,45 mM (para 4 mL, 0,0154 g de ABTS y 0,0027 de $Na_2S_2O_8$) en la oscuridad y por 16 h. La solución preparada se diluyó con H₂O bidestilada (aproximadamente 1:100) a una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Luego, 1,7 mL ABTS \cdot^+ se añadieron a 100 μ L de diferentes concentraciones de la muestra (0,1; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 y 10 mg/mL), se mezcló con vórtex y luego dejó en reposo por 7 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 734 nm. El control contenía todos los reactivos excepto la muestra, mientras que el agua se usó como blanco del espectro. Se preparó una curva de inhibición del estándar

Trolox empleando concentraciones entre 0,003 y 0,1 mg/mL. El % de inhibición del radical ABTS^{•+} fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición del radical ABTS}^{\bullet+} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \% \quad (9)$$

Donde, A_{control} es la absorbancia del grupo control y A_{muestra} es la absorbancia de la muestra o del estándar. Los resultados se expresaron como IC₅₀ y TEAC. El corrido de la muestra y del estándar se realizó por triplicado.

IV.4.2.13.3. Ensayo de FRAP

El poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) se ejecutó de acuerdo con lo indicado por Xu *et al.*⁹¹. El reactivo de FRAP fue de reciente preparación y se elaboró al mezclar buffer acetato (300 mM a pH 3,6, reactivo A), FeCl₃•6H₂O (20 mM, reactivo B) y 2, 4, 6-Tripiridil-S- triazina (TPTZ, 10 mM en HCl 40 mM, reactivo C) en una proporción 10:1:1 (reactivo A, reactivo B y reactivo C). Se elaboraron curvas de calibración a partir de diferentes concentraciones de ácido ascórbico (100 – 1000 μmol/L) y de FeSO₄ • 7H₂O (25 – 1000 μmol/L). Subsecuentemente, se dejó reaccionar 50 μL de polisacárido, 450 μL de reactivo FRAP y 1500 μL de agua bidestilada durante 10 min, después se determinó la absorbancia a 593 nm. Las corridas se hicieron por triplicado.

IV.4.2.14. Determinación de la capacidad antihiperglicemiante *in vitro*

IV.4.2.14.1. Capacidad de adsorción de glucosa (CAG)

La CAG fue determinada empleando el método de Dong *et al.*⁹² con modificaciones menores. Inicialmente, se mezcló 0,5 g de muestra con 50 mL de diferentes concentraciones de glucosa anhidra (10, 50, 100 y 200 mmol.L⁻¹), y se incubaron a 37°C por 6 h. Después de centrifugar a 4500 x g durante 20 minutos, la cantidad de glucosa adsorbida fue estimada por cuantificación de glucosa en el sobrenadante empleando el kit de ensayo enzimático de glucosa oxidasa/peroxidasa (GAGO20, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). La CAG se expresó como mmol de glucosa adsorbida por gramo de muestra (mmol/g) y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CCG \text{ (mmol/g)} = \frac{C_i - C_f}{W_m} \quad (10)$$

Donde C_i y C_f son el contenido de glucosa antes y después de la absorción, y W_m es el peso de la muestra.

IV.4.2.14.2. Capacidad de inhibición de la difusión de glucosa

El ensayo de inhibición de la difusión de glucosa se realizó empleando tubos de diálisis de 3,5 kDa y 16 mm de diámetro circular interno (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, Thermo Scientific™, Estados Unidos) de acuerdo con el protocolo descrito por Maktoof *et al.*⁹³ con algunas modificaciones. Se prepararon tres concentraciones diferentes de AXF (1, 10 y 25 mg/mL). Las muestras de polisacárido (2 mL) fueron colocadas en los tubos de diálisis (6 cm x 16 mm) y se añadió 2 mL de glucosa 0,25 M preparada con NaCl 0,15 M. El control negativo y positivo fueron agua destilada y acarbosa, respectivamente.

Los tubos de diálisis se sellaron en los extremos y se sumergieron en un beaker con NaCl 0,15 M (80mL) y agua destilada (20mL), se agitó a 150 rpm y 37 °C. La difusión de glucosa hacia la solución externa se determinó cada 30 min durante 3h espectrofotométricamente a 505 nm con ayuda de un kit enzimático de cuantificación de glucosa, para lo cual se tomó una alícuota (1 mL) de la solución externa que fue inmediatamente reemplazada con un mismo volumen de NaCl 0,15M. La concentración de glucosa en el medio externo fue expresada en µg/mL. Cada lectura fue realizada por triplicado.

IV.4.2.14.3. Capacidad de inhibición de α-amilasa

El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con lo reportado previamente por Inocente *et al.*⁹⁴. Ciento veinticinco microlitros de AXF a diferentes concentraciones (entre 0,1 – 5 mg/mL) o acarbosa (entre 0,1 - 5 mg/mL) fueron pre-incubados a 25 °C por 10 min con 125 µL de una solución de α-amilasa (13 U/mL), esta última disuelta en buffer fosfato de sodio 0,02 mol/L a pH 6,9 y con 0,006 M de NaCl. Después de pre-incubar; se adicionó 125 µL de almidón soluble al 1%, esta última preparada por disolución en buffer fosfato de sodio (pH 6,9 con 0,006 M de NaCl) bajo agitación a 90 °C. Luego, se añadió 250 µL

de ácido 3,5-dinitrosalicílico 96 mM. La reacción se detuvo al colocar los tubos a ebullición por 15 min. Se enfriaron a temperatura ambiente y se disolvieron con agua destilada (3 mL) para finalmente leer las absorbancias a 540 nm. El % de inhibición fue calculado empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{(A_3 - A_4)} \right] \times 100 \% \quad (11)$$

Donde A_1 , A_2 , A_3 y A_4 se definen como la absorbancia de la muestra (con enzima), absorbancia del blanco de la muestra (sin enzima), absorbancia del control con 100% de actividad (sólo enzima y solvente) y absorbancia del blanco del control con 0 % de actividad (sin enzima), respectivamente. Se calculó el IC_{50} que indica la concentración requerida de un inhibidor de α -amilasa para reducir el 50 % de la actividad enzimática.

IV.5. Análisis estadístico

Los datos se presentaron como promedio \pm desviación estándar (D.E.) para tres réplicas. Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con prueba post hoc de Turkey para realizar comparaciones entre tratamientos utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6.0. Los valores $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

V. RESULTADOS

V.1. Presentación y análisis de los resultados

V.1.1. Pretratamiento y extracción química

La fracción separada de pericarpio de maíz germinado estuvo conformada principalmente por residuos fibrosos tal como se muestra en la Figura 5, dicha fracción representó el $29,25 \pm 2,47$ % (p/p, n=2) con respecto a la muestra de bagazo seca. El desengrasado con n-hexano tuvo un rendimiento de $88,67 \pm 2,20$ % (p/p, n=3), mientras que los rendimientos del tratamiento con α -amilasa o desalmidonado y la extracción química con peróxido de hidrógeno alcalino fueron de $77,42 \pm 3,89$ % (p/p, n=3) y $19,87 \pm 4,56$ % (p/p, n=3) respectivamente

(ver Figura 6). La Figura 7(a) permite observar la apariencia de la muestra de BCJ seca, triturada y tamizada obtenida como resultado del pretratamiento, y también luego del desengrasado (Figura 7(b)) y al finalizar la eliminación del almidón (Figura 7(c)). La Figura 7(d) presenta al AXF seco y pulverizado extraído a partir de 50g del BCJ pretratado, desengrasado y libre de almidón.

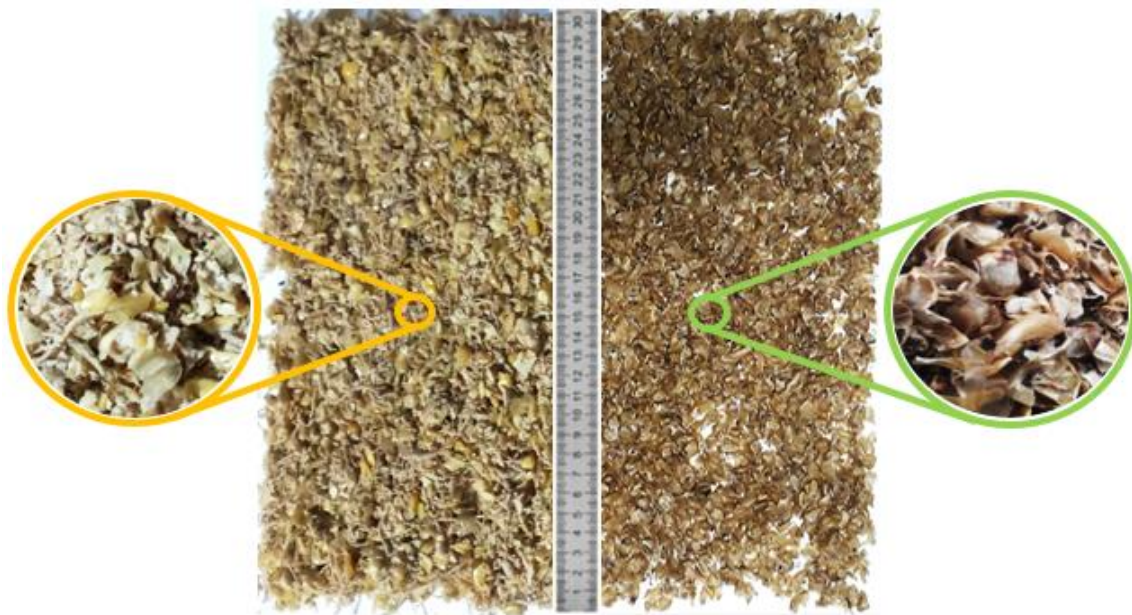


Figura 5. Muestra del BCJ sin pretratamiento (izquierda) y luego separar los componentes fibrosos correspondientes al pericarpio de maíz germinado (derecha).

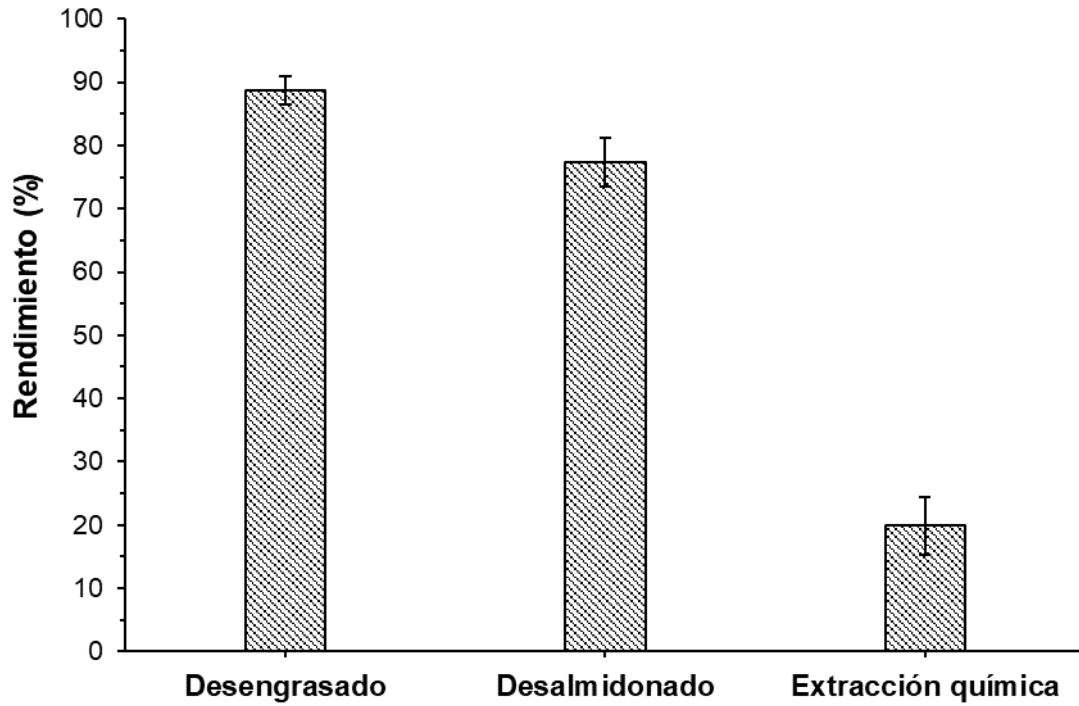


Figura 6. Rendimiento durante el proceso de extracción del AXF. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

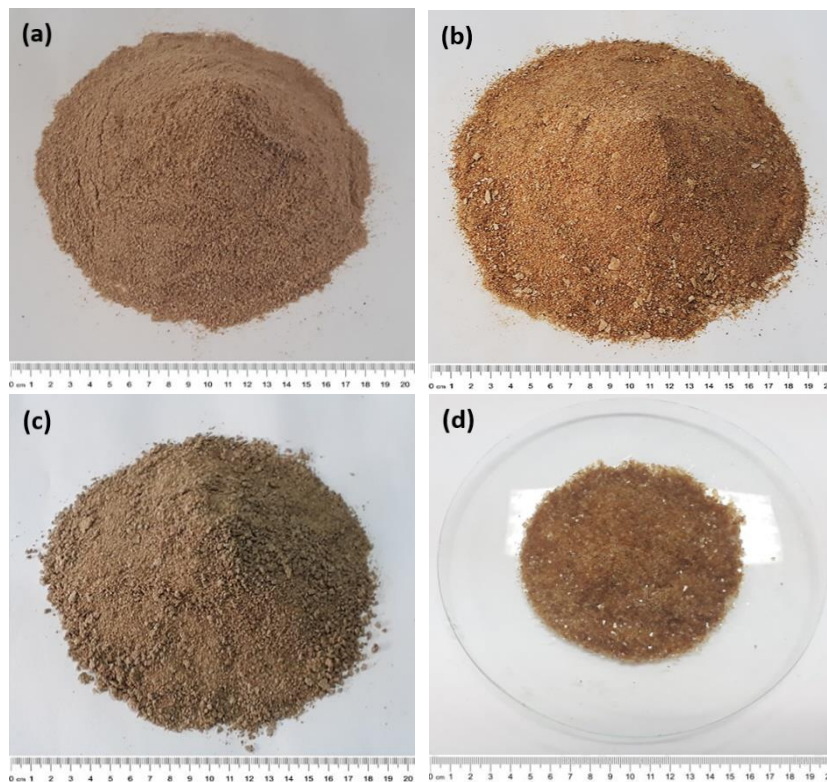


Figura 7. Muestra de BCJ seca, pulverizada y tamizada obtenida al final del pretratamiento (a); muestra del BCJ luego de la etapa de desengrasado (b); muestra de BCJ luego de la eliminación de almidón (c); y muestra del AXF secada en estufa y pulverizada (d).

V.1.2. Caracterización fisicoquímica del polisacárido aislado

V.1.2.1. Solubilidad

La Figura 8 permite evidenciar que la solubilidad del AXF varía en función del grado de polaridad del solvente con la cual interactúa. La Tabla 1 resume el comportamiento de la solubilidad del AXF en diferentes solventes. El AXF mostró ser soluble en agua destilada, fácilmente soluble en agua a pH 5 y pH 10, muy poco soluble en acetato de etilo, y prácticamente insoluble en metanol, etanol, acetona y cloroformo.

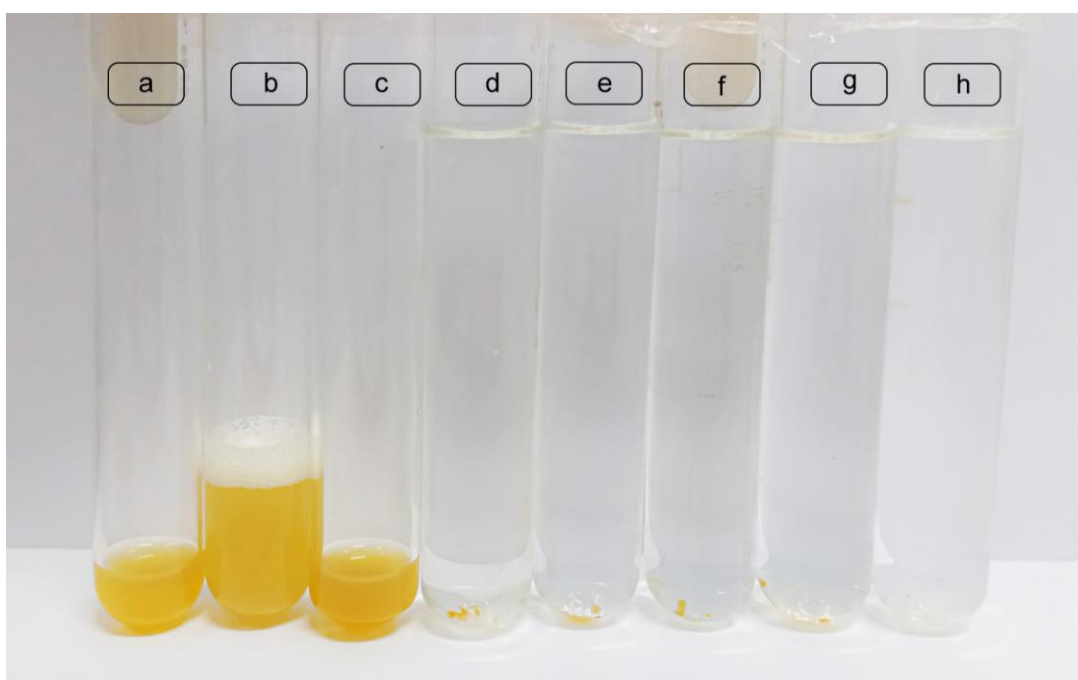


Figura 8. Solubilidad del AXF en solventes de diferente grado de polaridad tales como: agua acidificada, pH=5 (a); agua destilada, pH=7 (b); agua alcalinizada, pH=10 (c); metanol (d); etanol (e); cloroformo (f); acetona (g); y acetato de etilo (h).

Tabla 1: Solubilidad en solventes de diferente polaridad del AXF extraído

Solvente	Término descriptivo
Agua acidificada (pH= 5)	Fácilmente soluble
Agua destilada (pH= 7)	Soluble
Agua alcalinizada (pH= 10)	Fácilmente soluble
Metanol	Prácticamente insoluble
Etanol	Prácticamente insoluble
Cloroformo	Prácticamente insoluble
Acetona	Prácticamente insoluble
Acetato de etilo	Muy poco soluble

Por otra parte, el AXF (100 mg) presentó una solubilidad en agua facilitada por el incremento de la temperatura. La Figura 9 muestra que el mayor tiempo de disolución de $79,33 \pm 7,02$ min ($n=3$) ocurrió a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que a una temperatura alta de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ el tiempo se redujo a $8,00 \pm 3,61$ min ($n=3$), es decir que durante la disolución acuosa del AXF, el tiempo y temperatura guardaron una relación inversamente proporcional.

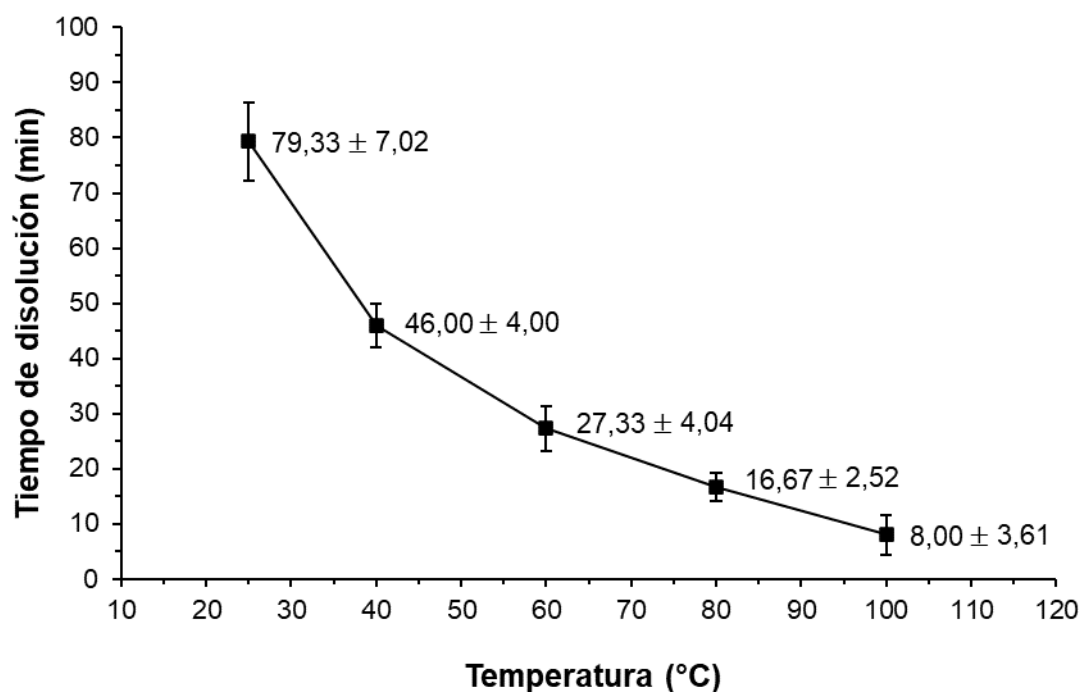


Figura 9. Influencia de la temperatura ($25 - 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) sobre el tiempo de disolución del AXF pulverizado. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. ($n=3$).

V.1.2.2. Humedad

Luego de realizar el ensayo de contenido de humedad por el método de desecación en estufa, el AXF extraído (2 g) presentó un contenido de humedad de $8,00 \pm 1,77\%$ (n=3). La Tabla 2 presenta el contenido de humedad en % (p/p).

V.1.2.3. pH

El pH de la solución al 1% (p/v) del AXF aislado fue $5,81 \pm 0,02$ (n=3), considerándose como ligeramente ácida. La Tabla 2 muestra este valor.

V.1.2.4. Cenizas totales

El polisacárido aislado tuvo un contenido de cenizas totales de $2,68 \pm 0,01\%$ (n=3), como se aprecia en la Tabla 2.

V.1.2.5. Proteínas

El contenido de proteínas de la muestra de polisacárido fue de $3,78 \pm 0,02\%$ (n=3), como se presenta en la Tabla 2.

V.1.2.6. Análisis micromerítico

Los valores de ángulo de reposo, densidad aparente, densidad compactada, índice de Hausner e índice de compresibilidad de Carr del AXF pulverizado fueron $20,04 \pm 0,43^\circ$ (n=3); $0,78 \pm 0,02$ g/mL (n=3), $0,91 \pm 0,01$ g/mL (n=3), $1,17 \pm 0,02$ (n=3) y $14,35 \pm 1,43\%$ (n=3), respectivamente (Tabla 2.). La característica de fluidez atribuida a la muestra teniendo en cuenta el ángulo de reposo fue flujo excelente. El índice de Hausner y Carr indicaron que el AXF aislado pulverizado presenta una buena fluidez.

La Tabla 2 presenta un resumen de todas las características fisicoquímicas del AXF aislado.

Tabla 2: Caracterización fisicoquímica del AXF extraído por el método de peróxido de hidrógeno alcalino

Característica fisicoquímica	Resultados
Humedad (%)	8,00 ± 1,77
pH	5,81 ± 0,02
Cenizas totales (%)	2,68 ± 0,01
Proteínas (%)	3,78 ± 0,02
Ángulo de reposo (°)	20,04 ± 0,43
Densidad aparente	0,78 ± 0,02
Densidad compactada	0,91 ± 0,01
índice de Hausner	1,17 ± 0,02
índice de Carr	14,35 ± 1,43

Todos los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).

V.1.2.7. Viscosidad

El AXF presentó una viscosidad intrínseca dependiente de la concentración, un aumento en la cantidad del polisacárido aislado aumentó los valores de viscosidad intrínseca como se muestra en la Figura 10. El mayor valor de η_{int} fue de $1,983 \pm 0,01$ dL/g (n=3) a una concentración de 0,8 % (p/v) de AXF extraído y el menor valor fue $0,121 \pm 0,02$ dL/g (n=3) para la concentración de 0,1 % (p/v).

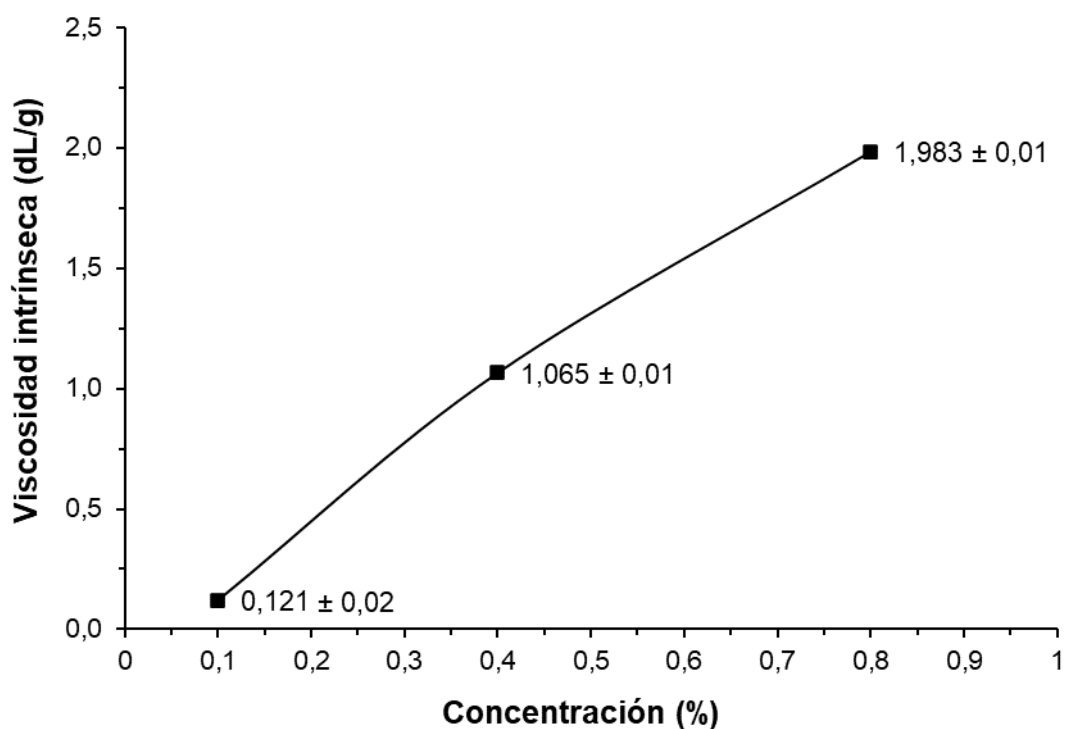


Figura 10. Viscosidad intrínseca a diferentes concentraciones del AXF extraído. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

En el Anexo 3 se presentan las imágenes de los ensayos realizados concernientes a la caracterización fisicoquímica.

V.1.2.8. Contenido fenólico total

La Figura 11 muestra la curva de calibración para la determinación del contenido fenólico total determinada a partir de concentraciones estándar de ácido gálico (0,03125 - 0,25 mg/mL), con lo cual se obtuvo una ecuación de regresión lineal de $Y=1,4378X + 0,0413$ con R^2 igual a 0,9966 (el Anexo 4 detalla el resultado de las absorbancias).

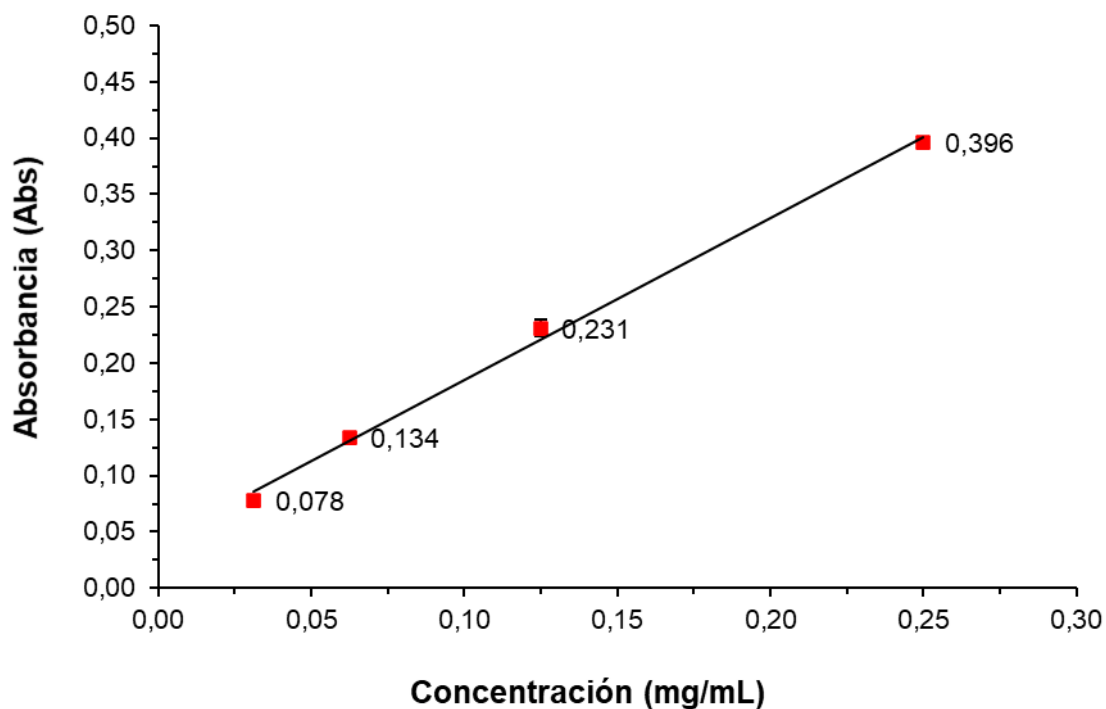


Figura 11. Curva de calibración para la determinación del contenido fenólico total. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

Luego de realizar los cálculos correspondientes con las absorbancias obtenidas (n=3), se determinó que el contenido fenólico total para el AXF extraído fue $5,722 \pm 0,113$ mg EAG/ g peso seco.

V.1.2.9. Identificación de monosacáridos por cromatografía de capa fina (CCF)

La Figura 12 es la CCF revelada con manchas de color azul oscuro correspondientes a la separación de los monosacáridos de las muestras sembradas sobre la fase estacionaria de sílica gel con el sistema de solventes cloroformo, ácido acético y agua (3:3,5:0,5). Los estándares permitieron diferenciar a los monosacáridos presentes en las mezclas y en el AXF hidrolizado.

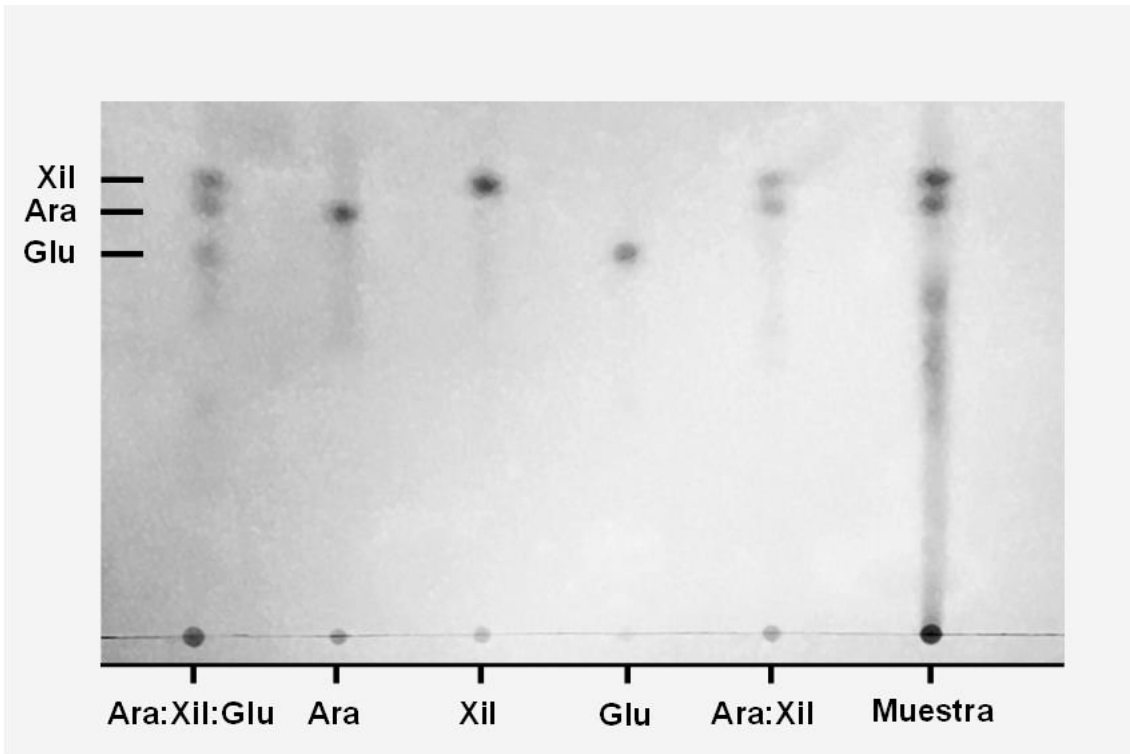


Figura 12. Separación por CCF de L-Arabinosa:D-Xilosa:D-Glucosa (Ara:Xil:Glu), L-Arabinosa (Ara), D-Xilosa (Xil), D-Glucosa (Glu), L-Arabinosa:D-Xilosa (Ara:Xil) y la muestra de AXF hidrolizado.

La Tabla 3 resume las distancias de migración, R_f y R_G . La distancia de migración desde el origen fue mayor para el estándar de D-xilosa, menor para el estándar de L-arabinosa y mucho menor para estándar de D-glucosa. El AXF hidrolizado presentó dos valores R_f de 0,73 y 0,70 los cuales son idénticos a los estándares de D-Xilosa y L-Arabinosa, respectivamente. En el caso del R_G , se determinó que este también fue idéntico entre los valores de la muestra del AXF hidrolizado y los estándares de los monosacáridos de D-Xilosa y L-Arabinosa, siendo para cada monosacárido 1,19 y 1,14 respectivamente.

Tabla 3: Distancias de migración, valores R_f y R_G de los monosacáridos presentes en las muestras sembradas

Muestra sembrada	DM (cm)*	R_f**	R_G***
	9,4	0,73	1,19
L-Arabinosa:D-Xilosa:D-Glucosa	9,0	0,70	1,14
	8,0	0,63	1,01
L-Arabinosa	9,0	0,70	1,14
D- Xilosa	9,4	0,73	1,19
D-Glucosa	7,9	0,62	1,00
L-Arabinosa:D-Xilosa	9,4	0,73	1,19
	8,9	0,69	1,12
AXF hidrolizado	9,4	0,73	1,19
	9,0	0,70	1,14

* DM = distancia migrada en cm desde el origen de siembra

** R_f = factor de retención

*** R_G = factor de retención relativo a D-glucosa

V.1.2.10. Análisis por HPLC–MS/MS

La Figura 13 muestra el perfil cromatográfico de escaneo total con tiempo de retención (t_R) entre 0 y 40 min para la muestra que contenía los estándares de azúcares y de la muestra del AXF antes de la metanólisis ácida. Dentro de los estándares, la arabinosa tuvo el menor t_R (9,36 min) y la maltodecaosa el mayor (32,59 min). Los resultados de la Figura 13(b) indican que es necesario liberar los monosacáridos del AXF empleando técnicas de hidrólisis ya que no se evidenció ninguna separación.

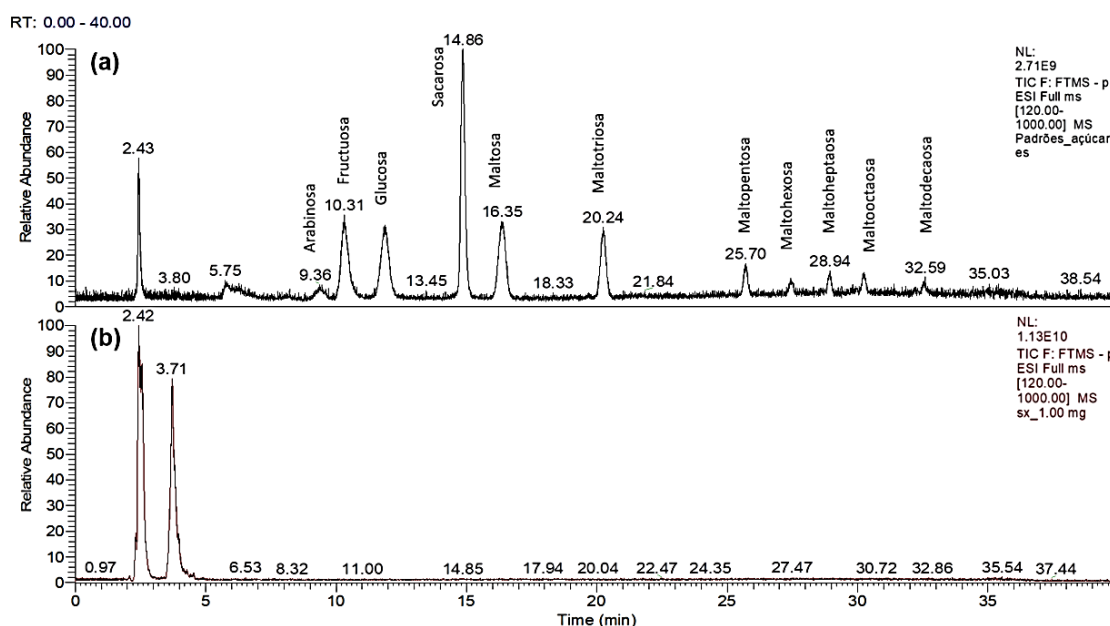


Figura 13. Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total de los estándares de azúcares (a) y del AXF antes de la metanólisis ácida (b).

La Figura 14 presenta el perfil cromatográfico del AXF luego de la hidrólisis parcial por el método de metanólisis ácida. Las bandas más prominentes se evidenciaron bajo los siguientes t_R : 4,15; 4,69; 6,55; 7,20; 9,31 y 10,59 min. No se evidenció ningún pico a t_R mayor de 12,00 min con abundancia relativa significativa. El recorte con los picos de mayor abundancia relativa entre t_R de 2,50 hasta 18,00 min permitió una mayor resolución de las separaciones en la cual aparecieron nuevos picos a t_R de 5,74; 8,16; 8,27 y 11,13 min. A diferencia de lo observado en la Figura 13(b) el AXF hidrolizado presentó un perfil cromatográfico con bandas probablemente correspondientes a azúcares metilados obtenidos luego de hidrolizar al polisacárido.

Teniendo en cuenta que luego de la metanólisis ácida los productos resultantes son azúcares metilados y que no se ha determinado t_R con estándares de azúcares metilados, no ha sido posible sugerir la identificación de azúcares presentes en la muestra basados en los t_R obtenidos.

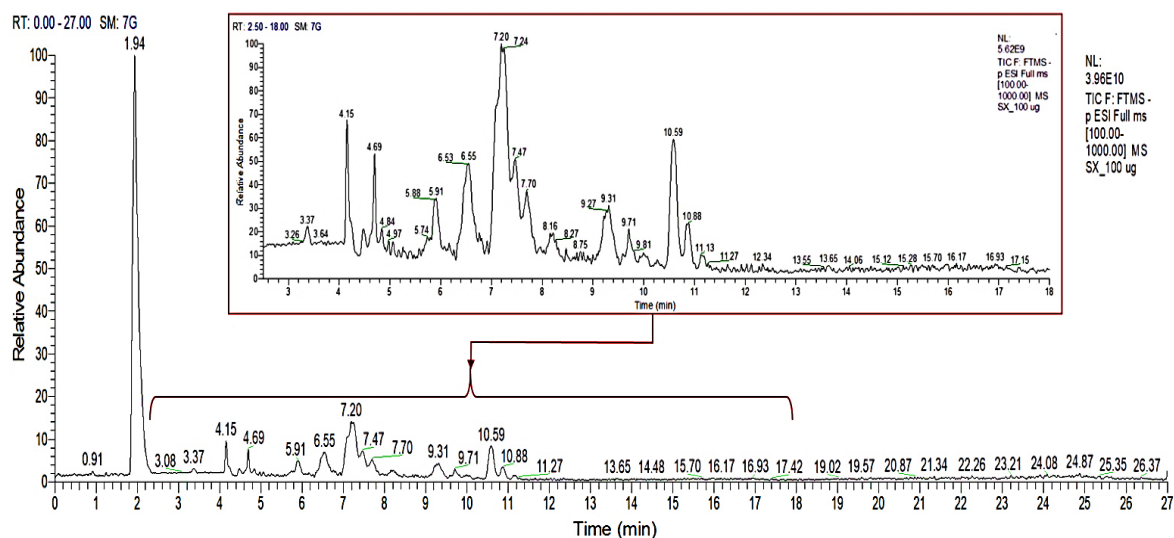


Figura 14. Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total del AXF después de la metanólisis ácida entre t_R 0 – 27 min. Asimismo, se muestra el perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total recortada entre t_R 2.50 – 18 min con los picos de mayor abundancia relativa.

Teniendo en cuenta que entre el t_R 2,50 y 18 min se encontraron los picos de interés para el análisis de monosacáridos metilados originados durante la hidrólisis del AXF. En la Figura 15(b) se muestran picos a t_R de 5,92; 6,62; 7,21; 7,47 y 7,69 min luego de un escaneo total MS^2 , dentro de los cuales la mayor abundancia relativa se dio a t_R 7,21 min. Además, se observó tan solo 5 picos a diferencia del escaneo total MS (Figura 15(a)) en la cual se observó más de 24 picos. La Figura 15(c.1 – c.5) presenta los espectros de masas (EM) en modo de ionización negativa de cada uno de los picos obtenidos por MS^2 ordenados por t_R , de menor a mayor t_R de izquierda a derecha. Los 5 picos analizados pese a tener diferentes t_R , presentaron espectros de masa (c.1 - c.5) con un patrón de fragmentación del ion precursor (m/z 163,06) similar.

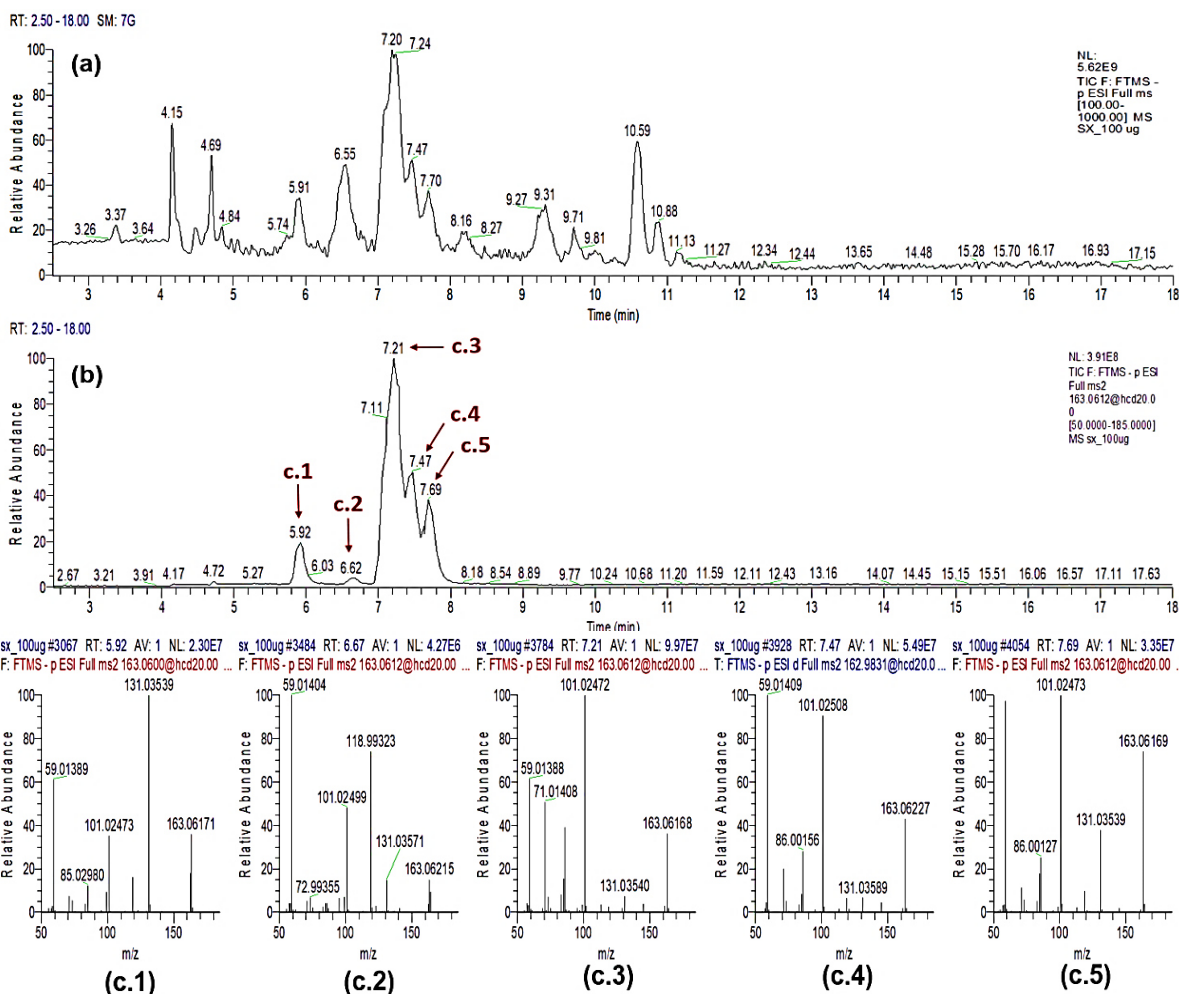


Figura 15. Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total recortada del AXF hidrolizado con t_R desde 2,5 min hasta 18,0 min (a); Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total MS^2 recortada del AXF hidrolizado entre t_R de 2,5 y 18,0 min (b); y espectros de masas en modo de ionización ESI (-) de los picos cromatográficos obtenidos por PRM de iones precursores a m/z 163,06 [M-H]⁻ ordenados de acuerdo al t_R (c.1 – c.5).

La Figura 16(b) presenta cinco picos con t_R entre 8,18 y 11,17 min a diferencia de la Figura 15(b) en la cual los picos se encontraron a t_R entre 5,92 y 7,69 min, esto luego de realizar un escaneo total MS^2 con PRM a m/z 193,05 (ESI-). La mayor abundancia relativa fue para el t_R 10,86 min. Los espectros de masas (c.1 - c.5) corresponden a la separación de picos con t_R diferente; sin embargo, el EM muestra un ion precursor a m/z 193,07, con similares patrones de fragmentación en los cinco picos.

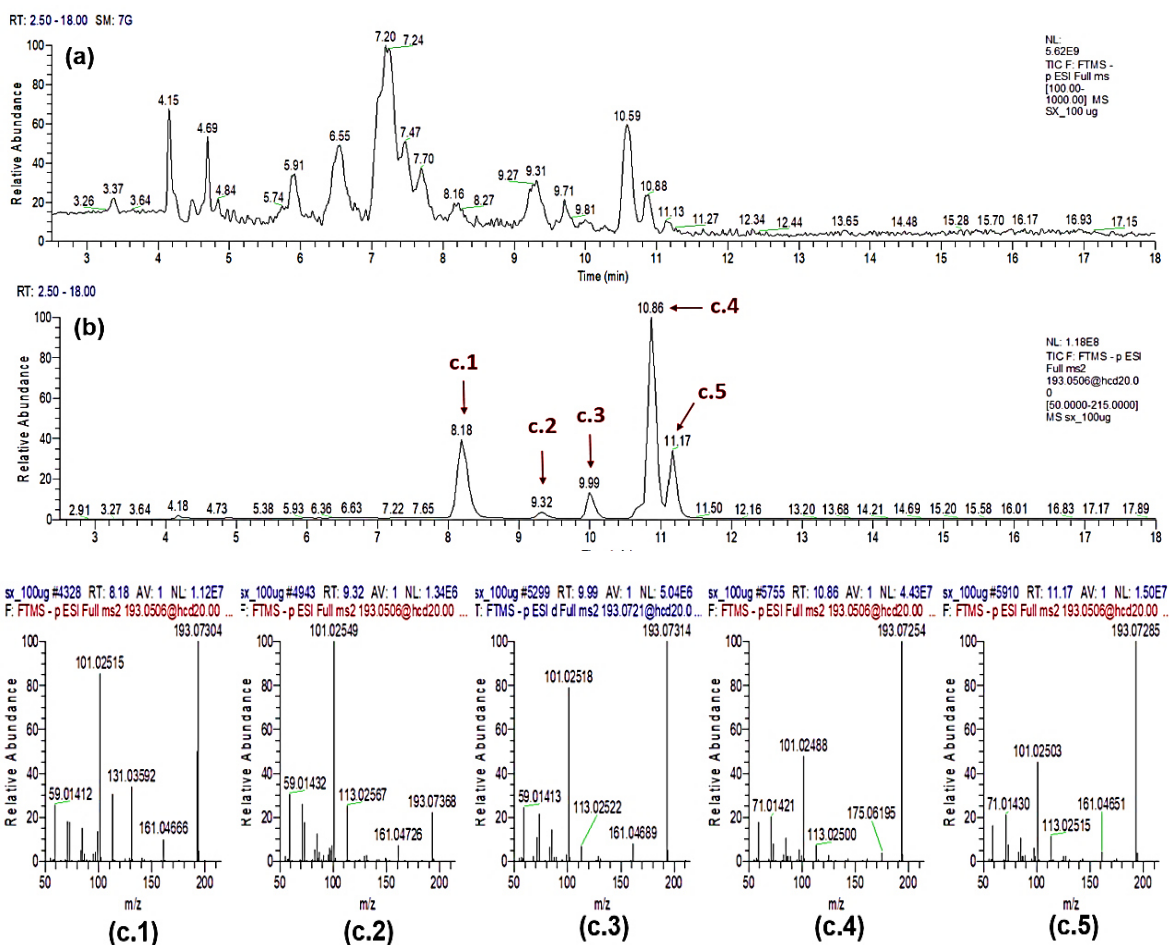
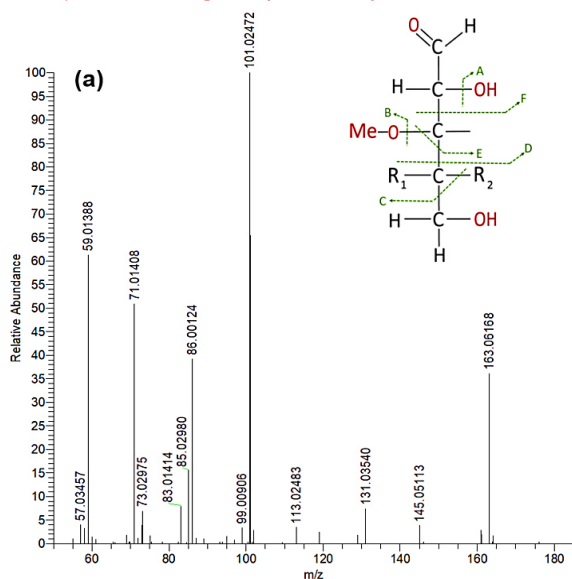


Figura 16. Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total recortado del AXF hidrolizado entre t_R desde 2,5 min hasta 18,0 min (a); Perfil cromatográfico (LC-MS) de escaneo total MS² recortado del AXF hidrolizado entre t_R desde 2,5 min hasta 18,0 min (b); y espectros de masas en modo de ionización ESI (-) de los picos cromatográficos obtenidos por PRM de iones precursores a m/z 193,05 [M-H]⁻ ordenados de acuerdo al t_R (c.1 – c.5).

La Figura 17(a) muestra el EM a t_R 7,21 min, en cual el pico a m/z 163,06 corresponde al ion molecular. Los principales picos obtenidos por fragmentación del ion molecular fueron m/z 145,05 (A); m/z 131,03 (B); m/z 113,02 (C); m/z 101,02 (D), m/z 71,01 (E) y m/z 59,01 (F). El pico a m/z 101,02 (D) presentó mayor abundancia relativa. Por otra parte, en la Figura 17(b) el ion molecular se presentó a m/z 193,07 con t_R 10,86 min, con fragmentos a m/z 175 (A); m/z 113,06 (B); m/z 101,02 (C), m/z 71,01 (D) y m/z 59,01 (E). Asimismo, se muestra un pico con baja abundancia relativa a m/z 161 (F). El pico a m/z 101,02 (C) presentó la segunda mayor abundancia relativa tan solo por debajo del m/z del ion precursor (m/z 193,07).

sx_100ug #3784 RT: 7.21 AV: 1 NL: 9.97E7
 F: FTMS - p ESI Full ms2 163.0612@hcd20.00 [50.0000-185.0000]



sx_100ug #5755 RT: 10.86 AV: 1 NL: 4.43E7
 F: FTMS - p ESI Full ms2 193.0506@hcd20.00 [50.0000-215.0000]

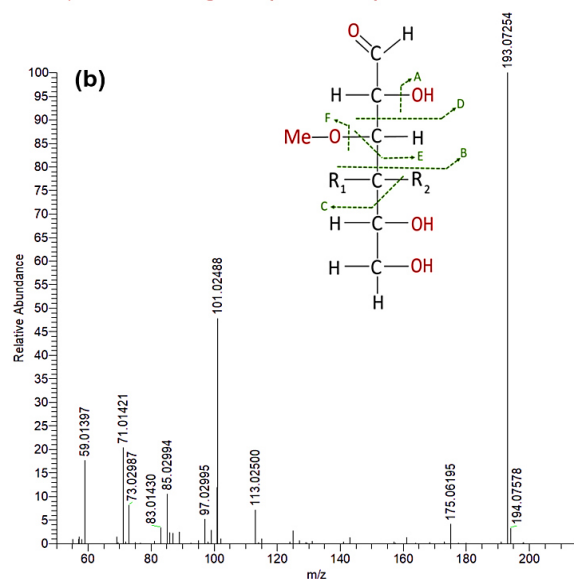


Figura 17. A la izquierda se presenta la fragmentación del ion molecular con m/z 163,0611967 $[M-H]^-$ en $t_R = 7,21$ (a); y a la derecha se presenta la fragmentación en el espectro de masas del ion molecular con m/z 193,0506321 $[M-H]^-$ en $t_R = 10,86$ min (b). Ambos en modo de ionización ESI(-).

En el cromatograma de la Figura 15(b) mediante la técnica de monitoreo de reacción paralela a m/z 163.0611967, se observó picos que sugerirían ser moléculas correspondientes a metil-pentofuranosidos o metil-pentopiranosidos (isómeros anoméricos); y por el perfil de fragmentación podrían corresponder a los azúcares monoméricos de la arabinosa y la xilosa metilados (Figura 17, izquierda). Por otra parte, en el cromatograma de la Figura 16(b) cuando se coloca en monitoreo de reacción paralela a m/z 193.05063, se evidenció picos que podrían sugerir la presencia de metil-hexafuranosidos y metil-hexapiranosidos (isómeros anoméricos), y de acuerdo al perfil de fragmentación podrían relacionarse principalmente con metil-hexapiranosidos (Figura 17, derecha).

V.1.2.11. Espectroscopia UV-vis

El espectro de absorción del AXF a la concentración de 0,25 % reveló dos máximos de absorción en la región UV, una primera banda de absorción prominente a 280 nm (λ_1) y un brazo de absorción a 325 nm (λ_2). Ambos detectados como resultado de haber realizado un barrido entre 250 y 500 nm como se muestra en la Figura 18.

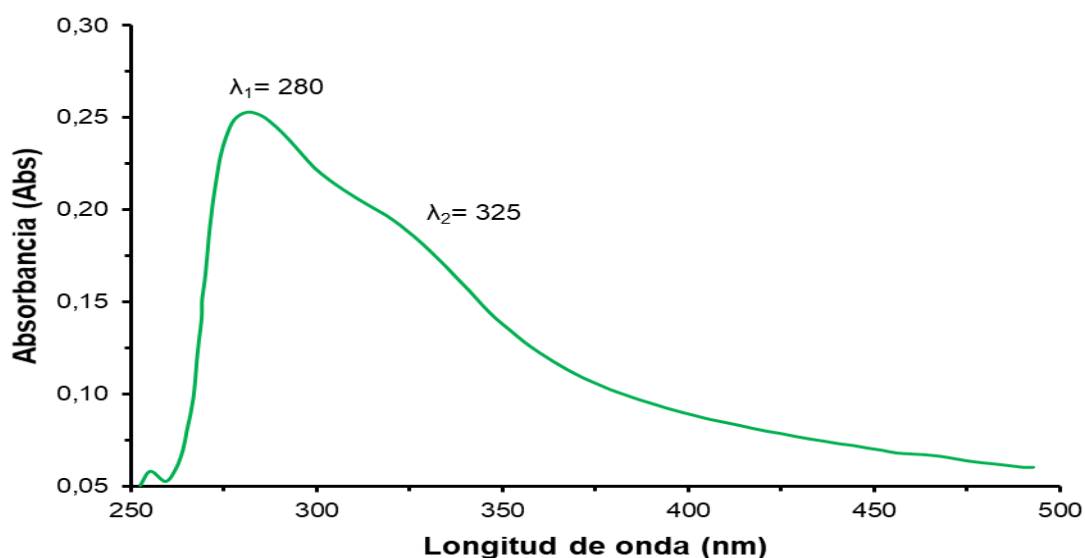


Figura 18. Espectro de absorción UV-vis del AXF extraído.

Teniendo en consideración que el barrido en el UV-vis se realizó pensando en el compuesto fenólico debido a que los grupos funcionales de los polisacáridos presentan poca o nula absorción en el espectro UV-vis; se puede sugerir que la banda de absorción a 325 nm está asociado al compuesto fenólico esterificado sobre el polisacárido. Adicionalmente, se evidenció una banda a 280 nm el cual podría asociarse con la presencia de macromoléculas como proteínas las cuales interactúan intermolecularmente con el AXF dentro de la matriz de la pared celular de los granos de maíz.

V.1.2.12. Espectroscopia infrarroja

La Figura 19 muestra bandas de absorción en el espectro IR en el rango de 4000 y 400 cm^{-1} , como resultado de haber realizado el análisis por FT-IR del polvo seco del AXF extraído a partir del BCJ.

El espectro obtenido presenta bandas de absorción a 3320, 2970, 2880, 1380, 1090, 1050, 616 y 431 cm^{-1} , los cuales se asocian con vibraciones de los siguientes grupos funcionales: $-\text{OH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, $\text{C}-\text{OH}$, $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}-\text{C}$; de manera respectiva. Asimismo, a 880 cm^{-1} se evidenció la vibración de la configuración β del carbono enantiomérico. La relación entre las bandas obtenidas y grupos funcionales permite sugerir que el espectro infrarrojo de la Figura 19 podría corresponder a la estructura típica del AXF extraído a partir del BCJ.

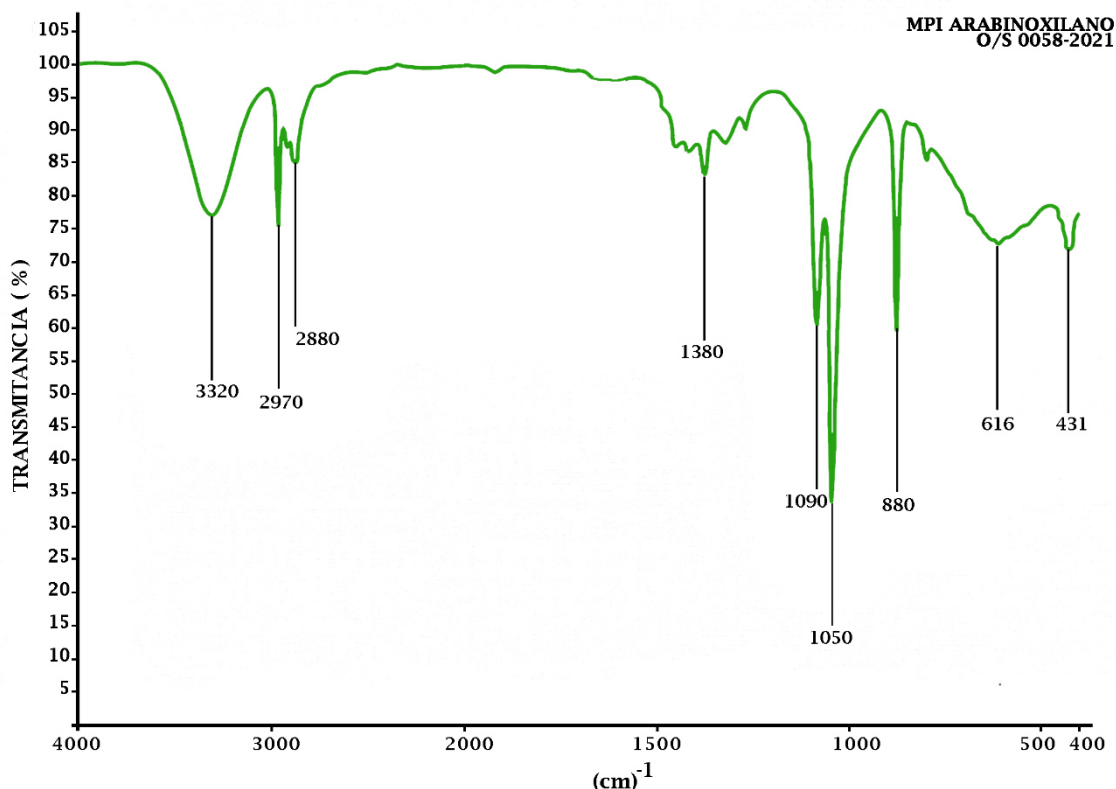


Figura 19. Espectro infrarrojo del AXF extraído.

V.1.3. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*

V.1.3.1. Capacidad de inhibición del radical DPPH[•]

Como se muestra en la Figura 20, diferentes concentraciones entre 0,5 y 10 mg/mL del AXF extraído presentan capacidad de inhibición del radical DPPH[•], el cual se incrementa con el aumento de la concentración del polisacárido. A la concentración de 0,5 mg/mL el % de inhibición fue menor ($18,92 \pm 0,84$ %) incrementándose hasta $61,66 \pm 0,41$ % con 10 mg/mL del AXF extraído. Por otra parte, el mayor porcentaje de inhibición para el estándar de Trolox fue de $74,97 \pm 0,53$ % a una concentración de 0,02 mg/mL. El valor IC₅₀ para el Trolox se calculó empleando la ecuación de regresión lineal de $Y=3787,4X + 1,3536$ ($R^2=0,9951$), el cual se obtuvo a partir de la curva del % de inhibición del radical DPPH[•]. De manera similar, se calculó el IC₅₀ para la muestra. La Tabla 4, resume los valores de IC₅₀ para el estándar y para el AXF en mg/mL, el estándar tuvo un menor valor (0,0128 mg/mL) con lo cual se evidenció que el Trolox presenta una mayor capacidad antioxidante que el AXF (IC₅₀ de 6,5921 mg/mL). La capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) fue de 7,7844 μ mol/g de muestra.

Tabla 4: Resultados de la inhibición del radical DPPH• del AXF extraído y estándar de Trolox

AXF		Trolox	
Concentración (mg/mL)	Inhibición de DPPH• (%)*	Concentración (mg/mL)*	Inhibición de DPPH• (%)*
0,5000	18,92 ± 0,84	0,0010	3,63 ± 1,49
1,0000	22,91 ± 0,55	0,0025	9,76 ± 1,72
2,0000	30,66 ± 1,31	0,0050	19,58 ± 0,23
4,0000	40,99 ± 1,95	0,0075	31,49 ± 0,51
5,0000	45,25 ± 0,74	0,0100	42,26 ± 0,88
6,0000	49,30 ± 0,36	0,0130	51,68 ± 0,31
8,0000	56,77 ± 0,44	0,0160	61,51 ± 1,68
10,000	61,66 ± 0,42	0,0200	74,97 ± 0,53

Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).

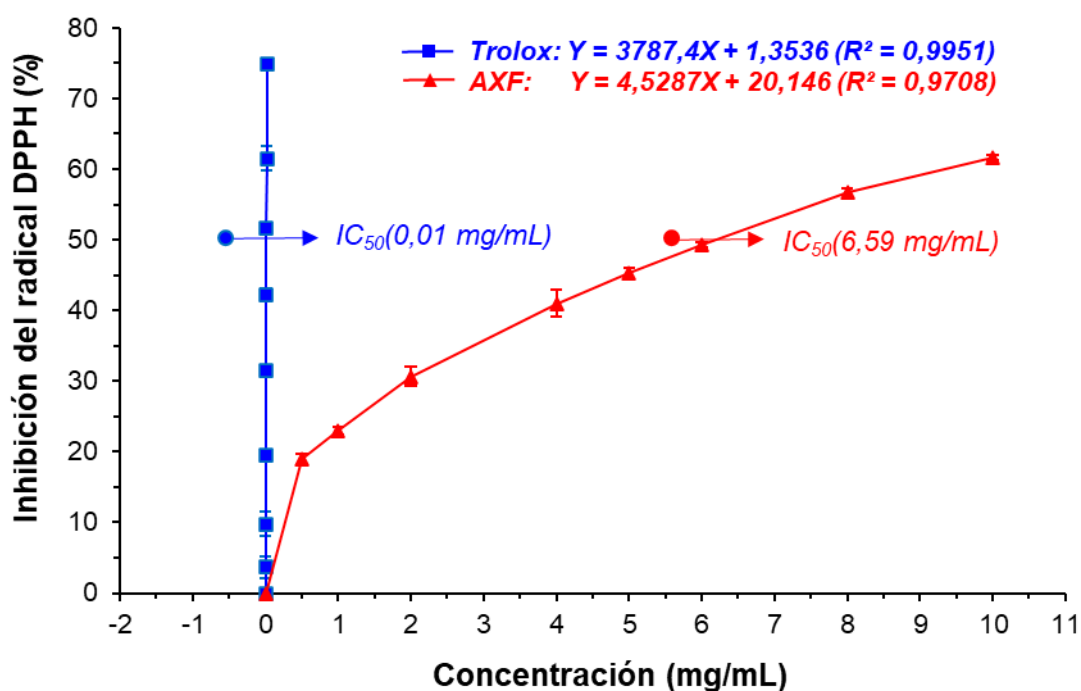


Figura 20. Curvas de Inhibición del radical DPPH• del AXF extraído y estándar de Trolox. Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).

El Anexo 5 presenta las imágenes del ensayo de DPPH•.

V.1.3.2. Capacidad de inhibición del radical ABTS^{•+}

En la determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de ABTS^{•+} se encontró que el AXF extraído presenta una mayor capacidad de inhibición del radical ABTS^{•+} ($71,17 \pm 1,08$ %) a la concentración de 10 mg/mL, así mismo, el menor porcentaje de inhibición ($0,90 \pm 0,30$ %) se dio a la concentración de 0,1 mg/mL de polisacárido. La muestra evidenció una tendencia de incremento en la capacidad antioxidante con el aumento de la concentración (ver la Figura 21), similarmente ocurrió para el estándar. La curva de inhibición del Trolox realizado con ocho diferentes concentraciones, entre 0,0025 y 0,1 mg/mL, permitió obtener una ecuación de regresión lineal de $Y = 857,58X - 0,7305$ con R^2 igual a 0,998. El AXF evidenció una ecuación de regresión lineal de $Y = 7,2578X - 2,8572$ ($R^2=0,9893$) para la curva de inhibición. El valor IC₅₀, la concentración a la cual se inhibe el 50% del radical ABTS^{•+}, fue de 6,50 y 0,0592 mg/mL para la muestra y el estándar de Trolox, respectivamente (véase la Tabla 5). El Trolox presentó una capacidad de inhibición aprox. 11 veces mayor que el AXF al comparar sus valores IC₅₀. Luego de calcular la TEAC se obtuvo un valor de $35,347 \pm 0,94$ μ mol/g de muestra (ver Tabla 9).

Tabla 5: Resultados de la inhibición del radical ABTS^{•+} del AXF extraído y estándar

AXF		Trolox	
Concentración (mg/mL)	Inhibición de ABTS ^{•+} (%)	Concentración (mg/mL)*	Inhibición de ABTS ^{•+} (%)*
0,100	$0,90 \pm 0,30$	0,003	$1,27 \pm 0,88$
0,500	$4,80 \pm 0,26$	0,005	$2,59 \pm 0,45$
1,000	$10,06 \pm 0,79$	0,008	$5,43 \pm 0,31$
2,000	$17,97 \pm 0,69$	0,010	$7,63 \pm 0,22$
4,000	$35,79 \pm 0,53$	0,025	$20,50 \pm 0,22$
6,000	$49,65 \pm 1,79$	0,050	$45,35 \pm 0,08$
8,000	$61,86 \pm 1,65$	0,075	$63,80 \pm 0,94$
10,00	$71,17 \pm 1,08$	0,100	$83,41 \pm 1,30$

*Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

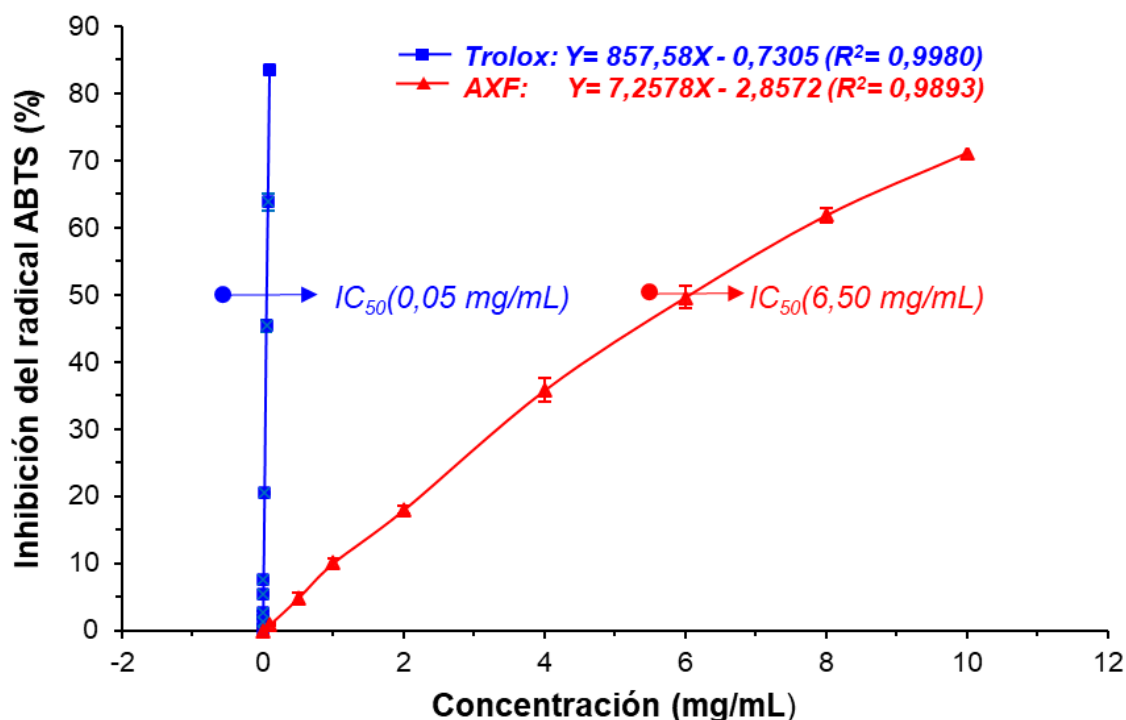


Figura 21. Inhibición del radical ABTS^{••} del AXF extraído y estándar. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

El Anexo 6 presenta las imágenes del ensayo de ABTS^{••}.

V.1.3.3. Ensayo de FRAP

La Figura 22 muestra la curva de calibración para el estándar de ácido ascórbico a concentraciones entre 100 y 1000 $\mu\text{mol/L}$ cuya ecuación de regresión lineal resultó ser de $Y = 0,0008X - 0,0196$ ($R^2 = 0,9956$), la cual permitió el cálculo del valor FRAP en μmol ácido ascórbico/g de muestra el cual se presenta en la Tabla 8. La capacidad antioxidante del valor FRAP expresado en $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ de muestra se calculó mediante interpolación de las absorbancias del AXF a la concentración de 40 mg/mL en la ecuación de regresión lineal de $Y = 0,0003X - 0,0085$ ($R^2 = 0,999$) obtenida mediante la curva de calibración para el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (véase la Figura 23). Los resultados de la Figura 24 permiten evidenciar que el incremento gradual en la concentración del AXF incrementa la capacidad antioxidante del polisacárido, y también que el AXF tiene una capacidad antioxidante menor que la vitamina C. Adicionalmente, la concentración de 40mg/mL del polisacárido alcanzó el máximo valor FRAP ($1465 \pm 11,71 \mu\text{mol/L FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); sin embargo, para el estándar de vitamina C el valor FRAP más

alto fue de $2777,22 \pm 13,33 \mu\text{mol/L FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a la concentración de $0,1761 \text{ mg/mL}$.

Tabla 6: Resultados de absorbancia del AXF extraído y Ácido Ascórbico

AXF		Ácido ascórbico	
Concentración (mg/mL)	Absorbancia (Abs)*	Concentración ($\mu\text{mol/L}$)	Absorbancia (Abs)*
1	$0,013 \pm 0,002$	100	$0,060 \pm 0,005$
8	$0,119 \pm 0,002$	200	$0,145 \pm 0,003$
16	$0,204 \pm 0,007$	300	$0,244 \pm 0,007$
20	$0,261 \pm 0,004$	400	$0,336 \pm 0,006$
25	$0,309 \pm 0,007$	500	$0,401 \pm 0,004$
30	$0,345 \pm 0,005$	600	$0,449 \pm 0,004$
35	$0,369 \pm 0,002$	800	$0,669 \pm 0,012$
40	$0,431 \pm 0,004$	1000	$0,823 \pm 0,004$

Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

Tabla 7: Resultados de absorbancia del AXF extraído y Sulfato Ferroso

AXF		Sulfato ferroso	
Concentración (mg/mL)	Absorbancia (Abs)*	Concentración ($\mu\text{mol/L}$)	Absorbancia (Abs)*
1	$0,013 \pm 0,002$	25	$0,006 \pm 0,003$
8	$0,119 \pm 0,002$	50	$0,011 \pm 0,003$
16	$0,204 \pm 0,007$	75	$0,016 \pm 0,001$
20	$0,261 \pm 0,004$	100	$0,022 \pm 0,002$
25	$0,309 \pm 0,007$	250	$0,079 \pm 0,005$
30	$0,345 \pm 0,005$	500	$0,158 \pm 0,007$
35	$0,369 \pm 0,002$	750	$0,250 \pm 0,005$
40	$0,431 \pm 0,004$	1000	$0,342 \pm 0,006$

Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

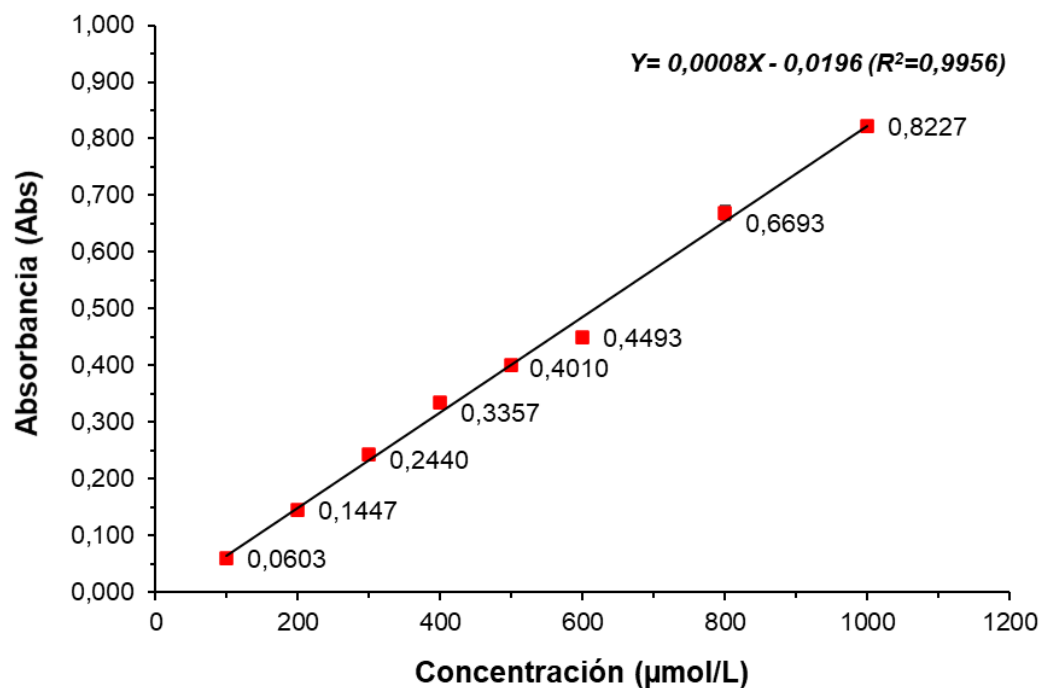


Figura 22. Curva de calibración mediante el ensayo de FRAP empleando ácido ascórbico a concentraciones entre 100 y 1000 µmol/L. Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).

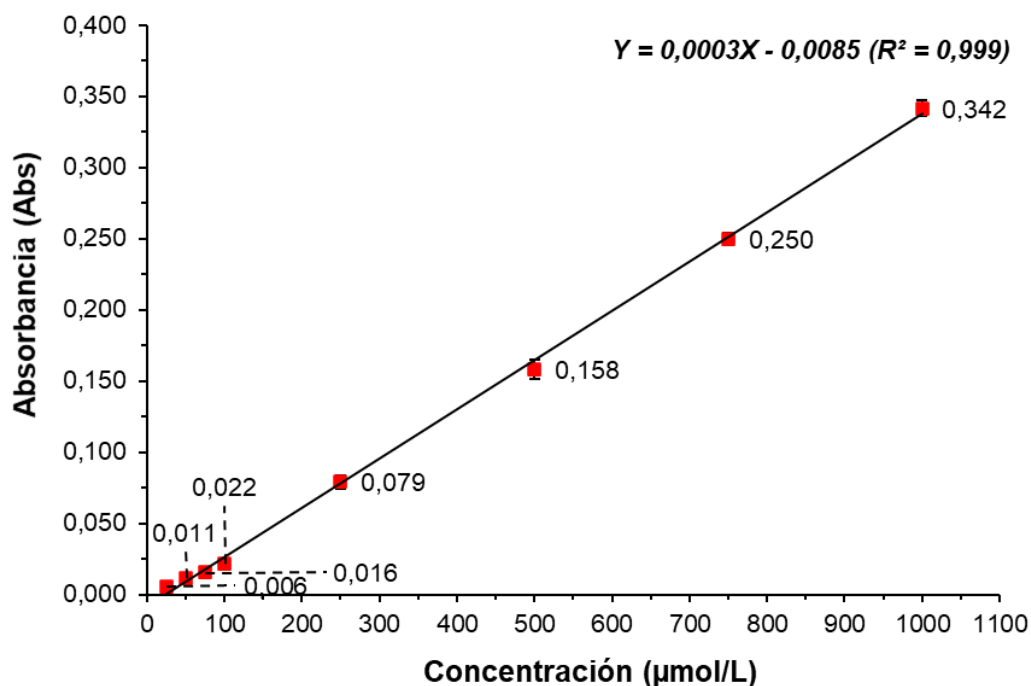


Figura 23. Curva de calibración mediante el ensayo de FRAP empleando sulfato ferroso a concentraciones entre 25 y 1000 µmol/L. Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).

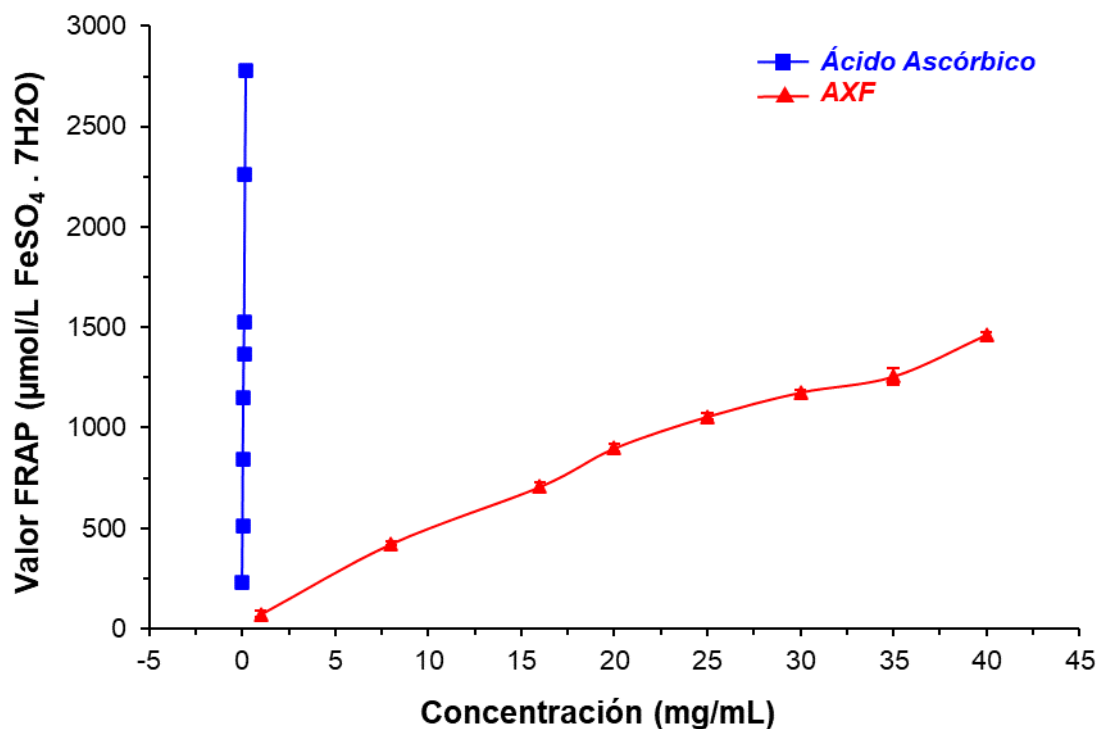


Figura 24. Poder antioxidante reductor férrico del AXF extraído y de la vitamina C a diferentes concentraciones. Los valores se presentan como la media \pm D.E. (n=3).

El Anexo 7 presenta las imágenes del ensayo de FRAP.

En la Tabla 8, respecto a la inhibición del radical DPPH \cdot se puede evidenciar que el estándar de Trolox presenta un poder de inhibir al radical DPPH \cdot aprox. 515 veces mayor que el AXF extraído, luego de contrastar sus valores IC₅₀. Durante el ensayo de inhibición del radical ABTS $^{•+}$ el Trolox presentó una capacidad de inhibición aprox. 11 veces mayor que el AXF al comparar sus valores IC₅₀. Por lo tanto, el AXF presente un mejor desempeño para la inhibición del radical ABTS $^{•+}$ que la inhibición del radical DPPH \cdot .

Tabla 8: Capacidad antioxidante del AXF extraído determinado por los ensayos de DPPH[•], ABTS^{•+} y FRAP

Muestra	Ensayo <i>in vitro</i>	
	DPPH [•]	
	IC 50 (mg/mL)	TEAC (μmol/g muestra)
AXF	6,59 ± 0,03	7,7844 ± 0,08
Trolox	0,013 ± 0,0001	-
	ABTS ^{•+}	
	IC 50 (mg/mL)	TEAC (μmol/g muestra)
AXF	6,50 ± 0,08	35,347 ± 0,94
Trolox	0,059 ± 0,0001	-
	FRAP	
	Valor FRAP (μmol AA/g)	Valor FRAP (μmol FeSO ₄ /g)
AXF	14,081 ± 0,11	36,63 ± 0,29

* IC_{50} = La concentración de compuesto que produce una inhibición del 50%

**TEAC = Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

Todos los resultados se expresan como la media ± D.E. (n=3).

V.1.4. Determinación de la capacidad antihiperlipémica *in vitro*

V.1.4.1. Capacidad de adsorción de glucosa (CAG)

El AXF extraído presentó CAG luego de mezclarse en soluciones de glucosa anhidra de creciente concentración. Los resultados en la Figura 25 muestran que el AXF extraído puede adsorber $1,81 \pm 0,21$; $2,82 \pm 0,25$; $6,21 \pm 1,23$ y $8,10 \pm 1,63$ mmol/g de glucosa a las concentraciones de 10, 50, 100 y 200 mmol/L, respectivamente. Se evidenció una mayor CAG a la concentración de 200 mmol/L y la menor CAG a la concentración de 10 mmol/L, lo cual indica que el AXF muestra una CAG directamente proporcional a la concentración molar de glucosa del medio. A mayor cantidad de glucosa en solución se evidencia mayores cantidades de glucosa unidas al polisacárido (ver Anexo 8).

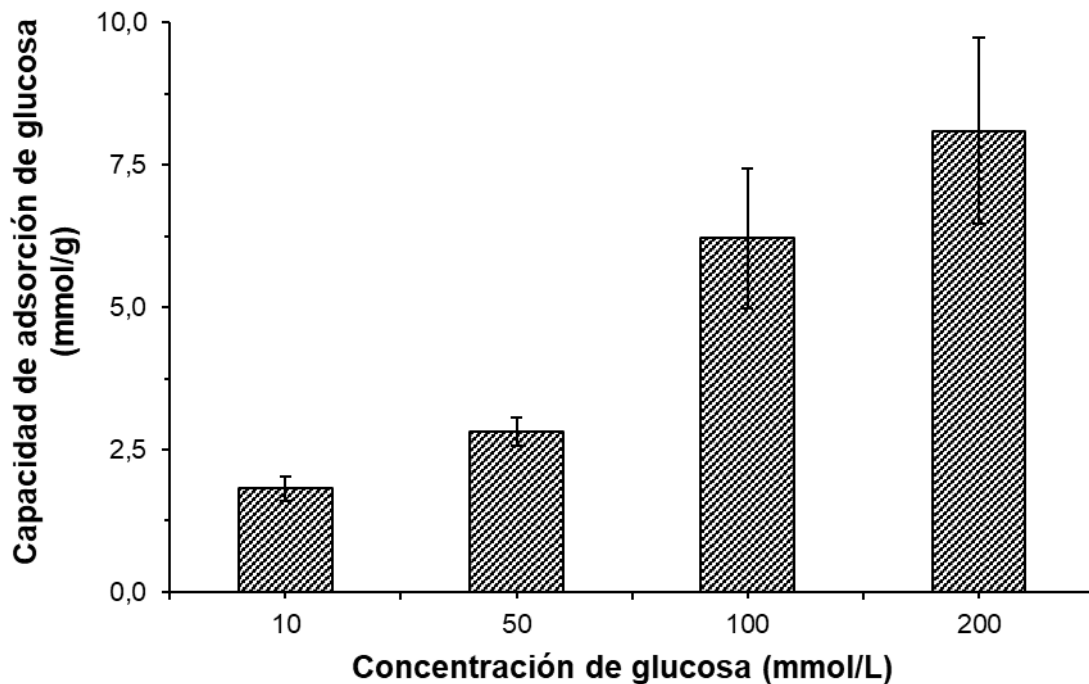


Figura 25. Capacidad de adsorción de glucosa del AXF en soluciones de diferente concentración de glucosa anhidra. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

Tabla 9: Capacidad de adsorción de glucosa del AXF

Concentración de glucosa inicial (mM)	Capacidad de adsorción de glucosa (CAG/g)*
10	1,8 \pm 0,2
50	2,8 \pm 0,2
100	6,2 \pm 1,2
200	8,1 \pm 1,6

*Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

V.1.4.2. Capacidad de inhibición de la difusión de glucosa

La Figura 26 presenta los resultados de capacidad de inhibición de la difusión de glucosa del AXF. En cada grupo de tratamiento (control negativo, acarbosa, AXF 1 mg/mL, AXF 10 mg/ml y AXF 25 mg/mL) se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), la cual se incrementó rápidamente desde los 30 min hasta los 60 min. La concentración de glucosa en el dializado del control negativo, acarbosa, AXF 1 mg/mL, AXF 10 mg/ml y AXF 25 mg/mL a 30 min estuvo en el rango desde $446,56 \pm 20,04 \mu\text{g/mL}$ a $372,14 \pm 44,62 \mu\text{g/mL}$

y desde $866,41 \pm 42,97 \mu\text{g/mL}$ a $798,66 \pm 5,73 \mu\text{g/mL}$ a 180 min. Una comparación con el grupo control negativo permitió observar que el AXF 10 mg/mL a 30 min y el AXF 25 mg/mL, excepto a 180 min, presentan una capacidad de inhibición estadísticamente significativa ($p < 0,05$), los demás grupos inhibieron la difusión de glucosa, pero no con diferencia significativa ($p > 0,05$). El contenido de glucosa en el dializado de todos los grupos de tratamiento han demostrado un efecto de la inhibición del movimiento de glucosa hacia la solución externa a través de la membrana de diálisis de 3,5 kDa comparados con el control positivo (acarbose), pero en su mayoría no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$). Solo el AXF 25 mg/mL a 90 min mostró una diferencia estadísticamente significativa comparada con la acarbose a la misma concentración (ver Anexo 8).

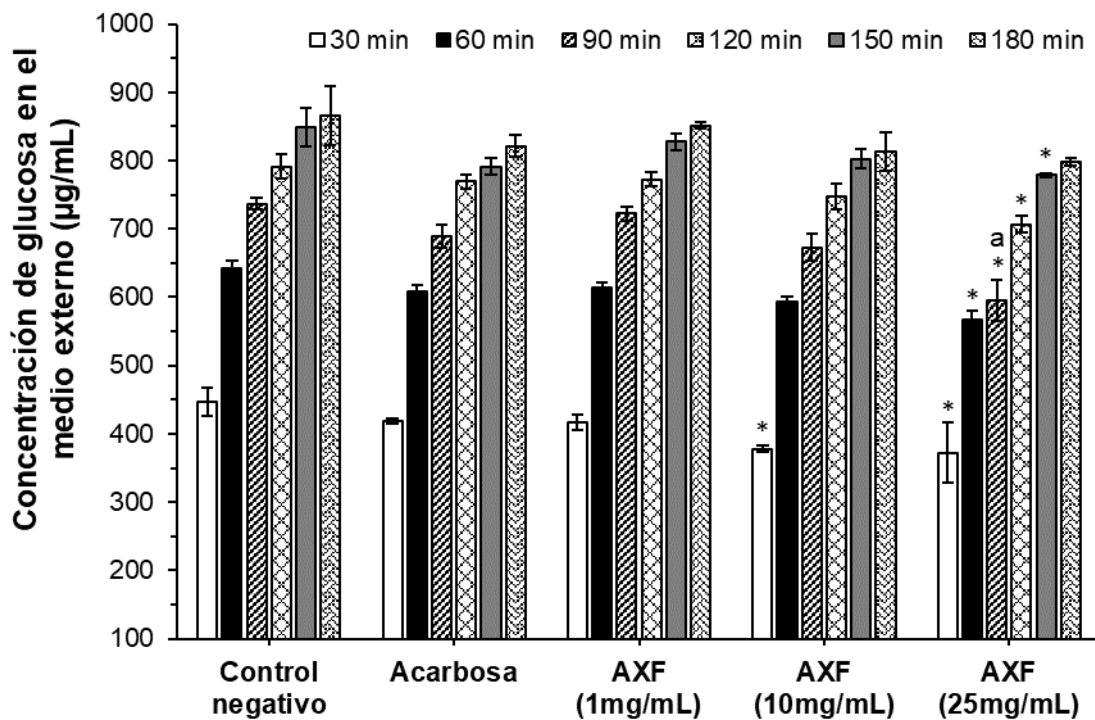


Figura 26. Capacidad de inhibición de la difusión de glucosa de diferentes concentraciones de AXF, control y control positivo evaluada en diferentes tiempos. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. ($n=3$). * $p < 0,05$ comparado con el control negativo. ^a $p < 0,05$ comparado con la acarbose.

V.1.4.3. Capacidad de inhibición de α -amilasa

Los resultados presentados en la Figura 27 muestran que el porcentaje de inhibición de la enzima α -amilasa del AXF extraído se incrementa con la concentración del polisacárido, con lo cual se corrobora su capacidad inhibitoria. Entre las siete diferentes concentraciones la mayor capacidad de inhibición ($46,6 \pm 0,42$ %, $n=3$) ocurrió a una concentración de 5 mg/mL del AXF, sin embargo, a esa misma concentración la acarbosa alcanzó una capacidad inhibitoria de $88,7 \pm 0,33$ % ($n=3$). Cuando la concentración del AXF fue 0,1 mg/mL, el porcentaje de inhibición de la enzima α -amilasa ($11,51 \pm 0,88$ %, $n=3$) fue menor comparada con la acarbosa ($46,24 \pm 2,24$ %, $n=3$) a una concentración de 1mg/mL. Entre las concentraciones de 0,1 y 1 mg/mL hubo mayor variación en el % de inhibición; por lo contrario, entre 2 – 5 mg/mL el incremento fue ligero (ver Anexo 9).

Tabla 10: Capacidad de inhibición de α -amilasa

Concentración (mg/mL)	Inhibición de α -amilasa (%)*	
	Acarbosa	AXF
0,1	$46,24 \pm 2,24$	$11,51 \pm 0,88$
0,5	$61,26 \pm 3,47$	$17,52 \pm 1,19$
1	$78,55 \pm 2,36$	$30,79 \pm 0,24$
2	$87,50 \pm 0,19$	$37,21 \pm 0,72$
3	$88,23 \pm 0,17$	$43,07 \pm 0,57$
4	$88,05 \pm 0,19$	$44,13 \pm 0,49$
5	$88,71 \pm 0,33$	$46,60 \pm 0,42$

*Los resultados se expresan como la media \pm D.E. ($n=3$).

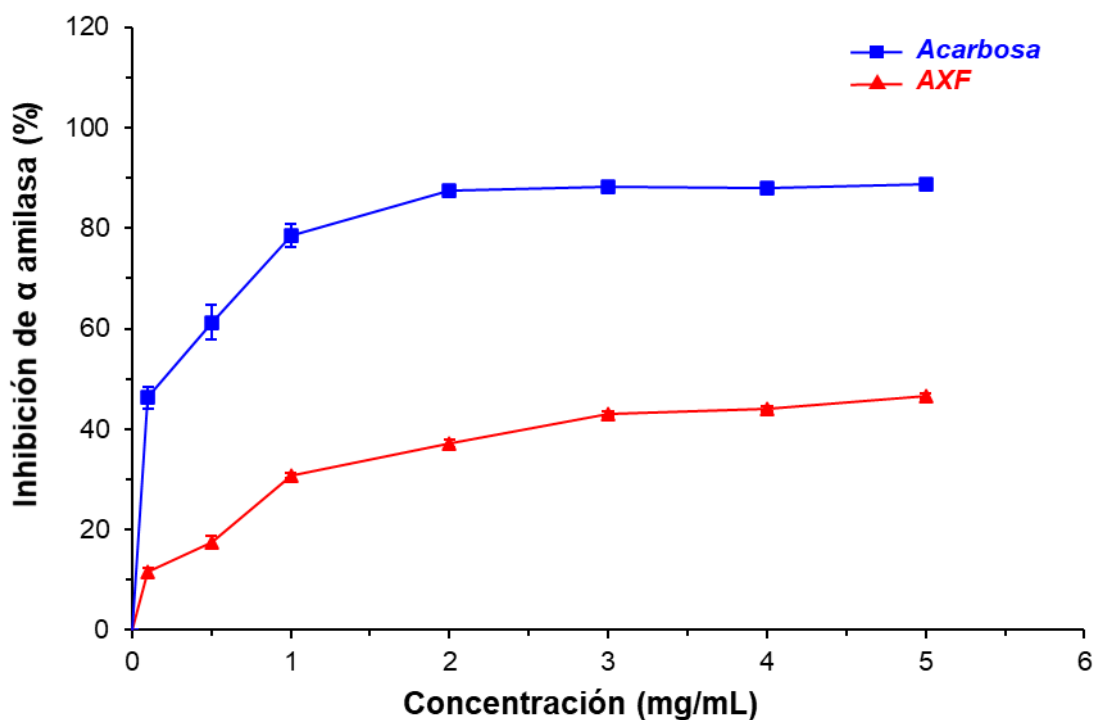


Figura 27. Resultados de inhibición de α -amilasa del AXF y acarbosa. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3).

La Tabla 11 muestra que el valor IC_{50} del AXF es significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto a la acarbosa; sin embargo, el valor IC_{50} de la muestra de polisacárido es 14 veces mayor por lo cual la acarbosa presenta una mayor capacidad de inhibición que el AXF.

Tabla 11: Valores IC_{50} para la inhibición de la enzima α -amilasa del AXF extraído y la acarbosa

Muestra	Valor IC_{50} (mg/mL)*
AXF	4,73 \pm 0,05
Acarbosa	0,35 \pm 0,001

*Todos los resultados se expresan como la media \pm D.E. (n=3)

VI. DISCUSIÓN

El AXF fue extraído a partir de los residuos desengrasados y desamylados de la fibra del pericarpio del maíz derivado del proceso de elaboración de CJ empleando NaOH a razón de 2meq de álcali/g de fibra en presencia de H₂O₂ 30 %. El rendimiento de extracción del AXF del BCJ fue 19,87 ± 4,56 %, un rendimiento similar al reportado para el AXF extraído del pericarpio de maíz (18%) por Yadav *et al.*⁹⁵ quienes emplearon NaOH y Ca(OH)₂ a razón de 2meq de álcali/g de fibra en presencia de H₂O₂ 30 %. Un rendimiento ligeramente mayor (38%) fue determinado por Kamboj y Rana⁶² para el AXF extraído del salvado de maíz bajo similares condiciones del método de extracción empleada para extraer el AXF del BCJ. Por otra parte, Buksa *et al.*⁸⁶ reportaron un rendimiento de 1,7 % y 3,2 % para el AX procedente del trigo y centeno respectivamente, en ambos casos extraídos por el método acuoso. El AX no es eficazmente extraído empleando agua como solvente de extracción a diferencia de otras técnicas de ruptura de enlaces como tratamientos con álcali y enzimáticos los cuales permiten una mayor remoción del AX, debido a que el mayor porcentaje de AX interactúa mediante uniones covalentes y no covalentes con otros componentes estructurales de la pared celular de los cereales. Las condiciones alcalinas permiten la ruptura de enlaces éster y puentes de hidrógeno dentro de la pared celular⁹⁶. Maes y Delcour⁹⁷ indican que las soluciones alcalinas con H₂O₂ reaccionan rápidamente con la lignina para formar productos oxidados solubles en agua de bajo peso molecular, lo cual ocasiona la ruptura en la unión de lignina y AXF. El H₂O₂ en medio alcalino forma un anión altamente reactivo que oxida los grupos hidrofílicos de la lignina, el anión hidroperóxido (HOO⁻)⁹⁸. Xinyi⁹⁹ reportó un rendimiento entre 26 y 34 % para el AXF extraído con álcali entre 100 y 120 °C a partir de granos secos de destilería (GSD) derivados de la fabricación industrial de alcohol (compuestos principalmente por salvado de trigo) y señala que la temperatura se relaciona directamente con el rendimiento durante la extracción alcalina.

El resultado de la solubilidad del AXF del BCJ presentado en la Tabla 1 fue similar al reportado previamente por Höjje *et al.*¹⁰⁰ para AX aislado de la cáscara de avena. La solubilidad acuosa se debe a la elevada presencia de grupos

hidroxilo (OH^-) en la cadena del polisacárido y por ende a su mayor capacidad de formar puentes de hidrógeno. Por otra parte, la baja solubilidad acuosa se debe al elevado grado de polimerización y a la existencia de puentes de hidrógeno de alta resistencia entre macromoléculas del polisacárido, teniendo en cuenta que la solubilidad del AXF depende de la ruptura de estos puentes de hidrógeno¹⁰¹. Además, el polisacárido podría tener una naturaleza anfifílica en la que los anillos de los monosacáridos representarían una región apolar con una gran tendencia a unirse en medio acuoso, favoreciendo la baja solubilidad¹⁰². En concordancia con los resultados mostrados en la Figura 9, Lindman *et al.*¹⁰² señalaron que las altas temperaturas disminuyen el tiempo de disolución; sin embargo, se añadió que el peso molecular del polisacárido es un factor a considerar durante la disolución.

El contenido de humedad nos ayuda a predecir el crecimiento microbiano en la muestra del AXF, lo cual puede acelerar la descomposición y generar toxinas¹⁰³. El AXF del BCJ (secado en estufa a 50°C por 48 h) presenta un contenido de humedad de $8,00 \pm 1,77$ %, un valor menor que el encontrado para el AXF de los GSD por Bell¹⁰⁴ (12,1 %, secado en estufa a 50°C por 96 h).

El pH es una característica fisicoquímica que nos ayuda a deducir la solubilidad, estabilidad, irritabilidad y permeabilidad en membranas biológicas de una sustancia. Asimismo, determina la compatibilidad en formulaciones⁸¹. Una solución de AXF al 1 % (p/v) dio un pH de $5,81 \pm 0,02$; sin embargo, este valor es ligeramente más ácido que el pH del AX del salvado de arroz (pH = $6,19 \pm 0,03$)¹⁰⁵. Esto puede deberse a la presencia de ácido urónico y a una mayor cantidad de ácidos fenólicos libres¹⁰⁶.

El porcentaje de cenizas totales en el AXF ($2,68 \pm 0,01$ %) sugiere la presencia de sustancias residuales inorgánicas no volátiles. Generalmente, las cenizas totales están compuestas por óxidos, carbonatos, oxalatos y silicatos de metales¹⁰⁷. Jacquemin *et al.*¹⁰⁸ emplearon la ultrafiltración como técnica de purificación de minerales y de moléculas orgánicas pequeñas como azúcares libres, los autores encontraron un porcentaje de cenizas de 5,5 % y sugieren que

el elevado contenido de cenizas podría deberse a la presencia del metal sodio (Na) procedente del uso de NaOH durante la etapa de extracción del AX.

El AX contiene pequeñas pero significativas cantidades de proteínas las cuales contribuyen al poder emulsificante del polisacárido. Los aminoácidos predominantes en el AX del maíz son la prolina y glutamina¹⁰⁹. El contenido de proteína del AXF del BCJ fue $3,78 \pm 0,02$ %, similar al valor obtenido para el AX de trigo ($3,70 \pm 0,05\%$)¹¹⁰. No obstante, el contenido de proteína en el AXF reportado por Mendez-Encinas *et al.*¹⁰⁹ fue 8,2%. Los resultados indican que en el AXF las proteínas forman un complejo que no puede ser fácilmente desestabilizado aún bajo tratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino.

El conocimiento de las propiedades micromeríticas del polvo seco del AXF es importante para justificar su potencial utilización como excipiente en formulaciones farmacéuticas. En el presente estudio se evidenció que el AXF del BCJ presenta un buen comportamiento de fluidez, lo cual coincide con lo demostrado por Erum *et al.*¹¹¹ para el AX de la cáscara de *Plantago ovata*. Por otra parte, Pawar *et al.*¹¹² sugiere que los polisacáridos con buenas propiedades de fluidez comprobadas mediante la determinación del ángulo de reposo, densidad aparente, densidad compactada, índice de Hausner e índice de Carr, podrían ser usados en la formulación de tabletas preparadas por compresión directa.

La importancia al determinar la viscosidad del AXF radica en que esta característica fisicoquímica determina en gran parte la influencia del polisacárido sobre el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos^{113,114}. La viscosidad intrínseca es el valor que refleja el volumen hidrodinámico ocupado por una molécula individual de polímero¹¹⁵. Los resultados obtenidos y mostrados en la Figura 10 confirman que el comportamiento de la viscosidad de un polisacárido en solución guarda una relación directa con la concentración del polímero^{85,116}, por ello una viscosidad intrínseca de $1,983 \pm 0,01$ dL/g correspondió a la más alta concentración y $0,121 \pm 0,02$ dL/g a la menor. Se han reportado valores de η_{int} de AX desde 0,8 hasta 5,48 dL/g¹¹⁷ y para los AXEA puede llegar a ser hasta de 13dL/g¹¹⁸. Asimismo, entre otros factores que afectan esta propiedad se

encuentran el peso molecular^{116,118}, longitud de la cadena, grado y patrones de sustitución, y la unión con ácido ferúlico¹¹⁷. Cabe resaltar que no se ha podido conocer la correlación entre la viscosidad y el peso molecular de la muestra con certeza debido a que se trabajó con el AXF de peso molecular $\geq 3,5$ kDa.

La estimación del contenido fenólico total incluye a los compuestos fenólicos que se encuentran unidos covalentemente a los residuos de arabinosa (ácido ferúlico y ácido p-cumárico) y a los que se encuentran libres. En este contexto, Lopez-Martinez *et al.*¹¹⁹ indicaron que la mayor proporción de compuestos fenólicos se encuentra en su forma ligada (esterificada), y solo un 20 % del contenido fenólico total corresponde a la forma libre (no esterificada). El contenido fenólico total del AXF extraído por el método de peróxido de hidrógeno alcalino a partir del BCJ fue $5,72 \pm 0,11$ mg EAG/ g de peso de polisacárido seco, el cual fue menor al valor de $67,66 \pm 4,71$ mg EAG/ g reportado por Kamboj *et al.*⁶² para el AXF extraído por el mismo método. Es probable que el menor contenido fenólico se deba a que la germinación del grano de maíz (durante la elaboración de la chicha de jora) disminuya el contenido fenólico, concordando con la investigación de Ramadan *et al.*¹²⁰ quienes concluyen que la germinación disminuye el contenido fenólico del grano del maíz. Asimismo, Rao y Muralikrishna¹²¹ evidenciaron una disminución en el contenido fenólico del AXF extraído de arroz luego de un proceso de malteado. Por otro lado, el resultado obtenido es ligeramente mayor que el del AX de Ayala-Soto *et al.*²³ ($3,29$ mg EAG / g de muestra seca) procedente de fibras de salvado de maíz no delignificadas, estos autores además concluyen que el perfil de ácidos hidroxicinámicos varía de acuerdo a las condiciones de extracción y a la fuente de la fibra del maíz. Análogamente, en una investigación llevada a cabo por Kim *et al.*¹²² se obtuvo un contenido fenólico total para el salvado de trigo blanco de $3,36$ mg EAG/g de salvado, resultado ligeramente inferior al del AXF extraído en la presente investigación.

Los monosacáridos constituyentes del AXF del BCJ fueron identificados por CCF, como se indica en la Tabla 3 se identificó la presencia de L-Arabinosa y D-Xilosa luego de hidrolizar al polisacárido. Sin embargo, debido a que la mancha de la muestra de AXF hidrolizado mostró una cola de longitud considerable luego de la elución (ver Figura 12), se puede presumir la presencia

de otros monosacáridos. Li y Du¹²³ reportaron que el AX está compuesto en un 80 % por monosacáridos de arabinosa y xilosa aunque también identificaron galactosa en baja proporción como resultado de realizar una cromatografía de gases con detector de ionización a la llama. En general, la identificación de monosacáridos del AXF del BCJ determinada por CCF fue similar a lo señalado en el estudio de Saghir *et al.*¹²⁴ para el AX, en el cual mediante HPLC – UV, se identificaron monosacáridos de xilosa, arabinosa, ramnosa y galactosa, los dos últimos en cantidades traza.

La elucidación estructural del AXF mejora la comprensión de las propiedades fisicoquímicas y la relación estructura-actividad biológica. En este estudio, la hidrólisis del AXF fue llevado a cabo por metanólisis ácida, la cual permite la ruptura de enlaces glicosídicos por introducción de grupos metilo y para formar consecuentemente metil-glicósidos. La Figura 17(a) del espectro de masas obtenido mediante PRM con m/z 163,0611967 a t_R 7,21 min presenta un primer ion con intensidad detectable correspondiente al ión formado a partir del ion molecular por pérdida de un átomo de hidrógeno, $[M-H]^-$, también llamado ion cuasimolecular¹²⁵. Devi *et al.*¹²⁶ observaron un m/z 149,43 para el ion aniónico de monómeros de pentosa luego de hidrólisis parcial del AX con HCl 1M. Asimismo, en el estudio de Jung *et al.*¹²⁷ se indica que luego de la metilación la masa de la molécula incrementa en 14Da. Por lo tanto, se sugiere que el ion cuasimolecular obtenido (m/z 163.06) luego de hidrolizar el AXF, correspondería a la presencia de moléculas de metil-pentofuranósidos o metil-pentopiranosidos (isómeros anoméricos). La espectrometría de masas no permite discriminar compuestos que tienen un mismo peso molecular que difieren en la disposición espacial de sus grupos funcionales, como es el caso de la L-Arabinosa y D-Xilosa que son monosacáridos diastereoisómeros en C-4¹²⁸. Mócsai *et al.*¹²⁹ muestran espectros obtenidos por GC-MS de 3-O-metil-arabinosa y 3-O-metilxilosa con picos característicos de m/z 190, m/z 130 y m/z 87 para ambos monosacáridos, pero los autores analizan un tercer monosacárido metilado (3-O-metil-arabinosa) la cual presenta picos m/z 118 y m/z 85, con lo cual se podría sugerir que la metilación de los monosacáridos del AXF presentan principalmente metilación en el C-3. Los iones de m/z 145,05 y m/z 131,03 corresponderían a la pérdida neutra por fragmentación de H₂O y CH₃OH,

respectivamente, de los azúcares monoméricos de metil-arabifuranosa y la metil-xilopiranososa, fragmentación que fue similar a lo evidenciado previamente por Nagar *et al.*¹³⁰ para monosacáridos metilados y analizados por ESI-EM. Asimismo, el fragmento con pico m/z 59,01 concuerda con el espectro obtenido por LC-ESI-QQ-MS/MS para la arabinopiranososa (récord PS109408) publicada en base de datos de espectros de masa MassBank (<http://www.massbank.jp>)¹³¹. En el estudio de Sárossy *et al.*¹³² se adicionó grupos acetilo a los monosacáridos evidenciándose fragmentaciones con pérdidas de grupos ceteno (42 Da) y de fragmentos de 73 Da para metil-2,3,4-tri-O-acetil-D-xilopiranososa y metil-2,3,5-tri-O-acetil-D-arabinofuranosa, respectivamente; sin embargo, estos resultados no se encuentran en línea con el patrón de fragmentación hallado en el presente trabajo debido a que los monosacáridos obtenidos luego de la hidrólisis del AXF no fueron acetilados químicamente. En otro estudio, se empleó oligosacáridos derivados del AX de estructura, grado de polimerización y patrón de sustitución con arabinosa conocida adquiridos comercialmente, en cual el análisis por cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) acoplado a MS/MS de la muestra sin derivatizar permitió confirmar los enlaces C-2 y/o C-3 de arabinofuranosil con o sin cadena lineal de xilopiranosil unidas por enlace $\beta(1-4)$ ³⁴. En la presente investigación no se llevó a cabo la derivatización de los monosacáridos liberados luego de la metanólisis. Maina *et al.*¹³³ señala que en el análisis de polisacáridos no derivatizados es preferible usar el modo negativo de ionización (ESI-MS/MS), y sugiere que la fragmentación ocurre desde el extremo terminal no reductor hacia el extremo reductor para producir un extremo no reductor ionizado negativamente. En la Figura 17(b), se puede evidenciar que la muestra del polisacárido presenta picos con m/z 194,07 y m/z 175. De acuerdo a los reportes previos de Sinosaki *et al.*¹³⁴ y He *et al.*¹³⁵ el ácido ferúlico presenta tres m/z característicos: 1) m/z 193, relacionado a la deprotonación del ácido carboxílico, 2) m/z 178, correspondiente a la pérdida por demetilación del grupo metoxi y 3) m/z 134 correspondiente a la pérdida de carbonilo (CO). Sin embargo, en el espectro encontrado de la Figura 17(b) no se evidencia el pico relacionado a la pérdida del grupo CO por lo cual no correspondería al ácido ferúlico. Los iones precursores con m/z 193,07304; m/z 193,07368; m/z 193,07314; m/z 193,07274; m/z 193,07285 (Figura 16 (c1 - c5)) contienen fragmentos que corresponderían

a los monosacáridos, posiblemente procedentes de metil-hexafuranósidos o metil-hexapiranosidos (isómeros anoméricos). Ello luego de comparar con el espectro de masas de un metil-hexopiranosido (m/z 193,07174, [H-]), publicado en la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)¹³⁶ con cuatro fragmentos (m/z 59,013; m/z 71,013; m/z 85,029; m/z 101,023) obtenidos en modo negativo usando el equipo LC-ESI-Orbitrap.

Los picos de absorción durante el barrido UV-vis del AXF del BCJ ocurrieron a 280 nm y 325 nm. Respecto al pico de absorción a 280 nm, Guo *et al.*¹³⁷ indican que dicho pico se relaciona con la existencia de proteínas, lo cual es consistente con la cuantificación de proteína realizada. El brazo de absorción evidenciado a 325 nm, de acuerdo a Li *et al.*¹³⁸ se atribuye a compuestos fenólicos unidos a residuos de arabinosa. Por otra parte, Xie *et al.*¹³⁹ mencionan que la aparición de bandas alrededor de 324 nm (transición $n \rightarrow \pi^*$ de enlaces C=O y C=C conectados al anillo de benceno) sugiere la presencia de unidades de compuestos fenólicos conjugados (ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico).

Una molécula al absorber un haz de luz infrarroja (IR) sufre un movimiento o transición vibracional, a diferencia de la radiación por microondas que estimula el movimiento rotacional. En la espectroscopía por IR las moléculas pueden manifestar dos tipos de vibración: estiramiento y flexión¹⁴⁰. El espectro infrarrojo para el AXF extraído en el presente trabajo (Figura 19) muestra patrones y bandas de absorción característicos identificados previamente para el AXF por Aslam-Khan *et al.*¹⁴¹, Qing *et al.*¹⁴², y González-Estrada *et al.*¹¹⁰. La banda amplia a 3320 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento del grupo funcional hidroxilo (-OH) de los polisacáridos¹⁴³. El patrón de bandas a 2970 cm^{-1} y 2880 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento C-H del grupo alifático saturado $-\text{CH}_2$ ¹⁴⁴. Adicionalmente, la absorción a 1380 cm^{-1} es asignada a la tensión simétrica C=O, el cual se asoció previamente con la presencia de ácido urónico en la estructura del AXF por Guo *et al.*¹³⁷. Las transiciones vibracionales ocurridas entre 1200 y 800 cm^{-1} corresponden a la región de huella dactilar. La absorción a 1090 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento antisimétrica C-O-C típico del enlace glicosídico del polisacárido, mientras que una banda central a 1050 cm^{-1} se asigna a la vibración de flexión del enlace C-OH¹⁴⁵. A 880

cm^{-1} se evidenció una banda que indica la configuración β del carbono enantiomérico de las unidades piranósicas¹³⁷. Al igual que Li *et al.*¹³⁸ y Qing *et al.*¹⁴², no se evidenció absorción a 850 cm^{-1} asociados a la configuración α del monosacárido furanósico de arabinosa. Asimismo, la banda a 616 cm^{-1} podría estar asociado a vibración C=C del anillo aromático del ácido ferúlico¹⁴⁶, mientras tanto a 431 cm^{-1} se podría indicar el estiramiento del enlace C-C¹⁴⁵. Por otra parte, el espectro IR para el AXF del BCJ no reflejó la existencia de proteínas pese a haberse cuantificado; lo cual difiere con la investigación llevada a cabo por De Anda-Flores *et al.*¹⁴⁷, en la cual se sugiere la existencia de proteínas al evidenciarse bandas de absorción entre 1640 y 1533 cm^{-1} dentro del espectro IR del AXF extraído a partir de granos residuales de la fermentación bioetanólica.

En este estudio, se emplearon los ensayos *in vitro* de DPPH \cdot , ABTS $^{+\cdot}$ y FRAP para investigar la capacidad antioxidante del AXF extraído del BCJ. Estudios recientes indican que la capacidad de inhibición de radicales libres del AXF se encuentra correlacionado positivamente con la presencia de ácido ferúlico¹⁴⁸. Dentro de la estructura química del ácido ferúlico la presencia del grupo carbonilo (-CO-) en posición *para*- del anillo fenólico causa la deslocalización de electrones para originar el radical fenoxi, el cual se estabiliza por la presencia del grupo *o*-metoxi (-CH₃)¹⁴⁹. Es la formación del radical resonante fenoxi que da lugar al poder reductor del ácido ferúlico a través de la donación de átomos de hidrógeno¹⁵⁰. Szeląg *et al.*¹⁵¹ indican que la transferencia de átomos de hidrógeno es el mecanismo antioxidante termodinámicamente más favorecido en comparación a la transferencia del electrón único (acoplada a la transferencia de protón) para el ácido ferúlico. La capacidad antioxidante del AXF puede ser expresado por el % de inhibición del radical DPPH \cdot , el AXF extraído del BCJ mostró capacidad de inhibición del radical DPPH \cdot dependiente de la concentración. A la concentración de 5 mg/mL , el porcentaje de inhibición para el AXF extraído del BCJ fue $45,25 \pm 0,74 \%$; un valor ligeramente superior a lo reportado en el estudio de Jiang *et al.*¹⁵², quienes a la misma concentración obtuvieron una inhibición del $42,64 \%$ para el AXF extraído del salvado de maíz usando álcali asistido por microondas ultrasónico. Sin embargo, el valor IC_{50} obtenido ($6,59 \pm 0,03 \text{ mg/mL}$) fue menor que el IC_{50} ($1,3 \text{ mg/mL}$) señalado por

Yuwang *et al.*¹⁵³ para el AXF extraído del salvado de arroz por tratamiento enzimático. Una comparación del valor IC₅₀ calculado por el método de DPPH• para el AXF del BCJ con el IC₅₀ encontrado previamente por Wan *et al.*¹⁵⁴ y Hafsa *et al.*¹⁵⁵ para los polisacáridos de las algas *Laminaria japonica* (23,76 mg/mL) y *Nannochloropsis oculata* (> 10 mg/mL) respectivamente, podría ser indicativo de una mejor capacidad antioxidante para el polisacárido extraído del BCJ. La capacidad antioxidante del AXF expresado en TEAC fue 7,784 ± 0,08 μmol TEAC/g, un valor menor que el obtenido por Marquez-Escalante y Carvajal-Millan⁸⁹ para el AXF de los residuos de maíz derivados de la producción industrial de etanol (18 μmol TEAC/g). En general, Salazar-López *et al.*¹⁵⁶ revelaron que los procesos térmicos reducen el contenido fenólico en función del tiempo y temperatura de exposición, lo cual también sugiere una disminución de la capacidad antioxidante; esta podría ser una explicación del menor poder antioxidante obtenido en este estudio teniendo en cuenta que durante el proceso de elaboración de la CJ el maíz de jora geminado y triturado es hervido a 100 °C entre 1-2 h.

Los resultados de este estudio están en concordancia con los hallazgos de Hromádková *et al.*¹⁵⁷, en el cual el AXF presentó mayor capacidad antioxidante en el ensayo de ABTS^{•+} (medio acuoso) en comparación con el ensayo DPPH• (medio parcialmente acuoso). Chen *et al.*¹¹³ señalan que el AXF muestra un comportamiento hidrofílico por lo que su perfil antioxidante se ve favorecido en un medio de igual naturaleza, lo cual genera un incremento de la concentración efectiva de ácido ferúlico en el medio acuoso asociado a su esterificación sobre los residuos de arabinosa en la cadena del polisacárido, ya que el ácido ferúlico no esterificado es muy poco hidrofílico. Recientemente, Paz-Samaniego *et al.*¹⁵⁸ han reportado una capacidad antioxidante de 6,1 ± 0,1 μmol TEAC/g determinado por el ensayo de ABTS^{•+} para el AXF aislado del subproducto obtenido luego de la nixtamalización del grano de maíz (nejayote). Asimismo, Marquez-Escalante *et al.*¹⁵⁹ han señalado que el AXF extraído con álcali a partir de los granos de destilería de maíz derivados de la fabricación industrial de alcohol presentan una capacidad antioxidante de 11,3 μmol TEAC/g (para el ensayo de ABTS^{•+}). Estos resultados son menores en comparación con el resultado de la investigación actual (35,3 ± 0,9 μmol TEAC/g) para el AXF del

BCJ en el ensayo de ABTS^{•+}. Por otra parte, nuestro resultado es cercano al valor previamente reportado por Paz-Samaniego *et al.*¹⁵⁸ de $39,2 \pm 1$ $\mu\text{mol TEAC/g}$, y es menor que lo informado por De Anda-Flores *et al.*¹⁴⁷, en estos dos últimos los resultados de ABTS^{•+} corresponden al AXF extraído de GSD.

El ensayo de FRAP mide el potencial de un antioxidante de poder reducir el ion férrico (Fe^{+3}) para producir el ion ferroso (Fe^{+2}) de coloración azul en un medio de bajo pH, y proporciona una estimación de la habilidad para donar un átomo de hidrógeno y romper la cadena de radicales libres a diferencia de los ensayos de DPPH y ABTS en los cuales el antioxidante inhibe radicales libres⁽¹⁶⁰⁾. El poder reductor del AXF del BCJ expresado como el valor FRAP fue $36,6 \pm 0,3$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, el cual es mayor que el valor reportado previamente por Hu *et al.*¹⁶¹ para el AXF comercial, $5,6$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Pérez-Flores *et al.*¹⁶² obtuvieron un valor FRAP ligeramente mayor (49 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) para el AXF obtenido por extracción alcalina a partir de los granos residuales de cebada malteada derivados de la producción de cerveza. Sin embargo, el resultado del presente estudio fue menor que el valor reportado por Yuwang¹⁶³ ($786,2$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) quien extrajo el AX enzimáticamente del salvado de arroz bajo precipitación con etanol al 60 %, este último también indicó que el poder reductor es influenciado por el grado de etanol empleado para precipitar el polisacárido (menor capacidad antioxidante con etanol de 90%). Aunque los datos de la capacidad antioxidante del AXF pueden parecer controversiales, la comparación entre diferentes estudios es una tarea difícil teniendo en consideración las diferencias entre los métodos de extracción, naturaleza de la fuente de extracción, contenido fenólico, grado de sustitución, grado de polimerización y peso molecular del polisacárido.

La diabetes es un trastorno metabólico asociado a estados de hiperglucemia crónica; por lo tanto, uno de los objetivos terapéuticos es controlar la glucemia postprandial. Estudios previos han confirmado la disminución eficaz de las concentraciones de glucosa en sangre en seres humanos luego de aumentar el consumo de carbohidratos complejos y una dieta rica en fibra. Los principales mecanismos de reducción en los niveles de glucemia por productos ricos en fibra son: disminución de la concentración de glucosa disponible por adsorción de la glucosa, obstaculización de la difusión de glucosa por incremento de la

viscosidad en el sistema, inhibición de la actividad enzimática de la α -amilasa y α -glucosidasa¹⁶⁴. La CAG es un indicador que permite intuir la capacidad antihiperlicemiantes. Los resultados de la CAG en diferentes concentraciones molares de glucosa (10-200 mmol/L) son indicativos de que el AXF puede adsorber glucosa efectivamente y por ende podría jugar un rol importante en disminuir las concentraciones de glucosa postprandial. La capacidad del AXF del BCJ para poder adsorber glucosa (1,81 – 8,10 mmol/g) fue mayor que los valores reportados para el polisacárido de la fibra dietaria insoluble del salvado de arroz (0,01 – 1,04 mmol/g, determinado en concentraciones de glucosa entre 5 – 200 mmol/L)¹⁶⁵ y ligeramente menor respecto al polisacárido de la fibra dietaria insoluble del salvado del grano fino foxtail "*Setaria italica*" (3,72 – 16,74 mmol/g, determinado en concentraciones de glucosa entre 50 – 200 mmol/L)⁹². En el estudio previo llevado a cabo por Chen *et al.*¹⁶⁶ se evidenció que el AX extraído del salvado de triticale (cereal híbrido entre trigo y centeno) presenta una CAG relacionado proporcionalmente al peso molecular; fenómeno que podría deberse a que el polisacárido con menor peso molecular tiene un menor grado de polimerización y una menor viscosidad con lo cual la capacidad de interacción con la glucosa es débil. Qi *et al.*¹⁶⁵ hidrolizaron la fibra dietaria insoluble del salvado de arroz con KOH y H₂SO₄, los autores concluyeron que la pérdida de estructura de red del polisacárido incrementa el área superficial y la porosidad facilitándose el anidamiento de glucosa. Por otra parte, Pantophlet *et al.*¹⁶⁷ sugieren que el AXF incrementa la viscosidad del bolo alimenticio, lo cual interfiere en la absorción de glucosa en el intestino delgado.

El ensayo de inhibición de difusión de glucosa es útil para predecir el efecto que presenta un polisacárido para poder retrasar la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal⁹³. Se evidenció que el incremento en la difusión de glucosa a través de la membrana de diálisis con un corte de peso molecular 3,5 kDa fue rápida hasta los 60 min luego del cual la difusión fue más lenta hasta completar los 180 min, esto concuerda con lo evidenciado para el AXF extraído de triticale (difusión por una membrana de 7 kDa MWCO)¹⁶⁸ y para el polisacárido de extraído a partir de *Tuber aestivum* (difusión por una membrana de 12 kDa MWCO)¹⁶⁹. Asimismo, la inhibición de la difusión a través del tubo de diálisis fue mayor para la muestra de AXF del BCJ a una concentración de 25 mg/mL, la

cual correspondió a la muestra de mayor concentración y por ende a la de mayor viscosidad. Estos resultados pueden deberse a que a mayor viscosidad se desarrolla una red del polisacárido que forma una barrera sobre el tubo de diálisis lo cual reduce y/o evita la difusión de la glucosa. La capacidad de inhibir la difusión de glucosa por parte de los polisacáridos puede deberse a factores como grado de viscosidad, capacidad de adsorción, formación de obstáculos físicos y a la capacidad de entrapar glucosa dentro de una red¹⁷⁰. En el estudio de Zheng *et al.*¹⁷¹ se hidrolizó enzimáticamente a la fibra dietaria extraída del salvado de *Setaria itálica*, los autores indican que luego del tratamiento enzimático ocurre una exposición de grupos funcionales que tienen una elevada afinidad por la glucosa entre los que destacan los ácidos fenólicos y se incluyen al ácido úrico y aldehídos. El ensayo desarrollado en tubos de diálisis nos puede ayudar a determinar el potencial del AXF para retardar la difusión de glucosa a través de las membranas biológicas; sin embargo, en el tracto gastrointestinal de los seres humanos el tránsito de la glucosa está asociado a la presencia de proteínas transportadoras y las contracciones intestinales¹⁷². Por lo tanto, es necesario desarrollar estudios *in vivo* para determinar el efecto real del AXF extraído del BCJ sobre la difusión de glucosa.

La enzima α -amilasa cataliza la hidrólisis del enlace (α -1,4)-glicosídico interno del almidón en productos de bajo peso molecular; tales como glucosa, maltosa, maltotriosa y dextrinas (oligosacáridos derivados de la fragmentación de amilopectina que contiene puntos de ramificación α -1,6). La inhibición de la actividad enzimática de esta enzima puede contribuir en retrasar el incremento de los niveles de glucosa postprandial en sangre al disminuir la liberación de glucosa y retrasar su absorción¹⁷³. La capacidad del AXF del BCJ de inhibir la α -amilasa fue determinada, y el resultado del presente estudio ($IC_{50} = 4,73 \pm 0,05$ mg/mL) estuvo en concordancia con lo encontrado por Malunga *et al.*¹⁷⁴ para el AX soluble en agua ($IC_{50} = 5$ mg/mL) del salvado de trigo, en el cual se menciona que el AX disminuye la amilólisis del almidón en función de la concentración y fuente de polisacárido. Chen *et al.*⁽¹⁷⁵⁾ reportaron que la capacidad de inhibición de la α -amilasa del polisacárido extraído del estigma de maíz fue mayor luego semisintetizar un derivado carboximetilado ($IC_{50} = 5,33$ mg/mL) en comparación con el valor IC_{50} (10,07 mg/mL) del polisacárido nativo,

sugiriéndose que los grupos carboximetilo están correlacionados con la inhibición de la enzima. Los polisacáridos pueden limitar la tasa de digestión del almidón por parte de la enzima α -amilasa de dos maneras¹⁷⁶. En primer lugar; los polisacáridos pueden formar una barrera que disminuye o previene la interacción de la enzima digestiva con el almidón. Zhang *et al.*¹⁷⁷ señala que el incremento de la viscosidad del polisacárido disminuye la movilidad acuosa del almidón a digerir, lo cual reduce la oportunidad de contacto entre la enzima y su sustrato. En esa misma línea, Hu *et al.*¹⁷⁸ indican que los polisacáridos pueden adsorber al almidón por medio de interacciones intermoleculares de puentes de hidrógeno y de esta manera impedir la hidrólisis del almidón. En segundo lugar; la naturaleza química de los polisacáridos puede estar relacionado con la inhibición de la α -amilasa, se ha demostrado que una elevada presencia de grupos carboxílicos libres inhibe la hidrólisis enzimática del almidón. Gong *et al.*¹⁷⁹ mencionan que los componentes fenólicos de polisacáridos son potentes inhibidores de la α -amilasa y α -glucosidasa, se sugiere que la presencia de grupos hidroxilo y metoxi presentes en el anillo aromático determinan la inhibición. Las interacciones de puentes de hidrógeno, hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals predominan en la complejación del compuesto fenólico con la enzima. El presente estudio empleó diferentes concentraciones del AXF de BCJ con un peso molecular mayor igual a 35 kDa; sin embargo, no se determinó su correlación con la capacidad inhibitoria de la enzima α -amilasa. En el estudio previo llevado a cabo por Lv *et al.*¹⁸⁰ se evidenció que los polisacáridos de bajo peso molecular poseen una mayor capacidad de inhibición respecto a los de alto peso molecular, ello luego de evaluar la capacidad de inhibición de la α -amilasa de dos fracciones de AX extraídos del salvado de trigo, una obtenida por extracción acuosa de 193 kDa ($IC_{50} = 1,92$ mg/mL) de peso molecular y otro obtenida por extracción con álcali de 107 kDa ($IC_{50} = 0,40$ mg/mL). En contraposición, Chen *et al.*¹⁶⁶ concluyen que a mayor peso molecular del AX extraído del salvado de triticale (cruce entre trigo y centeno) se evidencia mayor inhibición de la enzima α -amilasa y α -glucosidasa. También se determinó la cinética de inhibición del AX luego de graficar el diagrama de Lineweaver-Burk con diferentes de concentraciones del polisacárido (0 – 0,8 mg/mL); evidenciándose que no hubo cambio en la velocidad máxima (V_{max}), pero si hubo un incremento de la constante de Michaelis-Menten (K_m), los resultados

indicaron que el AX presenta una inhibición de tipo competitiva. Además, el AXF extraído por el método de extracción alcalino presenta mayor tasa de inhibición de la enzima α -amilasa comparada con la extracción enzimática, debido a que el primer método genera mayor cantidad de ácido ferúlico libre¹⁶⁸. Cabe destacar que es necesario desarrollar estudios *in vivo* para evaluar la capacidad antihiperlipémica del AXF.

VII. CONCLUSIONES

- En el presente estudio, se logró la extracción del AXF a partir del BCJ por el método de peróxido de hidrogeno alcalino, el polisacárido dializado con peso molecular $\geq 3,5$ kDa tuvo un rendimiento de extracción de $19,87 \pm 4,56$ %.
- El análisis fisicoquímico permitió corroborar las características fisicoquímicas del AXF obtenido, mientras que el análisis espectrofotométrico confirmó la presencia de la estructura típica del polisacárido.
- El AXF del BCJ exhibió una promisoriosa capacidad antioxidante *in vitro* en los ensayos de DPPH \cdot (IC₅₀ 6,59 mg/mL, TEAC 7,7844 μ mol/g muestra), ABTS $^{+\cdot}$ (IC₅₀ 6,50 mg/mL y TEAC 35,34 μ mol/g muestra) y FRAP (valor FRAP 14,08 μ mol AA/g y 36,63 μ mol FeSO₄/g); siendo dependiente de la concentración.
- Los ensayos realizados para la determinación de la capacidad antihiperlipémica *in vitro* demostraron que el AXF del BCJ posee una capacidad de adsorción dependiente de la concentración de glucosa presente en el medio con el que interactúa. Asimismo, se evidenció que inhibió la difusión de glucosa de forma directamente proporcional a la concentración del polisacárido y presentó un valor de IC₅₀ de 4,73 mg/mL en el ensayo de inhibición de la α -amilasa. Los resultados sugieren que el AXF del BCJ podría ser usado como un agente antihiperlipémico.

VIII. RECOMENDACIONES

- Optimizar el proceso de extracción mediante la manipulación de las variables involucradas en el proceso de extracción.
- Desarrollar una comparación de la capacidad antioxidante y antihiperlipidémica del AXF extraído del grano de maíz antes de la germinación y luego de la germinación.
- Evaluar la capacidad antioxidante y antihiperlipidémica del AXF extraído del BCJ en modelos de animales de experimentación in vivo.
- Realizar la modificación química del AXF extraído para mejorar sus características fisicoquímicas y propiedades antioxidantes y antihiperlipidémicas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Skendi A, Zinoviadou KG, Papageorgiou M, Rocha JM. Advances on the Valorisation and Functionalization of By-Products and Wastes from Cereal-Based Processing Industry. *Foods*. 2020;9(1243):1–28.
2. Ciudad-Mulero M. Arabinoxilanos y su importancia en la salud. *Rev Complut Ciencias Vet*. 2017;11(1):84–9.
3. Bautil A, Verspreet J, Buyse J, Goos P, Bedford MR, Courtin CM. Arabinoxylan-oligosaccharides kick-start arabinoxylan digestion in the aging broiler. *Poult Sci*. 2020;99(5):2555–65.
4. Yilmaz-Turan S, Jiménez-Quero A, Menzel C, Morais de Carvalho D, Lindström ME, Sevastyanova O, et al. Bio-based films from wheat bran feruloylated arabinoxylan: Effect of extraction technique, acetylation and feruloylation. *Carbohydr Polym*. 2020;250(12) 116916-27.
5. Collins HM, Burton RA, Topping DL, Liao ML, Bacic A, Fincher GB. Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: Potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chem*. 2010;87(4):272–82.
6. Fadel A, Mahmoud AM, Ashworth JJ, Li W, Ng YL, Plunkett A. Health-related effects and improving extractability of cereal arabinoxylans. *Int J Biol Macromol*. 2018;109:819–31.

7. Bastos R, Coelho E, Coimbra MA. Arabinoxylans from cereal by-products: Insights into structural features, recovery, and applications. In: Galanakis C, editor. *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products*. Oxford: Elsevier; 2018. p. 227–51.
8. Zhurlova O, Kaprelyants L. The Current trends and future perspectives of Arabinoxylans Prebiotics Research: A Review. *Зернові Продукти І Комбікорми*. 2017;17(4):4–11.
9. Mathew S, Karlsson EN, Adlercreutz P. Extraction of soluble arabinoxylan from enzymatically pretreated wheat bran and production of short xylo-oligosaccharides and arabinoxyloligosaccharides from arabinoxylan by glycoside hydrolase family 10 and 11 endoxylanases. *J Biotechnol*. 2017;260(3):53–61.
10. Rudjito RC, Ruthes AC, Jiménez-Quero A, Vilaplana F. Feruloylated arabinoxylans from wheat bran: Optimization of extraction process and validation at pilot scale. *ACS Sustain Chem Eng*. 2019;7(15):13167–77.
11. Wang J, Bai J, Fan M, Li T, Li Y, Qian H, et al. Cereal-derived arabinoxylans: Structural features and structure–activity correlations. *Trends Food Sci Technol*. 2020;96(5):157–65.
12. Buanafina MM. Feruloylation in grasses: Current and future perspectives. *Mol Plant*. 2009;2(5):861–72.
13. Urías-Orona V, Basilio Heredia J, Muy-Rangel D, Niño-Medina G. Phenolic acids with antioxidant activity in maize bran and wheat bran. *Ecosistemas y Recur Agropecu*. 2016;3(7):43–50.
14. Morales-Ortega A, Niño-Medina G, Carvajal-Millán E, Gardea-Béjar A, Torres-Chávez P, López-Franco Y, et al. Ferulated arabinoxylans from cereals. A review of their physico-chemical characteristics and gelling capability. *Rev Fitotec Mex*. 2013;36(4):439–46.
15. Chateigner-Boutin AL, Ordaz-Ortiz JJ, Alvarado C, Bouchet B, Durand S, Verherbruggen Y, et al. Developing pericarp of maize: A model to study arabinoxylan synthesis and feruloylation. *Front Plant Sci*. 2016;7(1476):1–20.
16. Rautengarten C, Birdseye D, Pattathil S, McFarlane HE, Saez-Aguayo S, Orellana A, et al. The elaborate route for UDP-Arabinose delivery into the Golgi of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(16):4261–6.

17. Zhao C, Zayed O, Zeng F, Liu C, Zhang L, Zhu P, et al. Arabinose biosynthesis is critical for salt stress tolerance in Arabidopsis. *New Phytol.* 2019;224(1):274–90.
18. Saulnier L, Guillon F, Sado P-E, Chateigner-Boutin A-L, Rouau X. Plant Cell Wall Polysaccharides in Storage Organs: Xylans (Food Applications). In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Nantes: Elsevier Inc.; 2013.p 1–32.
19. Niño-Medina G, Carvajal-Millán E, Rascon-Chu A, Marquez-Escalante JA, Guerrero V, Salas-Muñoz E. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: Structure, sources and applications. *Phytochem Rev.* 2010;9(1):111–20.
20. Li C, Wang L, Chen Z, Li Y, Li J. Facile and green preparation of diverse arabinoxylan hydrogels from wheat bran by combining subcritical water and enzymatic crosslinking. *Carbohydr Polym.* 2020;241(116317):1–10.
21. Hatfield RD, Rancour DM, Marita JM. Grass cell walls: A story of cross-linking. *Front Plant Sci.* 2017;7(2056):1–15.
22. Izydorczyk MS, Biliaderis CG. Arabinoxylans: Technologically and Nutritionally Functional Plant Polysaccharides. In: Mazza G, editor. *Functional Food Carbohydrates*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 250–83.
23. Ayala-Soto FE, Serna-Saldívar SO, García-Lara S, Pérez-Carrillo E. Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food Hydrocoll.* 2014;35(1):471–5.
24. Fincher GB. Cereals: Chemistry and Physicochemistry of Non-starchy Polysaccharides. In: Wrigley C, Corke H, Seetharaman K, Faubion J, editors. *Encyclopedia of Food Grains*. 2nd ed. Adelaide: Elsevier Ltd.; 2016. p. 208–23.
25. Buanafina MM de O, Iyer PR, Buanafina MF, Shearer EA. Reducing cell wall feruloylation by expression of a fungal ferulic acid esterase in *Festuca arundinacea* modifies plant growth, leaf morphology and the turnover of cell wall arabinoxylans. *PLoS One.* 2017;12(9):1–26.
26. Amin BAZ, Chabbert B, Moorhead D, Bertrand I. Impact of fine litter chemistry on lignocellulolytic enzyme efficiency during decomposition of

- maize leaf and root in soil. *Biogeochemistry*. 2014;117(1):169–83.
27. Schmidt M, Wiege B, Hollmann J. Comparison of Alkaline / Oxidative and Hydrothermal Extraction of Wheat Bran Arabinoxylans. *Foods*. 2021;10(826):1–16.
 28. Farhat W. Investigation of Hemicellulose Biomaterial Approaches : The Extraction and Modification of Hemicellulose and its Use in Value- added Applications. 2018.
 29. Kundu P, Kumar S, Ahluwalia V, Kansal SK, Elumalai S. Extraction of arabinoxylan from corncob through modified alkaline method to improve xylooligosaccharides synthesis. *Bioresour Technol Reports*. 2018;3(1):51–8.
 30. Peng Z, Jin Y. Purification, identification, and characterization of an endo-1,4- β -xylanase from wheat malt. *Molecules*. 2020;25(1572):1–16.
 31. Dordević T, Milošević M, Antov M. Advance diversity of enzymatically modified arabinoxylan from wheat chaff. *Food Chem*. 2021;339(128093):1–8.
 32. Mendez-Encinas MA, Carvajal-Millan E, Rascon-Chu A, Astiazaran-Garcia HF, Valencia-Rivera DE. Ferulated Arabinoxylans and Their Gels: Functional Properties and Potential Application as Antioxidant and Anticancer Agent. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018(1):1–22.
 33. Senf D. Synthesis of Arabinoxylan Oligo-and Polysaccharides from the Plant Cell Wall. [Thesis for Doctor in Natural Sciences degree]. Postdam: Universidad Libre de Berlin; 2018.
 34. Juvonen M, Kotiranta M, Jokela J, Tuomainen P, Tenkanen M. Identification and structural analysis of cereal arabinoxylan-derived oligosaccharides by negative ionization HILIC-MS/MS. *Food Chem*. 2019;275(9):176–85.
 35. Khaleghipour L, Linares-Pastén JA, Rashedi H, Ranaei Siadat SO, Jasilionis A, Al-Hamimi S, et al. Extraction of sugarcane bagasse arabinoxylan, integrated with enzymatic production of xylooligosaccharides and separation of cellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2021;14(153):1–19.
 36. Schendel RR, Meyer MR, Bunzel M. Quantitative profiling of feruloylated arabinoxylan side-chains from graminaceous cell walls. *Front Plant Sci*.

- 2016;6(1249):1–11.
37. Castilla F, Burbano CA, Salazar DA. La chicha, producto gastronómico y ritual: caso chorro de Quevedo (Colombia) y Otavalo (Ecuador). *Rev Tur y Soc.* 2020;26(1):205–24.
 38. Jennings J. La Chichera y El Patrón: Chicha and the Energetics of Feasting in the Prehistoric Andes. *Archeol Pap Am Anthropol Assoc.* 2008;14(1):241–59.
 39. Mika A, Buck F, Lüthje S. Membrane-bound class III peroxidases: Identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. *J Proteomics.* 2008;71(4):412–24.
 40. De Souza IRP, MacAdam JW. Gibberellic acid and dwarfism effects on the growth dynamics of B73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades: A transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes cessation of cell elongation. *J Exp Bot.* 2001;52(361):1673–82.
 41. Farzaneh V, Ghodsvali A, Bakhshabadi H, Zare Z, Carvalho IS. The impact of germination time on the some selected parameters through malting process. *Int J Biol Macromol.* 2017;94(1):663–8.
 42. Belfield S, Brown C. A guide to upland cropping in Cambodia: maize. 2009.
 43. Parker BJ, McCool W. Indices of household maize beer production in the Andes: An ethnoarchaeological investigation. *J Anthropol Res.* 2015;71(3):359–400.
 44. Bassi D, Orrù L, Vasquez JC, Cocconcelli PS, Fontana C. Peruvian chicha: A focus on the microbial populations of this ancient Maize-based fermented beverage. *Microorganisms.* 2020;8(1):1–13.
 45. Piló FB, Carvajal-Barriga EJ, Guamán-Burneo MC, Portero-Barahona P, Dias AMM, Freitas LFD de, et al. *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers (chicha) of Ecuador. *Brazilian J Microbiol.* 2018;49(4):808–15.
 46. Coronado H. M, Vega Y León S, Gutiérrez T. R, Marcela VF, Radilla V. C. Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr.* 2015;42(2):206–12.
 47. Mariaca CJ, Zapata M, Uribe P. Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev la Asoc Colomb Dermatología y Cirugía Dermatológica.*

- 2016;24(3):162–73.
48. Sánchez-valle V, Méndez-sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad periodontal. *Rev la Asoc Dent Mex.* 2013;70(6):298–301.
 49. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11–26.
 50. Santos-Sánchez N, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants.* 2019;1(1):1–28.
 51. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med.* 2018;54(4):287–93.
 52. Reyes FA, Pérez ML, Figueredo EA, Estupiñan MR, Rizo YJ. Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *CCM.* 2016; 20(1): 98 - 121
 53. American Association of Diabetes. Standards of medical care in diabetes 2021 - Supplement 1. Vol. 44, *Diabetes Care.* 2021. p. 1–232.
 54. Skyler JS. Diabetes mellitus: Pathogenesis and treatment strategies. *J Med Chem.* 2004;47(17):4113–7.
 55. Salaverría de Sanz N, Palmucci G, Suniaga de Daza M, Velásquez E. Tratamiento con antihiperglucemiantes orales: clasificación, propiedades, combinaciones, indicaciones, contraindicaciones y eventos adversos. *Rev Venez Endocrinol y Metab.* 2012;10(1):58–64.
 56. Ara S, Hurtado A, Barnett E, Celi L, Ramos M. Optimization of parameters in the process of elaboration of chicha de jora. *Campus USMP.* 2017;23(25):11–28.
 57. Yoshida T, Sakamoto M, Azuma J. Extraction of Hemicelluloses from Corn Pericarp by the NaOH-Urea Solvent System. *Procedia Chem.* 2012;4(1):294–300.
 58. Ganguli NK, Turner MA. A simplified method for extracting water-extractable arabinoxylans from wheat flour. *J Sci of Food Agric.* 2008;88(1):1905–10.
 59. Du C, Campbell GM, Misailidis N, Mateos-Salvador F, Sadhukhan J, Mustafa M, et al. Evaluating the feasibility of commercial arabinoxylan

- production in the context of a wheat biorefinery principally producing ethanol. Part 1. Experimental studies of arabinoxylan extraction from wheat bran. *Chem Eng Res Des*. 2009;87(9):1232–8.
60. Zhou S, Liu X, Guo Y, Wang Q, Peng D, Cao L. Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. *Carbohydr Polym*. 2010;81(4):784–9.
 61. Si X, Zhou Z, Bu D, Li J, Strappe P, Blanchard C. Efecto de la sulfatación en las propiedades antioxidantes y las características proliferativas celulares *in vitro* de polisacáridos aislados de salvado de maíz. *CYTA - J Food*. 2016;14(4):555–64.
 62. Kamboj S, Rana V. Physicochemical, rheological and antioxidant potential of corn fiber gum. *Food Hydrocoll*. 2014;39(1):1–9.
 63. Bernhardt DC, Ponce NMA, Basanta MF, Stortz CA, Rojas AM. Husks of *Zea mays* as a potential source of biopolymers for food additives and materials' development. *Heliyon*. 2019;5(3):1–28.
 64. Herrera D. Evaluación funcional y antioxidante de arabinoxilanos ferulados extraídos de pericarpio de maíz (*zea mays* L.) obtenidos bajo diferentes condiciones de extracción alcalina. [Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos]. Ciudad de Nueva León: Universidad Autónoma de Nueva León; 2019.
 65. Li J, Shang W, Si X, Bu D, Strappe P, Zhou Z, et al. Carboxymethylation of corn bran polysaccharide and its bioactive property. *Int J Food Sci Technol*. 2017;52(5):1176–84.
 66. Huang J, Wang X, Tao G, Song Y, Ho C, Zheng J, et al. Feruloylated oligosaccharides from maize bran alleviate the symptoms of diabetes in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Food Funct*. 2018;9(3):1779–89.
 67. Malunga LN, Eck P, Beta T. Inhibition of Intestinal α -Glucosidase and Glucose Absorption by Feruloylated Arabinoxylan Mono- and Oligosaccharides from Corn Bran and Wheat Aleurone. *J Nutr Metab*. 2016;1(1):1–9.
 68. Nie Q, Xing M, Chen H, Hu J, Nie S. Metabolomics and Lipidomics Profiling Reveals Hypcholesterolemic and Hypolipidemic Effects of Arabinoxylan on Type 2 Diabetic Rats. *J Agric Food Chem*. 2019;67(38):10614–23.

69. Martinelli E, Granato D, Azevedo L, Gonçalves JE, Lorenzo JM, Munekata PES, et al. Current perspectives in cell-based approaches towards the definition of the antioxidant activity in food. *Trends Food Sci Technol.* 2021;116(July):232–43.
70. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651–715.
71. Haveles EB. Drugs for the treatment of diabetes mellitus. En: Haveles EB, editor. *Applied pharmacology for the dental hygienist.* 8th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences; 2019. p. 688–714.
72. Schupfer E, Pak SC, Wang S, Micalos PS, Jeffries T, Ooi SL, et al. The effects and benefits of arabinoxylans on human gut microbiota – A narrative review. *Food Biosci.* 2021;43(101267):1–8.
73. Page C, Hoffman B, Curtis M, Walker M. Principles of Pharmacology. In: *Integrated Pharmacology.* Third. Mosby Ltd.; 2006. p. 2–14.
74. Szablewski L. Glucose Homeostasis. En: Zhang W, editor. *Gluconeogenesis.* 1st ed: InTech; 2017. p. 5–20.
75. Paredes-Flores MA. Biochemistry, Glycogenolysis. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). 2021. p. 1–7.
76. Liu Y, Qiu S, Li J, Chen H, Tatsumi E, Yadav M, et al. Peroxidase-mediated conjugation of corn fiber gum and bovine serum albumin to improve emulsifying properties. *Carbohydr Polym.* 2015;118(1):70–8.
77. Zhang Z, Smith C, Li W, Ashworth J. Characterization of Nitric Oxide Modulatory Activities of Alkaline-Extracted and Enzymatic-Modified Arabinoxylans from Corn Bran in Cultured Human Monocytes. *J Agric Food Chem.* 2016;64(43):8128–37.
78. European Pharmacopoeia. *European Pharmacopoeia 10.4.* Francia: Concilio Europeo. 2021
79. Kong L, Yu L, Feng T, Yin X, Liu T, Dong L. Physicochemical characterization of the polysaccharide from *Bletilla striata*: Effect of drying method. *Carbohydr Polym.* 2015;125(1):1–8.
80. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of AOAC International.* 17th ed. Gaithersburg: AOAC International; 2000.
81. Suvakanta D, Narsimha MP, Pulak D, Joshabir C, Biswajit D. Optimization

- and characterization of purified polysaccharide from *Musa sapientum* L. as a pharmaceutical excipient. *Food Chem.* 2014;149(1):76–83.
82. United States Pharmacopeia (USP). *United States Pharmacopeia 42, NF 36*. Rockville: US Pharmacopeial Convention. 2018
 83. Ijaz H, Tulain UR, Azam F, Qureshi J. Thiolation of arabinoxylan and its application in the fabrication of pH-sensitive thiolated arabinoxylan grafted acrylic acid copolymer. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019;45(5):754–66.
 84. Kaleem MA, Alam MZ, Khan M, Jaffery SH, Rashid B. An experimental investigation on accuracy of Hausner Ratio and Carr Index of powders in additive manufacturing processes. *Met Powder Rep.* 2020;30(20):1–5.
 85. Van-Craeyveld V. Production and functional characterisation of arabinoxylan-oligosaccharides from wheat (*Triticum aestivum* L.) bran and psyllium (*Plantago ovata* Forsk) seed husk. [Thesis for Doctor of Engineering in Biosciences degree]. Leuven: University KU Leuven; 2009.
 86. Buksa K, Praznik W, Loeppert R, Nowotna A. Characterization of water and alkali extractable arabinoxylan from wheat and rye under standardized conditions. *J Food Sci Technol.* 2016;53(3):1389–98.
 87. Eugene A, Lapierre C, Ralph J. Improved analysis of arabinoxylan-bound hydroxycinnamate conjugates in grass cell walls. *Biotechnol Biofuels.* 2020;13(1):1–7.
 88. Tang Y, Chen J, Li F, Yang Y, Wu S, Ming J. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Modified Polysaccharides Originally Isolated from *Morchella Angusticeps* Peck. *J Food Sci.* 2019;84(3):448–56.
 89. Marquez-Escalante JA, Carvajal-Millan E. Feruloylated arabinoxylans from Maize Distiller's dried grains with solubles: Effect of feruloyl esterase on their macromolecular characteristics, gelling, and antioxidant properties. *Sustainability.* 2019;11(22):1–12.
 90. Malunga LN, Beta T. Antioxidant capacity of water-extractable arabinoxylan from commercial barley, wheat, and wheat fractions. *Cereal Chem.* 2015;92(1):29–36.
 91. Xu W, Zhang F, Luo YB, Ma L, Kou X, Huang K. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydr Res.* 2009;344(2):217–22.
 92. Dong J, Wang L, Jing L, Zhu Y, Shen R. Structural, antioxidant and

- adsorption properties of dietary fiber from foxtail millet (*Setaria italica*) bran. *J Sci Food Agric*. 2019;99(8):3886–94.
93. Maktoof SA, Alrubayae IMN, Almansorii NA. Evaluation of *in vitro* antidiabetic effect and phytochemical screening of some wild mushroom extracts isolated in Basrah, Iraq. *Drug Invent Today*. 2019;11(11):2797–803.
 94. Inocente-Camones MA, Jurado-Teixeira B, Ramos-Llica E, Alvarado-Chávez B, Fuertes-Ruiton C, Cárdenas-Montoya L, et al. Actividad hipoglucemiante *in vitro* de los polisacáridos digeridos de *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault (cushuro). *Horiz Médico*. 2019;19(1):26–31.
 95. Yadav MP, Johnston DB, Hotchkiss AT, Hicks KB. Corn fiber gum: A potential gum arabic replacer for beverage flavor emulsification. *Food Hydrocoll*. 2007;21(7):1022–30.
 96. Broxterman SE. The architecture of the primary plant cell wall: the role of the pectin reconsidered. [Thesis for Doctor degree]. Wageningen: Wageningen University; 2018.
 97. Maes C, Delcour JA. Alkaline hydrogen peroxide extraction of wheat bran non-starch polysaccharides. *J Cereal Sci*. 2001;34(1):29–35.
 98. Zhang Z, Smith C, Li W. Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: A critical review. *Food Res Int*. 2014;65(11):423–36.
 99. Xinyi E. Hemicellulose fiber gum from distillers grain: isolation, structure and properties. [Thesis for Master Science degree] Kansas: Kansas State University; 2010.
 100. Höjje A, Gröndahl M, Tømmeraas K, Gatenholm P. Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks. *Carbohydr Polym*. 2005;61(3):266–75.
 101. Naz S, Ahmad N, Akhtar J, Ahmad NM, Ali A, Zia M. Management of citrus waste by switching in the production of nanocellulose. *IET Nanobiotechnology*. 2016;10(6):395–9.
 102. Lindman B, Karlström G, Stigsson L. On the mechanism of dissolution of cellulose. *J Mol Liq*. 2010;156(1):76–81.
 103. Leong F, Hua X, Wang M, Chen T, Song Y, Tu P, et al. Quality standard

- of traditional Chinese medicines: Comparison between European Pharmacopoeia and Chinese Pharmacopoeia and recent advances. *Chinese Med (United Kingdom)* . 2020;15(1):1–20.
104. Bell RM. Extraction of Arabinoxylan from Animal Feed and Investigations into its Functionality as an Ingredient in Bread Dough . [Thesis for Doctor of Philosophy degree]. Manchester: University of Manchester; 2015.
 105. Ji MG, Lee YR, Nam YH, Castañeda R, Hong BN, Kang TH. Immunostimulatory Action of High-Content Active Arabinoxylan in Rice Bran. *ACS Omega* 2020. 2020;5(1):26374–81.
 106. Bagchi S, Kumar KJ. Studies on water soluble polysaccharides from *Pithecellobium dulce* (Roxb .) Benth . seeds. *Carbohydr Polym*. 2016;138(1):215–21.
 107. Yang L, Cao J, Jin Y, Chang H, Jameel H, Phillips R, et al. Effects of sodium carbonate pretreatment on the chemical compositions and enzymatic saccharification of rice straw. *Bioresour Technol*. 2012;124(1):283–91.
 108. Jacquemin L, Zeitoun R, Sablayrolles C, Pontalier P-Y, Rigal L. Evaluation of the technical and environmental performances of extraction and purification processes of arabinoxylans from wheat straw and bran. *Process Biochem*. 2012;47(3):373–80.
 109. Mendez-Encinas MA, Carvajal-Millan E, Yadav MP, López-Franco YL, Rascon-Chu A, Lizardi-Mendoza J, et al. Partial removal of protein associated with arabinoxylans : Impact on the viscoelasticity , crosslinking content , and microstructure of the gels formed. *Appl Polym Sci*. 2018;47300(1):1–10.
 110. González-Estrada R, Carvajal-Millan E. Covalently Cross-Linked Arabinoxylans Films for *Debaryomyces hansenii* Entrapment. *Mol* 2015,. 2015;20(1):11373–86.
 111. Erum A, Bashir S, Saghir S. Modified and unmodified arabinoxy- lans from *Plantago ovata* husk : Novel excipients with antimicrobial potential. *J Pharmacol*. 2015;10(1):765–9.
 112. Pawar HA, Gavasane AJ, Choudhary PD. Extraction of polysaccharide from fruits of *Cordia dichotoma* G. Forst using acid precipitation method and its physicochemical characterization. *Biol Macromol*. 2018;9554(1):1–

- 21.
113. Chen Z, Li S, Fu Y, Li C, Chen D, Chen H. Arabinoxylan structural characteristics, interaction with gut microbiota and potential health functions. *J Funct Foods*. 2019;54(3):536–51.
 114. Figueroa-Pizano MD, Campa-Mada CA, Canett-Romero R, Paz-Samaniego R, Martínez-López AL, Carvajal-Millan E. Influence of arabinoxylan and crosslinked arabinoxylan consumption on blood serum lipids and glucose levels of Wistar rats. *AIMS Bioeng*. 2021;8(3):208–20.
 115. Li LY, Wang YX, Zhang T, Zhang JF, Pan M, Huang XJ, et al. Structural characteristics and rheological properties of alkali-extracted arabinoxylan from dehulled barley kernel. *Carbohydr Polym*. 2020;249(116813):1-10.
 116. Yan J, Jia X, Feng L, Yadav M, Li X, Yin L. Rheological and emulsifying properties of arabinoxylans from various cereal brans. *J Cereal Sci*. 2019;90(11)102844-80.
 117. Shah A, Masoodi FA, Gani A, Gani A, Ashraf Z ul, Noor N, et al. Arabinoxylans. In: Gani A, Ahmad Ashwar B, editors. *Food biopolymers: Structural, functional and nutraceutical properties*. Springer Nature Switzerland; 2021. p. 173–86.
 118. Marconi O, Tomasi I, Sileoni V, Bonciarelli U, Guiducci M, Maranghi S, et al. Effects of Growth Conditions and Cultivar on the Content and Physiochemical Properties of Arabinoxylan in Barley. *J Agric Food Chem*. 2020;68(4):1064–70.
 119. Lopez-Martinez LX, Oliart-Ros RM, Valerio-Alfaro G, Lee C, Parkin KL, Garcia HS. Antioxidant activity , phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Sci Technol*. 2009;42(6):1187–92.
 120. Ramadan BR, Sorour MA, Kelany MA. Changes in total phenolics and DPPH scavenging activity during domestic processing in some cereal grains. *Ann Food Sci Technol*. 2012;13(2):190–6.
 121. Rao RSP, Muralikrishna G. Water soluble feruloyl arabinoxylans from rice and ragi : Changes upon malting and their consequence on antioxidant activity. *Phytochemistry*. 2006;67(1):91–9.
 122. Kim K, Tsao R, Yang R, Cui SW. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions.

- Food Chem. 2006;95(1):466–73.
123. Li J, Du J. Molecular Characterization of Arabinoxylan from Wheat Beer, Beer Foam and Defoamed Beer. *Molecules*. 2019;24(1230):1–15.
 124. Saghir S, Saeed M, Ajaz M, Koschella A, Heinze T. Structure characterization and carboxymethylation of arabinoxylan isolated from Ispaghula (*Plantago ovata*) seed husk. *Carbohydr Polym*. 2008;74(1):309–17.
 125. Burnett PGG, Young LW, Olivia CM, Jadhav PD, Okinyo-Owiti DP, Reaney MJT. Novel flax orbitide derived from genetic deletion. *BMC Plant Biol*. 2018;18(1):1–11.
 126. Devi S, Lakhera AK, Kumar V. Structural analysis and antioxidant activity of an arabinoxylan from: *Malvastrum coromandelianum* L. (Garcke). *RSC Adv*. 2019;9(42):24267–79.
 127. Jung SY, Li Y, Wang Y, Chen Y, Zhao Y, Qin J. Complications in the assignment of 14 and 28 Da mass shift detected by mass spectrometry as in vivo methylation from endogenous proteins. *Anal Chem*. 2008;80(5):1721–9.
 128. Cocho de Juan JÁ. Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos. [Tesis para optar al grado de Doctor en Química]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
 129. Mócsai R, Figl R, Sützl L, Fluch S, Altmann F. A first view on the unsuspected intragenus diversity of N-glycans in *Chlorella* microalgae. *Plant J*. 2020;103(1):184–96.
 130. Nagar S, Hensel A, Mischnick P, Kumar V. A unique polysaccharide containing 3-O-methylarabinose and 3-O-methylgalactose from *Tinospora sinensis*. *Carbohydr Polym*. 2018;18(13432):326–35.
 131. MassBank Database [Internet]. MassBank High quality mass spectral database. 2006. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <http://www.massbank.jp/>
 132. Sárossy Z, Plackett D, Egsgaard H. Carbohydrate analysis of hemicelluloses by gas chromatography-mass spectrometry of acetylated methyl glycosides. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(7):1923–30.

133. Maina NH, Juvonen M, Domingues RM, Virkki L, Jokela J, Tenkanen M. Structural analysis of linear mixed-linkage glucooligosaccharides by tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2013;136(1):1496–507.
134. Sinosaki NBM, Tonin APP, Ribeiro MAS, Polisel CB, Roberto SB, da Silveira R, et al. Structural study of phenolic acids by triple quadrupole mass spectrometry with electrospray ionization in negative mode and H/D isotopic exchange. *J Braz Chem Soc.* 2020;31(2):402–8.
135. He M, Peng G, Xie F, Hong L, Cao Q. Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry with ROI Strategy for Non-targeted Analysis of the *In Vivo/In Vitro* Ingredients Coming from *Ligusticum chuanxiong hort.* *Chromatographia.* 2019;82(7):1069–77.
136. PubChem. [Internet]. Pubchem. National library of medicine. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
137. Guo R, Xu Z, Wu S, Li X, Li J, Hu H, et al. Molecular properties and structural characterization of an alkaline extractable arabinoxylan from hull-less barley bran. *Carbohydr Polym.* 2019;218(2):250–60.
138. Li Y, He T, Liang R, Luo Z, Zhu Y, Yang C. Preparation and properties of multifunctional sinapic acid corn bran arabinoxylan esters. *Int J Biol Macromol.* 2017;8130(1):1279–87.
139. Xie D, Gan T, Su C, Han Y, Liu Z, Cao Y. Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble lignin-carbohydrate complexes (LCCs) isolated from wheat straw. *Int J Biol Macromol.* 2020;161(1):315–24.
140. Mohamed MA, Jaafar J, Ismail AF, Othman MHD, Rahman MA. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In: Hilal N., Fauzi A., Matsuura T., Oatley-Radcliffe D., editors. *Membrane Characterization.* Johor: Elsevier B.V.; 2017. p 3–29.
141. Aslam-Khan MU, Haider A, Razak SIA, Abdul-Kadir MR, Haider S, Shah SA, et al. Arabinoxylan/graphene-oxide/nHAp-NPS/PVA bionano composite scaffolds for fractured bone healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 2021;15(4):322–35.
142. Mo Q, Dai L, Ma J, Zhao X, Zhu L. Preparation and physiological activities of carboxymethylated derivative purified from corn bran. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2017;207(1):1–7.
143. Flórez-Pardo LM, González-Córdoba A, López-Galán JE. Characterization

- of hemicelluloses from leaves and tops of the CC 8475, CC 8592, and V 7151 varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Rev DYNA*. 2019;86(210):98–107.
144. Velkova N, Doliska A, Zemljic LF, Vesel A, Saake B, Strnad S. Influence of Carboxymethylation on the Surface Physical–Chemical Properties of Glucuronoxylan and Arabinoxylan Films. *Polym Eng Sci*. 2015;55(12):2706–13.
 145. Yang H, Yan R, Chen H, Lee DH, Zheng C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*. 2007;86(12–13):1781–8.
 146. Aarabi A, Honarvar M, Mizani M, Faghihian H, Gerami A. Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Ital J Food Sci*. 2016;28(3):362–75.
 147. De Anda-Flores Y, Carvajal-Millan E, Lizardi-Mendoza J, Rascon-Chu A, Martínez-López AL, Marquez-Escalante J, et al. Covalently cross-linked nanoparticles based on ferulated arabinoxylans recovered from a distiller's dried grains byproduct. *Processes*. 2020;8(6):691.
 148. Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;40(2):92–100.
 149. Truong DH, Nhung NTA, Dao DQ. Iron ions chelation-based antioxidant potential vs. pro-oxidant risk of ferulic acid: A DFT study in aqueous phase. *Comput Theor Chem* . 2020;1185(9):112905-40.
 150. El-gizawy HA-E, Hussein MA. Isolation, Structure Elucidation of Ferulic and Coumaric acids from *Fortunella japonica* Swingle leaves and their Structure Antioxidant activity relationship. *Free Radicals Antioxidants*. 2016;7(1):23–30.
 151. Szeląg M, Urbaniak A, Bluysen HAR. A theoretical antioxidant pharmacophore for natural hydroxycinnamic acids. *Open Chem*. 2015;13(1):17–31.
 152. Jiang Y, Bai X, Lang S, Zhao Y, Liu C, Yu L. Optimization of ultrasonic-microwave assisted alkali extraction of arabinoxylan from the corn bran using response surface methodology. *Int J Biol Macromol*. 2019;128(1):452–8.
 153. Yuwang P, Sulaeva I, Hell J. Phenolic compounds and antioxidant

- properties of arabinoxylan hydrolyzates from defatted rice bran. *J Sci Food Agric.* 2018;98(1):140–6.
154. Wan P, Yang X, Cai B, Chen H, Sun H, Chen D, et al. Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Laminaria japonica* and their antioxidative and glycosidase inhibitory activities. *J Ocean Univ China.* 2015;14(4):651–62.
155. Hafsa MBEN, Ismail MBEN, Garrab M, Aly R, Gagnon J, Naghmouchi K. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*. *J Serbian Chem Soc.* 2017;82(5):509–22.
156. Salazar-López NJ, González-Aguilar G, Rouzaud-Sáñez O, Robles-Sánchez M. Technologies applied to sorghum (*Sorghum bicolor* L. moench): Changes in phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Sci Technol.* 2018;38(3):369–82.
157. Hromádková Z, Paulsen BS, Polovka M, Košťálová Z, Ebringerová A. Structural features of two heteroxylan polysaccharide fractions from wheat bran with anti-complementary and antioxidant activities. *Carbohydr Polym.* 2013;93(1):22–30.
158. Paz-Samaniego R, Méndez-Encinas M, Fierro-Islas JM, Marquez-Escalante J, Rascón-Chu A, Martínez-Lopez AL, et al. Ferulated arabinoxylans recovered from low-value maize by-products: Gelation and antioxidant capacity. In: Bryce Warren, editor. *Ferulic Acid: Antioxidant Properties, Uses and Potential Health Benefits.* New York: Nova Publisher; 2014. p. 151–164
159. Marquez-Escalante JA, Rascón-Chu A, Campa-Mada A, Martínez-Robinson KG, Carvajal-Millan E. Influence of carboxymethylation on the gelling capacity, rheological properties, and antioxidant activity of feruloylated arabinoxylans from different sources. *J Appl Polym Sci.* 2020;137(5):1–10.
160. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules.* 2007;12(7):1496–547.
161. Hu S, Yin J, Nie S, Wang J, Phillips GO, Xie M, et al. *In vitro* evaluation of

- the antioxidant activities of carbohydrates. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre*. 2016;7(2):19–27.
162. Pérez-Flores JG, Contreras-López E, Castañeda-Ovando A, Pérez-Moreno F, Aguilar-Arteaga K, Álvarez-Romero GA, et al. Physicochemical characterization of an arabinoxylan-rich fraction from brewers' spent grain and its application as a release matrix for caffeine. *Food Res Int*. 2019;116(7):1020–30.
 163. Yuwang P. Chemical and antioxidant properties of arabinoxylan hydrolysates from rice bran. [Thesis for Doctor of Philosophy degree]. Ratchasima: Suranaree University of Technology; 2013.
 164. Ansari P, Afroz N, Jalil S, Azad S Bin, Mustakim MG, Anwar S, et al. Anti-hyperglycemic activity of *Aegle marmelos* (L.) corr. is partly mediated by increased insulin secretion, α -amylase inhibition, and retardation of glucose absorption. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2017;30(1):37–47.
 165. Qi J, Li Y, Masamba KG, Shoemaker CF, Zhong F, Majeed H, et al. The effect of chemical treatment on the *In vitro* hypoglycemic properties of rice bran insoluble dietary fiber. *Food Hydrocoll*. 2016;52(1):699–706.
 166. Chen H, Liu Y, Yang T, Chen D, Xiao Y, Qin W, et al. Interactive effects of molecular weight and degree of substitution on biological activities of arabinoxylan and its hydrolysates from triticale bran. *Int J Biol Macromol*. 2021;166:1409–18.
 167. Pantophlet AJ, Wopereis S, Eelderink C, Vonk RJ, Stroeve JH, Bijlsma S, et al. Metabolic profiling reveals differences in plasma concentrations of arabinose and xylose after consumption of fiber-rich pasta and wheat bread with differential rates of systemic appearance of exogenous glucose in healthy men. *J Nutr*. 2017;147(2):152–60.
 168. Chen H, Chen Z, Fu Y, Liu J, Lin S, Zhang Q, et al. Structure, antioxidant, and hypoglycemic activities of arabinoxylans extracted by multiple methods from triticale. *Antioxidants*. 2019;8(12):584–99.
 169. Mudliyar DS, Wallenius JH, Bedade DK, Singhal RS, Madi N, Shamekh SS. Ultrasound assisted extraction of the polysaccharide from *Tuber aestivum* and its *in vitro* anti-hyperglycemic activity. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre*. 2019;20(8):100198–207.
 170. Zheng Y, Wang Q, Huang J, Fang D, Zhuang W, Luo X, et al.

- Hypoglycemic effect of dietary fibers from bamboo shoot shell: An *in vitro* and *in vivo* study. *Food Chem Toxicol.* 2019;127(3):120–6.
171. Zheng Y, Xu B, Shi P, Tian H, Li Y, Wang X, et al. The influences of acetylation, hydroxypropylation, enzymatic hydrolysis and crosslinking on improved adsorption capacities and *in vitro* hypoglycemic properties of millet bran dietary fibre. *Food Chem.* 2022;368(8):130883–94.
172. Gunathilaka TL, Samarakoon KW, Ranasinghe P, Peiris LCD. In-Vitro Antioxidant, Hypoglycemic Activity, and Identification of Bioactive Compounds in Phenol-Rich Extract from the Marine Red Algae *Gracilaria edulis* (Gmelin) Silva. *Molecules.* 2019;24(20):1–16.
173. Azzopardi E, Lloyd C, Teixeira SR, Conlan RS, Whitaker IS. Clinical applications of amylase: Novel perspectives. *Surg (United States).* 2016;160(1):26–37.
174. Malunga LN, Izydorczyk M, Beta T . Antiglycemic effect of water extractable arabinoxylan from wheat aleurone and bran. *J Nutr Metab.* 2017;1(3):1–6.
175. Chen S, Chen H, Tian J, Wang Y, Xing L, Wang J. Chemical modification, antioxidant and α -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. *Carbohydr Polym.* 2013;98(1):428–37.
176. Dhital S, Warren FJ, Butterworth PJ, Ellis PR, Gidley MJ. Mechanisms of starch digestion by α -amylase—Structural basis for kinetic properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(5):875–92.
177. Zhang H, Li Z, Tian Y, Song Z, Ai L. Interaction between barley β -glucan and corn starch and its effects on the *in vitro* digestion of starch. *Int J Biol Macromol .* 2019;141(1):240–6.
178. Hu J-L, Nie S-P, Li C, Xie M-Y. *In vitro* effects of a novel polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. on intestinal function. *Int J Biol Macromol.* 2013;54(1):264–9.
179. Gong L, Feng D, Wang T, Ren Y, Liu Y, Wang J. Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase: Potential linkage for whole cereal foods on prevention of hyperglycemia. *Food Sci Nutr.* 2020;8(12):6320–37.
180. Lv QQ, Cao JJ, Liu R, Chen HQ. Structural characterization, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from wheat bran. *Food Chem .* 2021;341(3):128218-62.

X. ANEXOS

ANEXO 1. Operacionalización de variables.

ANEXO 2. Carta de donación de muestra de BCJ

ANEXO 3 Caracterización fisicoquímica del AXF extraído

ANEXO 4. Determinación del contenido fenólico total

ANEXO 5. Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de DPPH

ANEXO 6. Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de ABTS

ANEXO 7. Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de FRAP

ANEXO 8. Determinación de la capacidad de adsorción de glucosa y de inhibición de la difusión de glucosa

ANEXO 9. Determinación de la capacidad de inhibición de α -amilasa

ANEXO 10. Autores del presente trabajo de investigación

ANEXO 1

Operacionalización de variables

VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	
El arabinoxilano ferulado extraído a partir del residuo de bagazo en el proceso de elaboración de la "chicha de jora"	Independiente	Es un heteropolisacárido con una cadena principal de D-xilosas con sustituciones de L-arabinosas, enlazadas lateralmente con ácido ferúlico el cual forma parte de la fibra de la cáscara del grano de maíz germinado del bagazo de chicha de jora ⁶ .	Es el polisacárido pulverizado y seco de coloración parda con peso molecular $\geq 3,5$ kDa	Rendimiento de extracción	% (p/p)	
				Contenido de humedad	% (p/p)	
				pH	pH	
				Cenizas totales	% (p/p)	
				Proteínas	% (p/p)	
				Viscosidad	dL/g	
				Contenido fenólico total	mg EAG/g ps	
				Contenido de monosacáridos	mg/ g de muestra	
				Cromatografía en capa fina	R _f , R _G	
				HPLC-MS/MS	m/z	
				Espectroscopia UV-vis	nm	
Bandas de absorción y emisión en infrarrojo	cm ⁻¹					
Capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	Dependiente	Es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica) mediante neutralización de los electrones desapareados de radicales libres ⁶² .	Capacidad reductora del DPPH [•] , ABTS ^{•+} y FRAP	Capacidad de eliminación de radicales libres de DPPH	IC ₅₀ , TEAC	
				Capacidad de eliminación de radicales libres de ABTS	IC ₅₀ , TEAC	
				Valor FRAP	TEAC	
Capacidad antihiperglicémica <i>in vitro</i>	Dependiente	Es la capacidad de evitar la sobrecarga de glucosa en sangre mediante mecanismos extra pancreáticos ⁶⁶ .	Cantidad de glucosa adsorbida por el polisacárido	Adsorción de glucosa	mmol/g	
				Concentración de glucosa en el dializado	Inhibición de la difusión de glucosa	μg/mL
				Porcentaje de enzima inhibida medida indirectamente por el espectrofotómetro	Inhibición de la actividad de la enzima α-amilasa	IC ₅₀

ANEXO 2
Carta de donación de muestra de BCJ



PARA QUIEN SEA DE INTERÉS

Nosotros Misky SAC con RUC 20526970340, con dirección en República de Bolivia, Cusco 08002, Santiago, Cusco-Perú mediante la presente suscribimos:

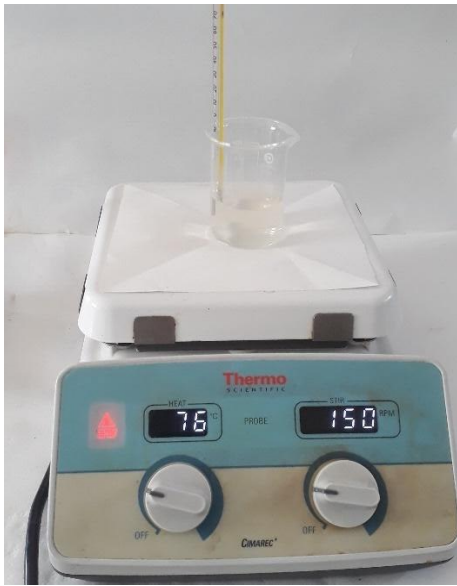
Que se realizó la donación de material sin fines de lucro a JUAN JHAROL SEGOVIA HUARCAYA con DNI N° 76674328 para efectos que estime. La materia proporcionada corresponde a desechos de bagazo del proceso de elaboración de chicha de jora. La chicha de jora elaborada en nuestras instalaciones es producida con fines de comercialización local y se emplea como materia prima a la jora de maíz amarillo.

Sin otro particular

Atte.

Paul Jhon Candia Hanco

ANEXO 3
Caracterización fisicoquímica del AXF extraído



Solubilidad a diferentes temperaturas



Angulo de reposo



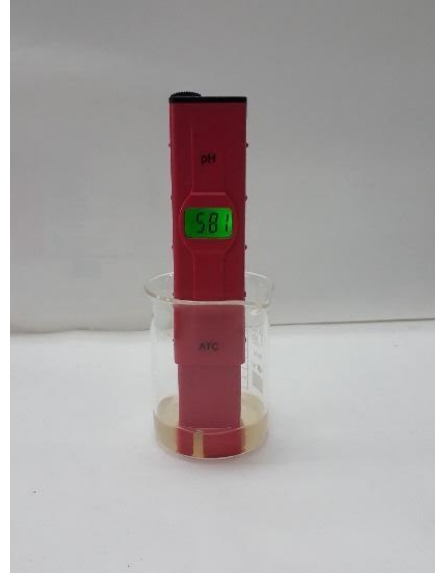
Densidad aparente



Densidad compactada



Filtración antes de la medición de pH



Medición de pH

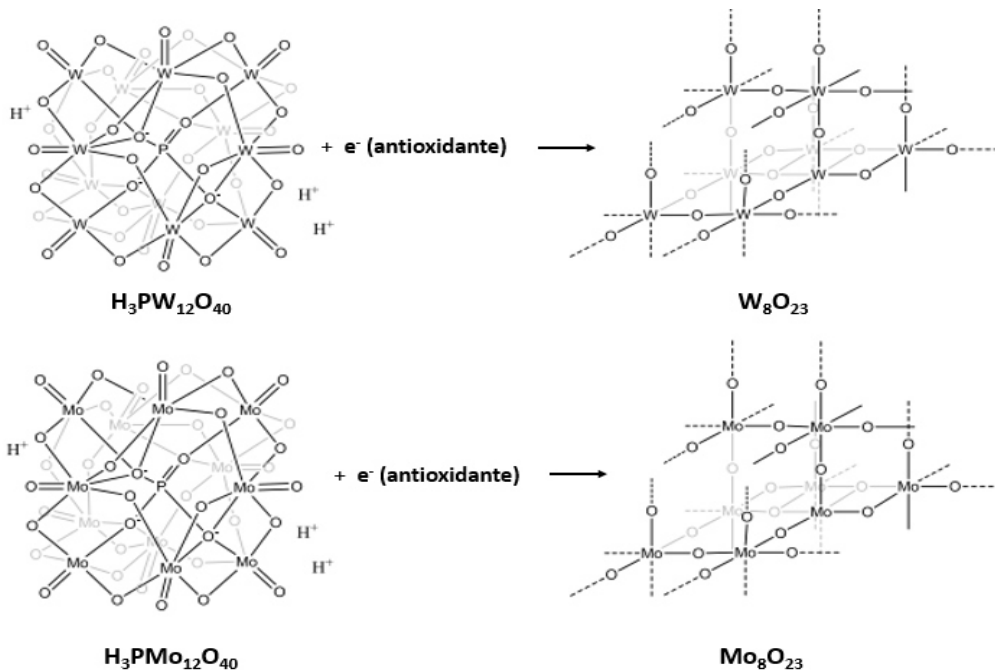


Determinación de la viscosidad a 30°C

ANEXO 4

Determinación del contenido fenólico total

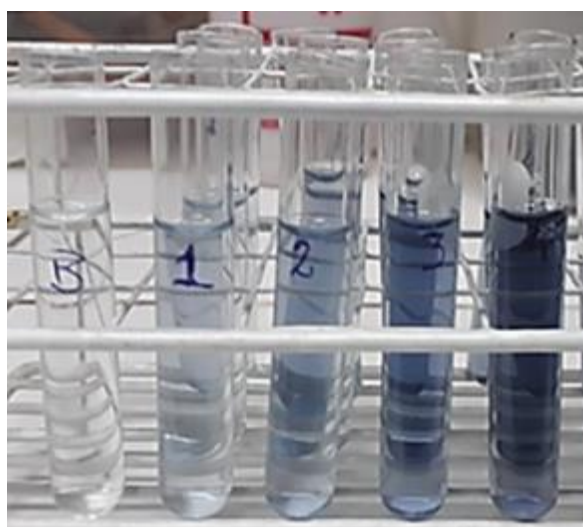
Fundamento: Las sustancias antioxidantes (agentes reductores) tienen la capacidad de donar electrones (reducir) de manera secuencial al reactivo de Folin Ciocalteu (mezcla de ácidos fosfowolfrámico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) en medio básico) para formar óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) los cuales dan picos máximos de absorción a 760 nm. En su forma oxidada el wolframio y molibdeno poseen una valencia de VI con coloración amarilla, y es luego de la interacción con un agente reductor que cambian su valencia a V con un color azul.



Reacción específica entre el reactivo de Folin Ciocalteu y un agente antioxidante, este último dona un electrón secuencialmente por ruptura homolítica y genera la reducción del RFC.



De izquierda a derecha se muestran las soluciones del RFC, Na₂CO₃ y ácido gálico



Tubos de reacción del estándar de ácido gálico*



Tubos de reacción de la muestra*

**Imágenes tomadas luego de realizar las lecturas en el espectrofotómetro UV*

Resultados de absorbancias para la elaboración de la curva de calibración en la determinación del contenido fenólico total

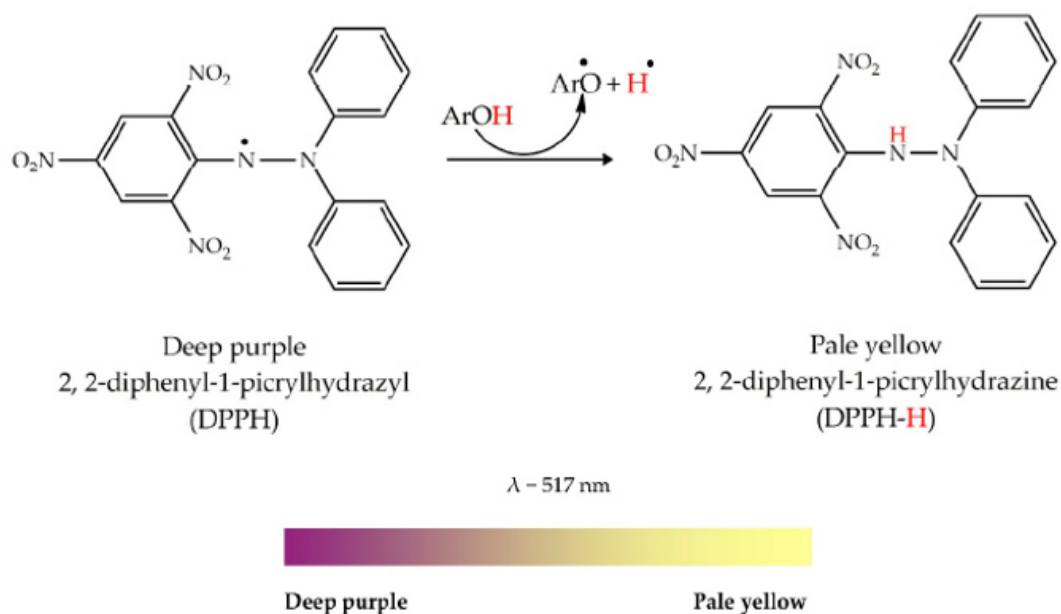
Concentración de ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia (Abs)
0,03125	0,078 ± 0,003
0,0625	0,134 ± 0,003
0,125	0,231 ± 0,008
0,25	0,396 ± 0,002

ANEXO 5

Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de DPPH

Fundamento: El electrón desapareado del radical DPPH[•] (conocido por su alta estabilidad) absorbe a 517 nm, dando una coloración purpura. Sin embargo, la neutralización del electrón desapareado del radical al aceptar un electrón o un átomo de hidrogeno de un agente reductor (antioxidante) se decolora gradualmente a un color amarillo.

DPPH[•] ••



Mecanismo de reacción general de reducción por transferencia de hidrogeno al radical DPPH[•]. Fuente: Sadier et al., *Antioxidants*, (2020), 9, 709



Soluciones del AXF en la cual se muestra una concentración creciente de izquierda a derecha*



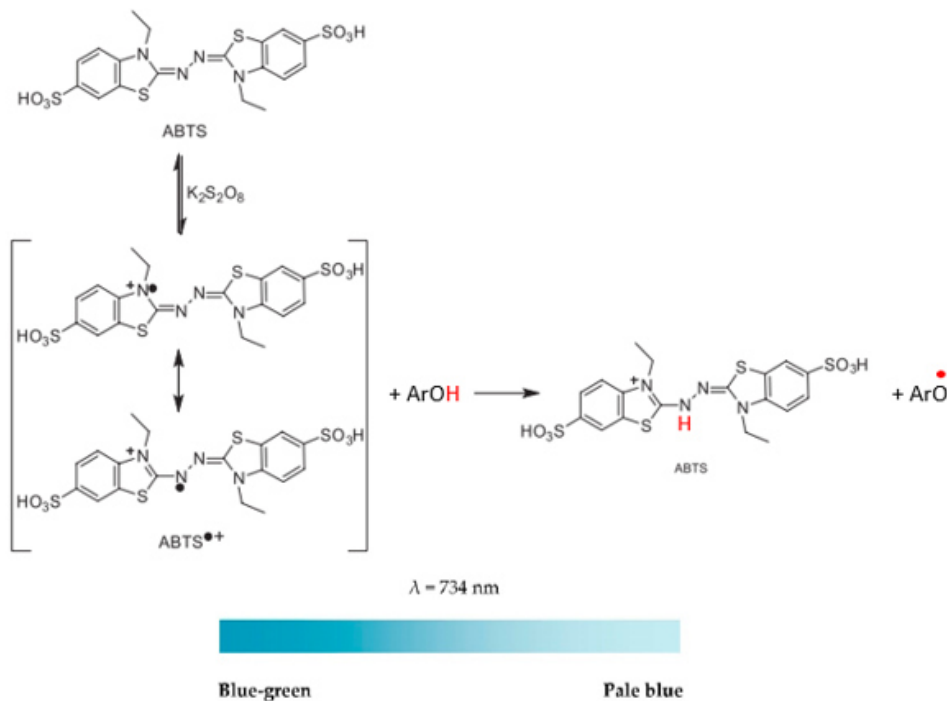
Tubos de reacción del AXF con una concentración creciente de izquierda a derecha*

**Imágenes tomadas luego de realizar las lecturas en el espectrofotómetro UV*

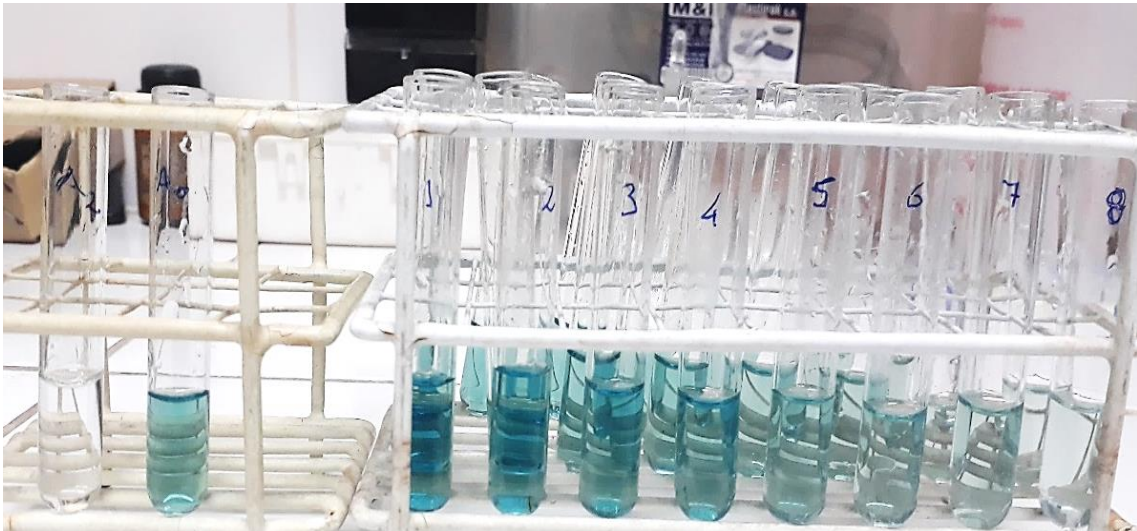
ANEXO 6

Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de ABTS

Fundamento: El persulfato de potasio genera el radical catión de ABTS^{•+} a partir de la molécula de ABTS (no todo el ABTS se oxida), la oxidación del ABTS es una reacción larga de 12 - 16 h. El radical inestable formado (ABTS^{•+}) presenta una coloración verde azulada con grupos cromóforos que absorben a 645, 734, 815 y 415 nm; sin embargo, a 734 nm se reduce las interferencias. El agente reductor (antioxidante) luego de transferir un electrón al radical inestable cambia su coloración hacia un azul pálido con la consecuente recuperación del ABTS en su forma estable.



Mecanismo de reacción general de reducción por transferencia de hidrogeno al radical catiónico ABTS^{•+}. Fuente: Sadier et al., *Antioxidants*, (2020), 9, 709



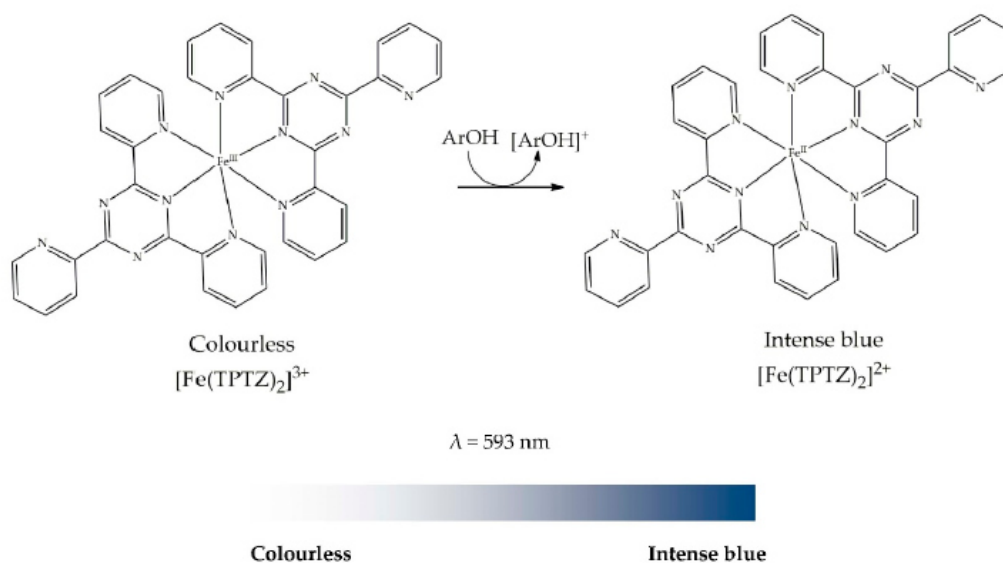
Tubos de reacción del AXF con una concentración creciente de izquierda a derecha

**Imagen tomada luego de realizar las lecturas en el espectrofotómetro UV*

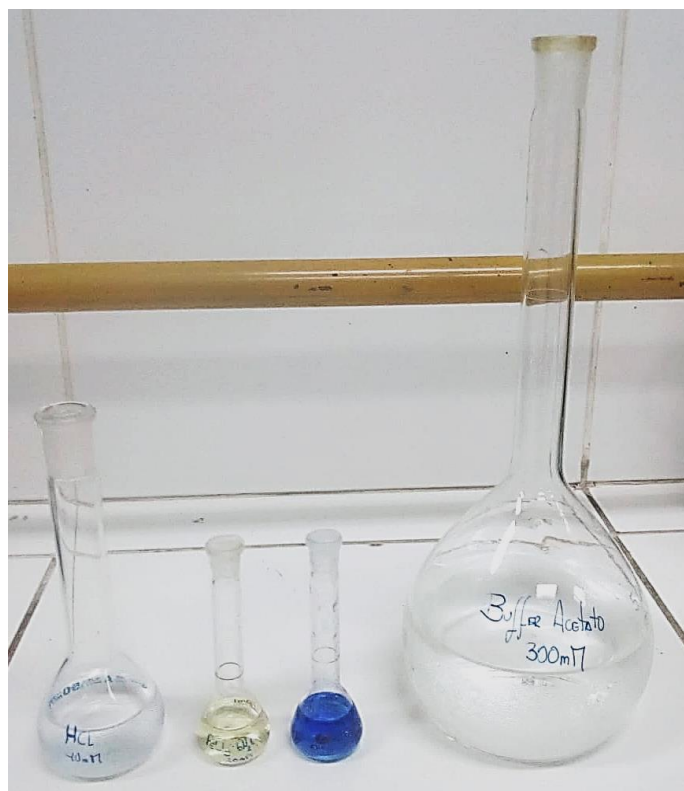
ANEXO 7

Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de FRAP

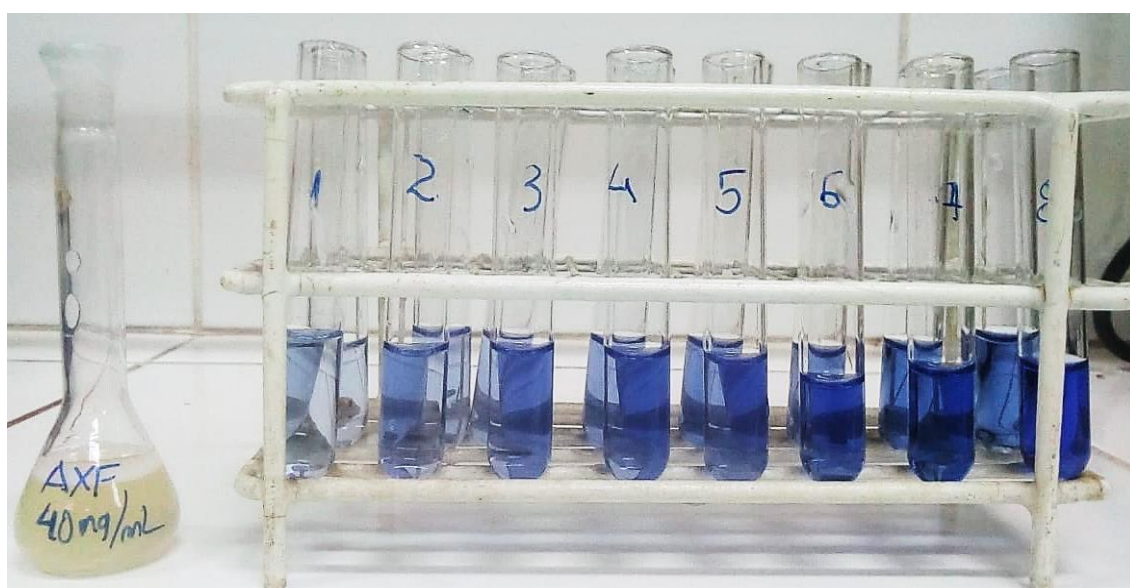
Fundamento: El ion Fe^{+3} en presencia de TPTZ oxida fácilmente a los antioxidantes por su elevado potencial de reducción, dándose lugar al complejo reducido TPTZ- Fe^{+2} . La reacción es llevada a cabo en medio ácido para solubilizar al hierro. La molécula del TPTZ es un ligando que proporciona alta estabilidad al ion ferroso.



Mecanismo de reacción para ensayo de FRAP por transferencia de electrones. Fuente: Sadier et al., *Antioxidants*, (2020), 9, 709



Reactivos A, B y C para el ensayo de FRAP



Tubos de reacción del AXF con una concentración creciente de izquierda a derecha*

**Imagen tomada luego de realizar las lecturas en el espectrofotómetro UV*

ANEXO 8

Determinación de la capacidad de adsorción de glucosa y de inhibición de la difusión de glucosa



A la izquierda se muestra el kit utilizado para determinar la capacidad de adsorción de glucosa y la derecha los tubos de reacción luego de cuantificar la glucosa.



A la izquierda se muestra el kit utilizado para determinar la capacidad de inhibición de difusión de glucosa y a la derecha los tubos de diálisis con agua, acarbosa y AXF (1, 10, 25mg/mL)

Resultados de la determinación de la capacidad de inhibición de difusión de glucosa del AXF

Tiempo (min)	Concentración de glucosa (µg/mL)				
	Control	Estándar (Control positivo)	AXF (1 mg/mL)	AXF (10 mg/mL)	AXF (25 mg/mL)
30	446,565 ± 20,04	418,893 ± 3,31	416,985 ± 11,57	377,863 ± 4,96	372,137 ± 44,62
60	642,176 ± 22,27	608,779 ± 9,20	613,550 ± 7,20	592,557 ± 7,57	567,748 ± 12,91
90	736,641 ± 8,75	688,931 ± 16,28	722,328 ± 10,84	672,710 ± 20,04	595,420 ± 30,29
120	791,199 ± 18,06	769,663 ± 10,13	772,472 ± 9,73	747,191 ± 18,42	706,929 ± 11,69
150	849,237 ± 28,67	791,031 ± 11,92	827,290 ± 11,45	802,481 ± 13,53	778,626 ± 2,86
180	866,412 ± 42,67	821,565 ± 15,15	851,145 ± 4,37	813,931 ± 28,24	798,664 ± 5,73

ANEXO 9

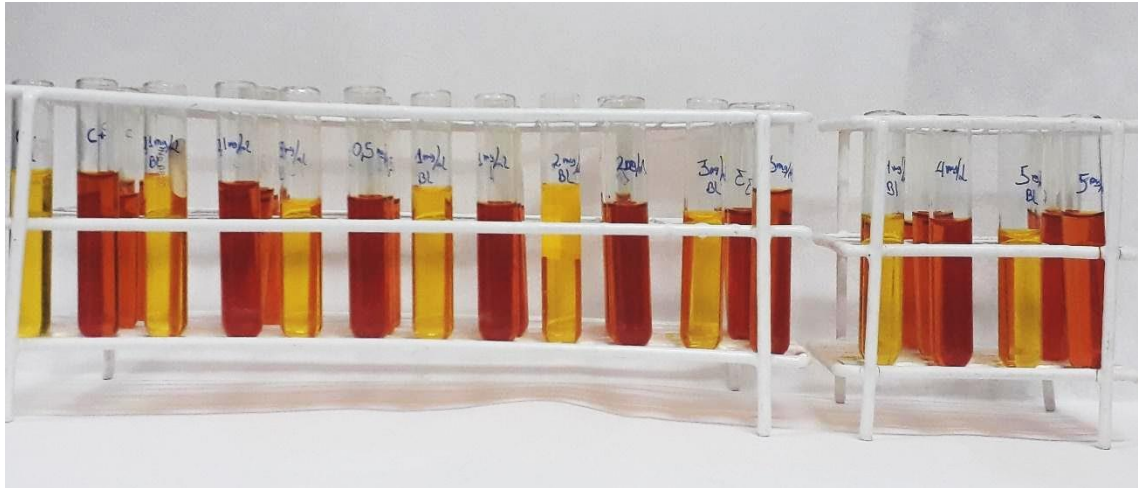
Determinación de la capacidad de inhibición de la α -amilasa



Reactivos utilizados para el ensayo de inhibición de la enzima α -amilasa



Tubos de reacción de controles, blancos y acarbosa con una concentración creciente de izquierda a derecha*



Tubos de reacción de controles, blancos y AXF con una concentración creciente de izquierda a derecha*

**Imágenes tomadas luego de realizar las lecturas en el espectrofotómetro UV*

ANEXO 10
Autores del presente trabajo de investigación

