

# Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y

Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DEL POTENCIAL DE  
INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS  $\alpha$ -AMILASA Y  $\alpha$ -GLUCOSIDASA DEL MAÍZ  
MORADO (*Zea mays* L.) PROCEDENTE DE DOS ZONAS GEOGRÁFICAS DE LA  
REGIÓN AREQUIPA UTILIZANDO MODELOS IN VITRO**

**Tesis presentada por la Bachiller:**

Ramírez Pinto, María Fernanda

**para optar el Título Profesional de:**

Ingeniera Biotecnóloga

**Asesora:**

Dra. Gálvez Ranilla, Lena

**Arequipa - Perú**

**2019**

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 2018000029307  
N° Trámite en Fac. 1750-2018  
Fecha 10-07-2018

**FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL**

DE: **RAMIREZ PINTO, Maria Fernanda**

**TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:**

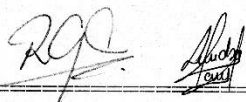
**"EVALUACION DEL POTENCIAL ANTIHIPERGLUCEMICO Y ANTIOXIDANTE DEL MAIZ MORADO PROCEDENTE DE DOS ZONAS GEOGRAFICAS DE LA REGION AREQUIPA UTILIZANDO MODELOS in vitro"**

**DICTAMINADORES:** 1) *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar* 2) *Mgter. Julitza Paredes Fuentes*

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por el recurrente, se ha procedido a la revisión del mismo, sugiriendo se cambie el título a: **"EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DEL POTENCIAL DE INHIBICIONES DE LAS ENZIMAS ALFA-GLUCOSIDASA Y ALFA-AMILASA DEL MAIZ MORADO PROCEDENTE DE DOS ZONAS GEOGRAFICAS DE LA REGION AREQUIPA UTILIZANDO MODELOS IN VITRO"**, y después de realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas:



Fecha 21 de agosto del 2018

**ASESOR:** *Dra. Lena Gálvez Revilla*

**DICTAMEN DE ASESOR:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: **"EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DEL POTENCIAL DE INHIBICIONES DE LAS ENZIMAS  $\alpha$ -GLUCOSIDASA Y  $\alpha$ -AMILASA DEL MAIZ MORADO (*Zea mays L.*) PROCEDENTE DE DOS ZONAS GEOGRAFICAS DE LA REGION AREQUIPA UTILIZANDO MODELOS IN VITRO"** y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Firma



Fecha 13 agosto 2019

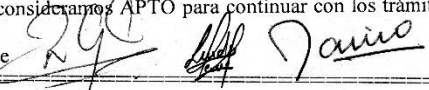
**DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:**

- 1) *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar* 3) *Mgter. Jaime Barreda del Carpio*  
2) *Mgter. Julitza Paredes Fuentes*

**DICTAMEN FINAL:**

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: **"EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DEL POTENCIAL DE INHIBICION DE LAS ENZIMAS  $\alpha$ -AMILASA Y  $\alpha$ -GLUCOSIDASA DEL MAIZ MORADO (*Zea mays L.*) PROCEDENTE DE DOS ZONAS GEOGRAFICAS DE LA REGION AREQUIPA UTILIZANDO MODELOS in vitro"** y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la

Facultad.  
Atentamente



Fecha 02 de setiembre del 2019

**JURADOS:** Presidente *DRA. ROXANA GUTIERREZ ARANIBAR*  
Vocal *MAG. JULITZA PAREDES FUENTES*  
Secretario *MAG. JAIME BARREDA DEL CARIPIO*

**SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:**



Fecha: 19/9/19

Hora: 19.00

Local: C- 402 (SUM)

## DEDICATORIA

*A mi familia, que me apoyaron en  
cada paso del camino sin importar  
que tan duro fuese.*



## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, ejemplo de sacrificio, que con su amor y apoyo incondicional que tuvieron a lo largo de mi vida me ayudaron a derrumbar cualquier obstáculo que la vida me presentara.*

*A mis abuelas, Doris y Eva, por entregarme todo su amor y por las cuales no sería la persona que soy en este día.*

*A mi madrina, Nana, que siempre me apoyó y se preocupó por mi bienestar.*

*A mis hermanos, Lucia y Pablo, que su apoyo y ejemplo me enseñaron grandes lecciones en la vida.*

*A la Dra. Lena Gálvez por ser una voz guía en este periodo de mi vida, por las enseñanzas y los buenos consejos que me brindó.*

*A todos mis compañeros, en especial Mishell, por sus palabras de apoyo y por no dudar de mi éxito durante este proceso.*

Este proyecto de tesis se realizó como parte del proyecto **VARIABILIDAD DE LAS PROPIEDADES BIOACTIVAS IN VITRO Y NUTRICIONALES POR EFECTO DE LA LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL CULTIVO DE MAÍZ MORADO (RAZA KCULLI) DE LA REGIÓN AREQUIPA Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SU POTENCIAL SOBRE LA REGENERACIÓN CELULAR** con el financiamiento del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María mediante el formato fondos internos concursables. Proyecto fondo para la Investigación Resolución N.º **24957-R-2017.**



## INTRODUCCIÓN

El aumento de distintas Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) asociadas al estrés oxidativo como la diabetes tipo 2 se están volviendo cada vez más comunes en la región Arequipa, siendo las principales causas de riesgo para contraer dichas enfermedades los malos hábitos alimenticios de la población, además de otros factores.

Por otro lado, no existe información científica del potencial nutritivo y funcional relevante a la salud de la diversidad alimentaria de la región. Su valorización y consumo equilibrado podría constituir una estrategia dietética importante para la prevención de las ECNT. Un producto destacado de esta biodiversidad es el maíz morado (*Zea mays* L.), del cual se desconoce cómo varía su composición (nutricional y fitoquímica) y sus propiedades bioactivas en función a la variedad y a las zonas geográficas de cultivo en Arequipa, las cuales se asocian generalmente a diferentes condiciones climáticas.

Este trabajo será el primero en abordar el estudio de la variabilidad de la bioactividad (capacidad antioxidante e inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa relevante para la modulación de la hiperglicemia) del maíz morado según las zonas geográficas de cultivo en la región.

Esta investigación abrirá las puertas a futuras investigaciones que ayuden a contribuir con el conocimiento científico de los alimentos de origen vegetal presentes en la biodiversidad regional. La información generada sobre el maíz morado de Arequipa respecto a su potencial actividad antioxidante y antihiper glucémica *in vitro* y su variabilidad según el lugar de cultivo podría contribuir con información importante para mejorar a futuro la cadena productiva de maíz morado en la región.



## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el potencial funcional relevante a la salud de muestras de maíz morado de la variedad Canteño (marlo y grano) procedentes de dos zonas de cultivo en la región de Arequipa (Iray y Chuquibamba, provincia de Condesuyos) en relación a su capacidad antioxidante a través de los métodos de inhibición de los radicales ABTS (2,2-azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrasil) y su potencial de inhibición *in vitro* de las enzimas digestivas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa relevantes para el control de la hiperglicemia. Se evaluaron las fracciones fenólicas libres y ligadas (fenólicos asociados a la fibra dietética) del marlo y grano del maíz morado y se incluyeron muestras de una zona de referencia para efectos comparativos (Corire, provincia de Castilla).

Se encontraron valores altos de capacidad antioxidante en la fracción fenólica libre de las muestras de grano y marlo; y esta propiedad fue mayor en el marlo (de 29909.55 a 37301.89  $\mu$ moles Equivalentes de Trolox/100 g base seca (bs) y de 6998.60 a 9483.22  $\mu$ moles Equivalentes de Trolox/100 g base seca (bs) con el método de ABTS y DPPH respectivamente). Todas las muestras presentaron potencial *in vitro* de inhibición de las enzimas digestivas evaluadas, sin embargo, los rangos de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa fueron mayores a los valores de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa y estas propiedades fueron a su vez más elevadas en la fracción fenólica libre del marlo (30.64 % con 25 mg y 95.01 % con 1.25 mg de muestra para el ensayo de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, respectivamente). Las muestras procedentes de Chuquibamba presentaron los mayores valores de capacidad antioxidante y la mayor actividad de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa. Estos resultados constituyen una base bioquímica importante para la validación *in vivo* a futuro

del potencial antioxidante e hipoglucémico del maíz morado y potencial mejora de la cadena productiva de este maíz.

**Palabras Claves:** *Zea mays* L., fracción fenólica libre, fracción fenólica ligada, marlo, grano, capacidad antioxidante, inhibición de las enzimas digestivas,  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa.



## ABSTRACT

This research evaluated the health-relevant functional potential of purple corn samples (Variety Canteño, corn cob and grains) grown in two geographical zones from the Arequipa region (Iray and Chuquibamba, Condesuyos province) in relation to their antioxidant capacity measured by two free radical inhibition methods (ABTS: 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic and DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) and their in vitro inhibition potential against digestive enzymes such as  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase relevant for hyperglycemia management. The free phenolic and dietary fiber-linked phenolic fractions from purple corn cob and grains were analyzed and samples from a reference geographical zone have been included for comparative purposes (Corire, Castilla province). The free phenolic fractions from cob and grain samples exhibited higher in vitro antioxidant capacity values than bound-phenolic fractions and this property was the highest in corn cob samples (from 29909.55 to 37301.89, and from 6998.60 to 9483.22  $\mu$ moles TE/100 g dw with the ABTS and DPPH methods, respectively). All sample extracts showed potential for the in vitro inhibition of evaluated digestive enzymes; however, ranges of  $\alpha$ -glucosidase inhibition were higher than  $\alpha$ -amylase inhibition values and both functional properties were high in the corn cob free phenolic fractions (30.64 % with 25 mg and 95.01 % with 1.25 mg of sample for the  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition test, respectively). Purple corn samples from Chuquibamba had the highest values of antioxidant capacity and in vitro inhibition of  $\alpha$ -amylase. Results from current research are an important biochemical base for future in vivo validation of antioxidant and anti-hyperglycemic properties of purple corn and may give critical scientific information for the future improvement of purple corn productive chain.

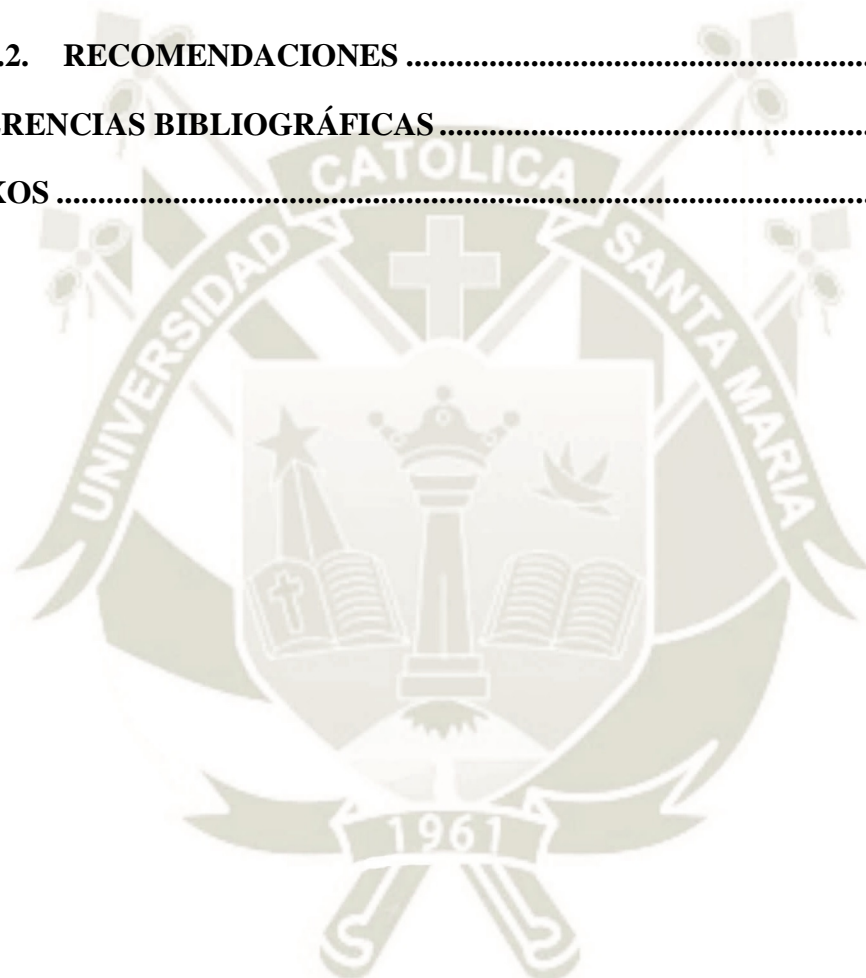
**Key words:** Zea mays L., free phenolic fraction, bound phenolic fraction, cob, grain, antioxidant capacity, digestive enzymes inhibition,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO .....</b>	<b>x</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>xix</b>
<b>1. Objetivo General .....</b>	<b>xix</b>
<b>2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>xix</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>xx</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. COMPUESTOS FENÓLICOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Flavonoides .....</b>	<b>1</b>
1.1.1.1. Antocianinas.....	2
<b>1.1.2. Ácidos fenólicos .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. ENFERMEDADES CRONICAS NO TRANSMISIBLES (ECNT) .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1. Estrés Oxidativo .....</b>	<b>5</b>
1.2.1.1. Radicales Libres .....	6
1.2.1.2. Antioxidantes .....	8
<b>1.2.2. Diabetes tipo 2 .....</b>	<b>9</b>
1.2.2.1. Polifenoles y efecto en la diabetes tipo 2.....	10
<b>1.3. MAIZ MORADO (<i>Zea mays</i> L.) .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.1. Producción.....</b>	<b>12</b>

1.3.2. Clasificación Taxonómica.....	14
1.3.3. Propiedades Bioactivas .....	14
CAPÍTULO II.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. LUGAR DE INVESTIGACION.....	16
2.2. MATERIALES.....	16
2.2.1. Obtención y Almacenamiento del Material Vegetal .....	16
2.2.2. Insumos y Reactivos Químicos.....	17
2.2.3. Material de Laboratorio .....	18
2.2.4. Equipos e Instrumentación .....	18
2.3. MÉTODOS.....	19
2.3.1. Metodología de preparación de muestras y extracción.....	19
2.3.1.1. Preparación de muestra.....	19
2.3.1.2. Extracción de la fracción fenólica libre .....	20
2.3.1.3. Extracción de la fracción fenólica ligada.....	20
2.3.2. Métodos de Análisis.....	20
2.3.2.1. Determinación de Humedad .....	20
2.3.2.2. Capacidad antioxidante.....	21
2.3.2.3. Inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -amilasa .....	24
2.3.2.4. Inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -glucosidasa .....	25
2.3.3. Análisis Estadístico.....	27
CAPÍTULO III.....	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
3.1. ANALÍISIS DE HUMEDAD .....	28
3.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	28

3.2.1. Inhibición del radical ABTS .....	28
3.2.2. Inhibición del radical DPPH.....	32
3.3. INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA .....	35
3.4. INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA .....	41
CAPÍTULO IV.....	46
4.1. CONCLUSIONES.....	47
4.2. RECOMENDACIONES .....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS .....	58



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura básica y sistema de numeración de los flavonoides. (4) .....	2
Figura 2.- Antocianidinas más comunes en la naturaleza. (16).....	3
Figura 3.- Ejemplo de ácido fenólico. (23) .....	4
Figura 4.- Sitios potenciales de acción de los polifenoles de la dieta sobre el metabolismo de los carbohidratos y la homeostasis de la glucosa. (53) .....	10
Figura 5.- Diagrama esquemático de la hidrólisis enzimática de los oligosacáridos y la inhibición competitiva de la acarbosa. (57).....	11
Figura 6.- Producción a nivel nacional de maíz morado. (64) .....	13
Figura 7.- Cianidina-3-glucósido. (70) .....	14
Figura 8.- Estructura del ABTS●+ antes y después de la reacción con el antioxidante. (85) .....	21
Figura 9.- Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante. (85)23	23
Figura 10.- Oxidación de azúcares reductores por la acción del DNS. (88).....	24
Figura 11.- Hidrólisis enzimática del p-nitrofenil-D glucopiranosido por acción de la $\alpha$ -glucosidasa. (89).....	26
Figura 12.- Porcentaje de inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa por extractos de la fracción fenólica libre del marlo. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma dosis de muestra indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.....	36
Figura 13.- Porcentaje de inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa por extractos de la fracción fenólica libre del grano. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma dosis de muestra indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.....	37
Figura 14.- Porcentaje de inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa por extractos de la fracción fenólica ligada de marlo y grano. Letras diferentes en las barras correspondientes al mismo tipo de muestra, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.....	39
Figura 15.- Porcentaje de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa por extractos de la fracción fenólica libre del marlo. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma dosis de muestra, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos. ....	42

Figura 16.- Porcentaje de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa por extractos de la fracción fenólica libre del grano. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma dosis de muestra, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos. ....	43
Figura 17.- Porcentaje de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa por extractos de la fracción fenólica ligada de marlo y grano. Letras diferentes en las barras correspondientes al mismo tipo de muestra, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.....	44
Figura 18.- Método de inhibición del radical ABTS. ....	60
Figura 19.- Método de inhibición del radical DPPH. ....	60
Figura 20.- Método de inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa.....	61
Figura 21.- Método de la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa.....	61
Figura 22.- Curva de calibración para el ABTS. ....	64
Figura 23.- Curva de calibración para el DPPH. ....	68
Figura 24.- Equipo Manifold con bomba de vacío utilizado para la purificación de la fracción fenólica libre del marlo usando columnas SPE C18.....	82
Figura 25.- Inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa por extractos de antocianinas del marlo pre-purificada por extracción en fase sólida.....	83
Figura 26.- Inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa por extractos de antocianinas del marlo pre-purificada por extracción en fase sólida.....	84
Figura 27.- Inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa por extractos de marlo. ....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Radicales de algunos ácidos fenólicos. (23).....	4
Tabla 2.- Ejemplo de algunas especies reactivas y radicales libres. (41) .....	7
Tabla 3.- Lugar de colecta y código dispuesto para las muestras.....	17
Tabla 4.- Contenido de humedad de las muestras de maíz morado evaluadas.....	28
Tabla 5.- Capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre ABTS del marlo de maíz morado ( $\mu$ moles ET/100 g bs).....	30
Tabla 6.- Capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre ABTS del grano de maíz morado ( $\mu$ moles ET/100 g bs). .....	30
Tabla 7.- Capacidad antioxidante total (libre+ligada) ( $\mu$ moles ET/100 g bs) por el método de inhibición del radical ABTS de maíz de diferentes procedencias en comparación con los resultados del estudio actual. ....	31
Tabla 8.- Capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre DPPH del marlo de maíz morado ( $\mu$ moles ET/100 g bs).....	32
Tabla 9.- Capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre DPPH del grano de maíz morado ( $\mu$ moles ET/100 g bs). ....	33
Tabla 10.- Valores de capacidad antioxidante total (libre+ligada) ( $\mu$ moles ET/100 g bs) por el método de inhibición del radical DPPH de maíz de diferentes procedencias en comparación con los resultados del estudio actual. ....	34
Tabla 11.- Valores de porcentaje de inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa de muestras de diferentes procedencias en comparación con los resultados del estudio actual. ....	40
Tabla 12.- Valores de porcentaje de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa de muestras de diferentes procedencias en comparación con los resultados del estudio actual. ....	46
Tabla 13.- Chuquibamba: Periodo noviembre 2017 – mayo 2018.....	59
Tabla 14.- Aplao (Corire): Periodo abril 2017 – enero 2018 .....	59
Tabla 15.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre ABTS con extractos de la fracción fenólica libre del marlo.....	62
Tabla 16.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre ABTS con extractos de la fracción fenólica libre del grano. ....	62
Tabla 17.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre ABTS con extractos de la fracción fenólica ligada del marlo. ....	63
Tabla 18.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre ABTS con extractos de la fracción fenólica ligada del grano.....	63

Tabla 19.- Curva de calibración para el ABTS. ....	64
Tabla 20.- Estadístico t-student para la inhibición del radical ABTs fracción libre.....	65
Tabla 21.- Estadístico t-student para la inhibición del radical ABTs fracción ligada. ....	65
Tabla 22.- Estadístico t-student para la inhibición del radical ABTs total. ....	65
Tabla 23.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre DPPH con extractos de la fracción fenólica libre del marlo.....	66
Tabla 24.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre DPPH con extractos de la fracción fenólica libre del grano.....	66
Tabla 25.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre DPPH con extractos de la fracción fenólica ligada del marlo. ....	67
Tabla 26.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre DPPH con extractos de la fracción fenólica ligada del grano.....	67
Tabla 27.- Curva de calibración para el DPPH. ....	68
Tabla 28.- Estadístico t-student para DPPH Fracción libre. ....	69
Tabla 29.- Estadístico t-student para DPPH fracción ligada.....	69
Tabla 30.- Estadístico t-student para DPPH total. ....	69
Tabla 31.- Control positivo con acarbosa para la $\alpha$ -amilasa. ....	70
Tabla 32.- Control positivo con acarbosa para la $\alpha$ -glucosidasa.....	70
Tabla 33.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -amilasa con extractos de la fracción fenólica libre de marlo.....	71
Tabla 34.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -amilasa con extractos de la fracción fenólica libre de grano.....	72
Tabla 35.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -amilasa con extractos de la fracción fenólica ligada de marlo.....	73
Tabla 36.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -amilasa con extractos de la fracción fenólica ligada de grano.....	73
Tabla 37.- Análisis estadístico para comparación del porcentaje de inhibición de $\alpha$ -amilasa fracción libre de marlo. ....	74
Tabla 38.- Análisis estadístico para comparación del porcentaje de inhibición de $\alpha$ -amilasa fracción libre de grano. ....	74
Tabla 39.- Estadístico t-student para el porcentaje de inhibición de $\alpha$ -amilasa fracción ligada. ....	74
Tabla 40.- Estadístico t-student para el porcentaje de inhibición de $\alpha$ -amilasa fracción ligada. ....	75

Tabla 41.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -glucosidasa con extractos de la fracción fenólica libre de marlo. ....	76
Tabla 42.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -glucosidasa con extractos de la fracción fenólica libre de grano. ....	77
Tabla 43.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -glucosidasa con extractos de la fracción fenólica ligada de marlo. ....	78
Tabla 44.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -glucosidasa con extractos de la fracción fenólica ligada de grano. ....	79
Tabla 45.- Análisis estadístico para comparación de porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa fracción libre de marlo. ....	80
Tabla 46.- Análisis estadístico para comparación de porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa fracción libre de grano. ....	80
Tabla 47.- Estadístico t-student para el porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa fracción ligada. ....	80
Tabla 48.- Estadístico t-student para el porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa fracción ligada. ....	81

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Condiciones pre y post cosecha de las diferentes zonas de recolección de muestras. .....	58
Anexo 2. Condiciones Climáticas de las zonas de recolección durante la época de siembra. .....	59
Anexo 3.- Ejemplo del método ABTS. ....	60
Anexo 4.- Ejemplo del método DPPH. ....	60
Anexo 5.- Ejemplo del método de inhibición de la $\alpha$ -amilasa. ....	61
Anexo 6.- Ejemplo del método de inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa. ....	61
Anexo 7.- Resultados de la inhibición del radical libre ABTS. ....	62
Anexo 8.- Curva de calibración del método de inhibición <i>in vitro</i> del radical libre ABTS. .....	64
Anexo 9.- Análisis estadístico de los resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre ABTS.....	65
Anexo 10.- Resultados de la inhibición del radical libre DPPH. ....	66
Anexo 11.- Curva de calibración para el método de inhibición <i>in vitro</i> del radical libre DPPH.....	68
Anexo 12.- Análisis estadístico de los resultados de la inhibición <i>in vitro</i> del radical libre DPPH.....	69
Anexo 13.- Control positivo de inhibición de las enzimas digestivas $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ - glucosidasa utilizando acarbosa.....	70
Anexo 14.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -amilasa.....	71
Anexo 15.- Análisis estadístico de los resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ - amilasa.....	74
Anexo 16.- Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ -glucosidasa.....	76
Anexo 17.- Análisis estadístico de los resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de la enzima $\alpha$ - glucosidasa .....	80
Anexo 18. Purificación de la fracción fenólica libre por extracción en fase sólida (SPE).82	
Anexo 19. Resultados de inhibición de enzimas con extractos de antocianinas a partir de marlo. ....	83
Anexo 20. Resultados de inhibición de la enzima $\alpha$ - glucosidasa con extractos de la fracción ligada provenientes de marlo de la región Chuquibamba. ....	85

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo General

Evaluar la capacidad antioxidante y del potencial de inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa del maíz morado (*Zea mays* L.) procedente de dos zonas geográficas de la región Arequipa utilizando modelos *in vitro*.

### 2. Objetivos Específicos

1. Determinar el potencial antioxidante *in vitro* de las fracciones fenólicas libres y ligadas de las muestras de maíz morado (granos y marlos) procedentes de dos zonas geográficas de Arequipa utilizando los métodos inhibición del radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) y ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)).
2. Analizar el potencial de inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa de las fracciones fenólicas libres y ligadas de las muestras de granos y mazorcas de maíz morado (granos y marlos) procedentes de dos zonas geográficas de Arequipa a través de métodos *in vitro*.
3. Evaluar estadísticamente los resultados para determinar la variabilidad de las propiedades bioactivas del maíz morado por efecto de la zona geográfica de procedencia.

## HIPÓTESIS

El maíz morado presenta capacidad antioxidante y potencial de inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* (1); y estas propiedades podrían variar en función a la zona geográfica de cultivo en la región Arequipa.



## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. COMPUESTOS FENÓLICOS

Se denomina polifenoles a compuestos que presentan en su estructura uno o más anillos fenólicos, originándose principalmente en plantas que los sintetizan en gran cantidad como producto de su metabolismo secundario. Algunos cumplen funciones importantes dentro de la planta como defensa ante factores de estrés y otros estímulos bióticos o abióticos. Los polifenoles se pueden clasificar según el número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos, siendo los principales: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos. (2) (3)

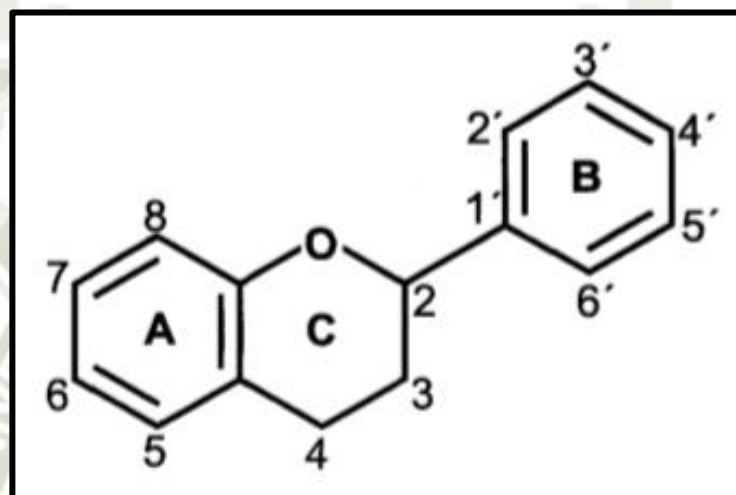
La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos. (4)

En el maíz morado, como en todos los cereales, los compuestos fenólicos se encuentran de manera soluble e insoluble o ligada. Dentro del grupo de solubles podemos encontrar a los fenoles libres, entre los cuales encontramos flavonoides (antocianinas), ácidos fenólicos y amidas fenólicas. Por otro lado, los fenoles insolubles se encuentran ligados a los componentes presentes en la pared celular, el ácido ferúlico es el de mayor abundancia en esta fracción, su unión a la pared celular contribuye al dar una mayor resistencia a las paredes celulares, estos polifenoles no pueden ser absorbidos en el intestino delgado, por lo que pasan al intestino grueso donde pueden llegar a ser fermentados por una serie de microorganismos, siendo parcialmente liberados de la pared celular. (5) (6) (7) (8)

##### 1.1.1. Flavonoides

Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre, pero en muy bajas concentraciones (también llamados agliconas flavonoides). Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los

anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Fig. 1) (9). Además, se pueden presentar como sulfatos, dímeros o polímeros. Existen varios subgrupos de flavonoides que se clasifican por su estructura química, la posición y número de los grupos hidroxilo y por los grupos funcionales que puedan tener: flavonoles, flavonas, flavanonas (di-hidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles. (10) (11)

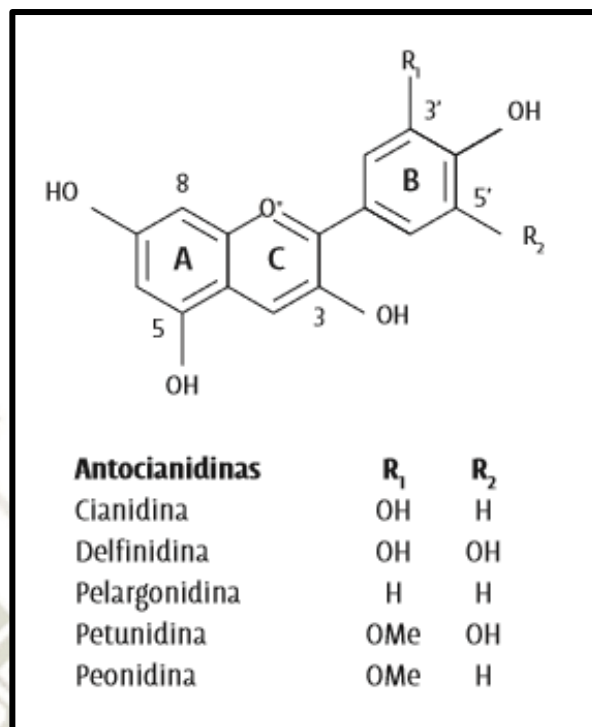


**Figura 1.-** Estructura básica y sistema de numeración de los flavonoides. (4)

#### 1.1.1.1. Antocianinas

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Químicamente, las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides y son glucósidos de las antocianidinas, constituida por una molécula de antocianidina unida por un enlace glucosídico a un azúcar. Sus funciones en las plantas son múltiples, desde la protección contra la radiación ultravioleta, atracción de insectos polinizadores, entre otros. (12) (13)

Se conocen aproximadamente 20 antocianidinas, entre las más importantes se encuentran la pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y la malvidina (Fig. 2); la combinación de éstas con los diferentes azúcares (glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa, arabinosa, etc.) genera aproximadamente 150 tipos antocianinas. (14) (15)



**Figura 2.-** Antocianidinas más comunes en la naturaleza. (16)

Las antocianinas una vez consumidas a través de diferentes fuentes alimentarias son muy poco biodisponibles, sin embargo, existe numerosa literatura en relación a sus efectos beneficiosos para la salud como la reducción de la enfermedad coronaria, efectos antioxidantes, anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos (17). Según varios estudios realizados con diferentes fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que éstas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas. (18) (19)

Diversas investigaciones han mostrado que productos con un alto contenido en antocianinas tienen un elevado potencial antioxidante y promueven un efecto antihiper glucémico. Por ejemplo, el maqui (*Aristotelia chilensis*) es un fruto con un alto contenido en antocianinas y ha mostrado un efecto positivo en el balance de la glucosa en sangre en modelos *in vivo* (20). En otro estudio se compararon las propiedades bioactivas de 3 variedades de arándano: Northland (NL), Britewell (BW) y Gardenblue (GB) de China, resultando que el extracto de antocianinas de la variedad NL exhibió una actividad

antioxidante superior, pero, la variedad BW mostró tener el efecto inhibitor de la  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* más fuerte. (21)

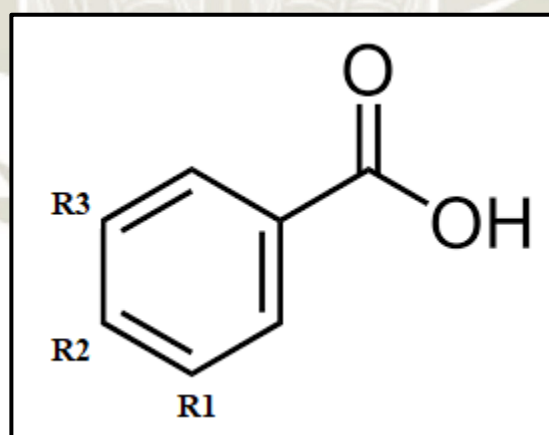
### 1.1.2. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos o también llamados ácidos fenol carboxílicos, son compuestos orgánicos, que comprenden sustancias que contienen un anillo fenólico y una función orgánica de ácido carboxílico (C6-C1). (22)

En la Tabla 1 se pueden apreciar algunos de los ácidos fenólicos de interés en alimentos, con sus respectivos radicales (Fig. 3). (23)

**Tabla 1.-** Radicales de algunos ácidos fenólicos. (23)

Ácido	Nombre científico	R1	R2	R3
p-Hidroxibenzoico	4-Hidroxibenzoico	H	OH	H
Protocatecuico	3,4-Dihidroxibenzoico	OH	OH	H
Vainillíco	4-Hidroxi-3-Metoxibenzoico	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Siríngico	3,5-Dimetoxibenzoico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Gálico	3,4,5-Trihidroxibenzoico	OH	OH	OH



**Figura 3.-** Ejemplo de ácido fenólico. (23)

## 1.2. ENFERMEDADES CRONICAS NO TRANSMISIBLES (ECNT)

Las ECNT son enfermedades de larga duración cuya evolución es generalmente lenta. Estas enfermedades representan una verdadera epidemia que va en aumento debido a los modos de vida actuales que acentúan el sedentarismo y la mala

alimentación. Las principales ECNT son la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la enfermedad renal, y se caracterizan por compartir los mismos factores de riesgo como el tabaquismo, mala alimentación, falta de actividad física y consumo excesivo de alcohol. En su conjunto son responsables de más del 60% de las muertes a nivel mundial, 80% de las cuales ocurren en países de bajos y medianos ingresos. (24) (25)

Particularmente, los malos hábitos alimenticios están provocando el incremento de personas con sobrepeso y obesidad en el Perú y el mundo. Estos malos hábitos se relacionan con el consumo constante de alimentos azucarados, alimentos con altos contenidos en sodio o grasas, harinas refinadas y lácteos en reemplazo de las dietas tradicionales generalmente más ricas en granos enteros, verduras y frutas nativas (26). Según un informe reciente de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y la OPS (Organización Panamericana de la Salud) en el Perú el sobrepeso (índice de masa corporal (IMC) = 25.0 - 29.9 kg/m<sup>2</sup>), afecta al 58.2% de adultos y al 7.2% de menores de 5 años. En el caso de la obesidad (IMC = 30.0 - 40.0 kg/m<sup>2</sup>) el 20%, de la población en el Perú es obesa, siendo las mujeres las más afectadas (26%) que los hombres (16%) (27) (28). En Arequipa, el 40.5% de la población de Arequipa mayor de 25 años tiene sobrepeso y el 18.5% es obesa. (29)

La obesidad se relaciona generalmente con otros problemas de salud como alta presión sanguínea, elevados niveles de glucosa y colesterol en la sangre, condiciones que en su conjunto se conocen como el síndrome metabólico (30). Si este síndrome no es controlado con un cambio de alimentación en conjunto con intervenciones farmacológicas apropiadas, se pueden manifestar diversas ECNT como la diabetes tipo 2. Esta enfermedad metabólica alberga un conjunto de alteraciones caracterizadas por la elevación de la glucosa en sangre (hiperglucemia) y generalmente deriva en una serie de complicaciones cardiovasculares como: enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca y cardiomiopatía diabética. (31) (32) (33)

### 1.2.1. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la capacidad de un sistema biológico de decodificar

rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todos los seres vivos mantienen un entorno reductor dentro de las células; este entorno se preserva por enzimas que mantienen este estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en estos sistemas REDOX causan efectos tóxicos por la producción de peróxidos y radicales libres, dañando los componentes de la célula como las proteínas, lípidos, carbohidratos y el DNA (34). El estrés oxidativo puede originarse por dos motivos: (35)

- Reducción de antioxidantes disponibles por una mala alimentación.
- Excesiva producción de especies reactivas de oxígeno debido a la sobreexposición de células a altos niveles de oxígeno.

En la actualidad se han desarrollado modelos que estudian el efecto de los procesos oxidativos y cómo estos están involucrados con el desarrollo y la progresión de la diabetes mellitus tipo 2. Por ejemplo, se demostró que el estrés oxidativo generado por la acumulación de grasa tiene un efecto patógeno promoviendo el síndrome metabólico asociado a la obesidad (36). También la hiperglucemia contribuye al daño oxidativo, al activar diferentes mecanismos de reacción, entre los cuales se proponen la oxidación de la glucosa, la vía del sorbitol, la glicación de proteínas (AGE), entre otros. (37) (38) (39)

#### 1.2.1.1. Radicales Libres

Químicamente, los radicales libres son especies químicas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en su órbita externa, es por esto que los radicales libres oxidan a las moléculas vecinas para así adquirir un equilibrio químico. Son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. (40) (41) (42)

Al momento de que las moléculas vecinas son oxidadas por los radicales libres, se convierten en especies radicalarias inestables, en busca de electrones de moléculas vecinas para alcanzar su propio equilibrio, provocando así una reacción en cadena que puede llegar a hacer mucho daño en el organismo, si no hay un control con los antioxidantes. (40)

Molecularmente, son moléculas pequeñas producto de varios mecanismos como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y de cloroplastos, y en reacciones de oxidación provocando daño celular al interactuar con biomoléculas de gran importancia en el organismo. Estos se producen a través de diferentes mecanismos de manera tanto endógena como exógena. (35)

**Tabla 2.-** Ejemplo de algunas especies reactivas y radicales libres. (41)

ESPECIE REACTIVA	RADICAL LIBRE
<b>ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)</b>	Superóxido ( $O_2^-$ ) Hidroxilo ( $\bullet OH$ ) Hidroperóxido ( $HO_2\bullet$ ) Peróxido ( $RO_2\bullet$ )
<b>ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO (RNS)</b>	Óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) Dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ).

Estas moléculas pueden ser neutralizadas por el propio organismo de ser producidos en cantidades moderadas. Sin embargo. Las moléculas de ROS que escapen los sistemas de defensa pueden causar daños irremediables a los carbohidratos, proteínas, lípidos y ADN que puedan alcanzar; provocando consecuencias variadas que pueden ser de corto o largo plazo. (35) (42)

- Daño al ADN: Producido por el  $\bullet OH$ , provocando distintas modificaciones, en general en la desoxirribosa, liberando bases nitrogenadas unidas a este azúcar; provocando el rompimiento de una o ambas cadenas así causando deleciones dando resultado en mutaciones, reordenamientos cromosómicos, activación o inactivación de genes. También el estrés oxidativo causado produce errores durante la transcripción y la traducción del ARN. (35) (43)
- Daño a las proteínas: Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos que son susceptibles al ataque de radicales libres, en su mayoría por el radical hidroxilo; los aminoácidos más susceptibles a un ataque oxidativo son la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y la cisteína. Esta oxidación provoca en las proteínas un deterioro en la actividad hormonal y enzimática, así como en el

transporte de iones, y una mayor sensibilidad a una degeneración proteolítica. (35) (43)

- Daño en los lípidos: Se conoce a este daño como peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo, por lo que afecta a estructuras ricas en ácidos grasos polinsaturados (PUFA). Los PUFA son una parte esencial de fosfolípidos que forman la capa bilipídica de las membranas celulares, brindándoles fluidez e integridad. El daño de la oxidación sobre éstas resulta en la pérdida en la estabilidad y permeabilidad de la membrana, provocando la muerte celular. (35) (43)
- Daño a los carbohidratos: Un radical carbono se produce al momento que el radical hidroxilo secuestra al azar un hidrógeno de un átomo de carbono; provocando así la ruptura de moléculas como el ácido hialurónico y la condroitina. (35) (43)

#### 1.2.1.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias capaces de neutralizar radicales libres, mediante la liberación de electrones en la sangre, captados por radicales libres para así poder alcanzar su estabilidad y de este modo ya no dañen las células. Por esto los antioxidantes son vitales en el mantenimiento óptimo de las células. (35)

Los antioxidantes se transforman en radicales libres débiles al donarle un electrón a los radicales libres presentes, estos radicales libres débiles tienen un escaso o nulo efecto tóxico, en algunos casos se pueden regenerar en su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes, como la vitamina E. (41) (43)

Según su naturaleza, los antioxidantes pueden clasificarse como endógenos, sintetizados en la célula, y exógenos, que ingresan al organismo a través de la dieta. (43)

- Antioxidantes enzimáticos o endógenos: Enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-PX) y glutatión reductasa. (35) (42) (43)
- Antioxidantes no enzimáticos o exógenos: Sustancias de origen vegetal, de bajo peso molecular ingeridos a través de la dieta, como la vitamina

C (ácido ascórbico), vitamina E (α-tocoferol), β-caroteno (provitamina A), polifenoles y algunos elementos traza (selenio, cobre, zinc y magnesio). (35) (42) (43)

- **Polifenoles como antioxidantes**

Los polifenoles, en especial los flavonoides, son efectivos donadores de hidrógenos. Su potencial antioxidante depende del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones- $\pi$  (44). Las antocianinas, pertenecientes al grupo de los flavonoides presentan una estructura adecuada para ser antioxidantes, ya que pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres, o bien, atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. (45) (46)

### 1.2.2. Diabetes tipo 2

La hiperglicemia es el aumento anormal de la glucosa en sangre, esto es lo primero que se encuentra en todos los tipos de diabetes mellitus. La hiperglicemia y la resistencia a la insulina tienen efectos como la disminución de la resistencia a la infección, al favorecer la infección por bacterias Gram-negativas y por hongos. (47) (48)

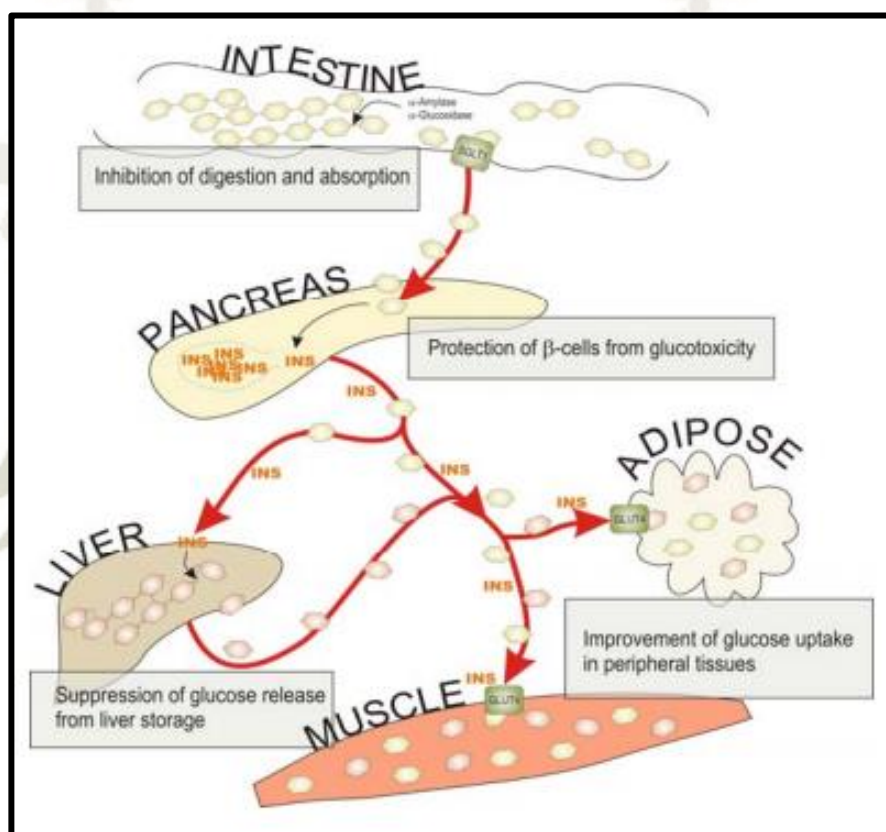
La diabetes tipo 2 es un desorden metabólico caracterizado por la hiperglicemia, en contexto a la resistencia a la insulina y la falta relativa de ésta. La obesidad se cree que es una de las razones principales para el desarrollo de la diabetes, esto explica el aumento en las tasas de incidencia en ambas paralelamente. (48) (49)

En el Perú, la diabetes mellitus (tipo 1 y 2) afecta al 7% de la población adulta, siendo que la diabetes tipo 2 representa el 96.8% de los casos. La diabetes tipo 2 es la octava causa de muerte en el país, la sexta causa de ceguera y la primera de enfermedad crónica renal (ECR), también el 31.5% de infartos cardíacos y el 25% de accidentes cerebro vasculares (ACV) ocurren en pacientes diabéticos (50). En el caso de Arequipa, casi el 7% de la población presenta diabetes tipo

2 y esta ciudad ocupa el segundo lugar en el Perú con el mayor número de personas diabéticas, después de Lima. (51)

### 1.2.2.1. Polifenoles y efecto en la diabetes tipo 2

Se han reportado diferentes mecanismos de acción por los cuales los compuestos fenólicos podrían disminuir los factores de riesgo de la diabetes tipo 2 (Fig. 4).

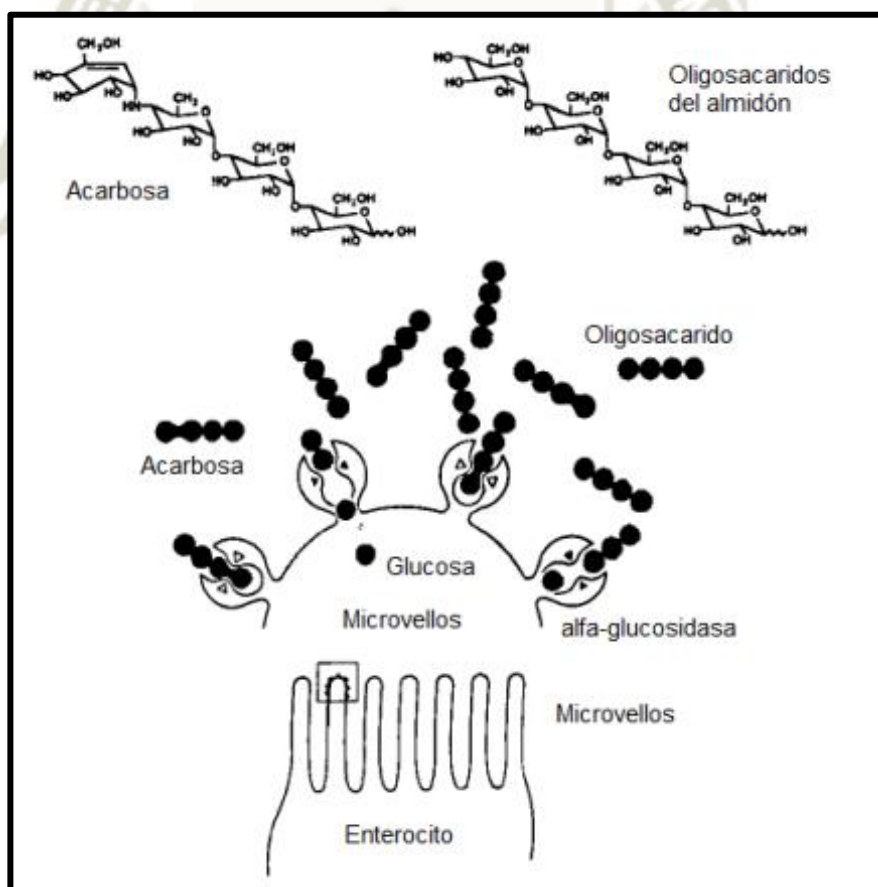


**Figura 4.-** Sitios potenciales de acción de los polifenoles de la dieta sobre el metabolismo de los carbohidratos y la homeostasis de la glucosa. (53)

Uno de ellos es a través de la inhibición de enzimas como las amilasas y glucosidasas en la luz intestinal; estas enzimas son importantes para la digestión de carbohidratos por lo que su inhibición por acción de los polifenoles de origen dietario limita la digestión de polisacáridos consumidos en la dieta, reduciendo así la absorción de azúcares simples. Esto podría constituir una importante estrategia para la prevención de la hiperglicemia a través de la dieta (52). Otro mecanismo es por medio del aumento de la

absorción del azúcar de la sangre en el tejido muscular y adiposo, controlando así la hiperglicemia. Los polifenoles también aumentan la actividad de la glucoquinasa hepática, promoviendo así la utilización de la glucosa para promover el almacenamiento de energía en forma de glucógeno, y suprimir la producción de glucosa hepática (glucogénesis). (53) Las células B se ven afectadas por la hiperglicemia (glucotoxicidad), contribuyendo al deterioro progresivo de la homeostasis de la glucosa característica de la diabetes tipo 2; en estos casos, se ha sugerido que los polifenoles protegerían las células B pancreáticas de la glucotoxicidad y mejoran la secreción de insulina, previniendo la diabetes tipo 2 al actuar sobre células excretoras de insulina. (53) (54)

- **Digestión de los carbohidratos en el organismo y acción de los inhibidores de glucosidasa**



**Figura 5.-** Diagrama esquemático de la hidrólisis enzimática de los oligosacáridos y la inhibición competitiva de la acarbosa. (57)

La  $\alpha$ -amilasa cataliza la hidrólisis de los enlaces internos de  $\alpha$ -1,4-glucano en polisacáridos que contienen 3 o más unidades de D-glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4, produciendo una mezcla de maltosa y glucosa (55). La  $\alpha$ -glucosidasa hidroliza los residuos terminales, no reductores de la  $\alpha$ -D-glucosa enlazados en 1,4, con la liberación de la  $\alpha$ -D-glucosa. Los enlaces  $\alpha$  1,2 y  $\alpha$  1,3 se dividen a un ritmo mucho más lento. (56)

Un inhibidor de estas enzimas es la acarbosa la cual es comúnmente utilizada como agente terapéutico para el control de la hiperglicemia a través de la inhibición de las enzimas glucósidos hidrolasas, en específico a las  $\alpha$ -glucosidasas ubicadas en el intestino delgado, y a las  $\alpha$ -amilasas pancreáticas; la acarbosa se une de manera competitiva a los sitios de unión de las enzimas, impidiendo así la unión y posterior hidrólisis enzimática de carbohidratos (Fig. 5). (57)

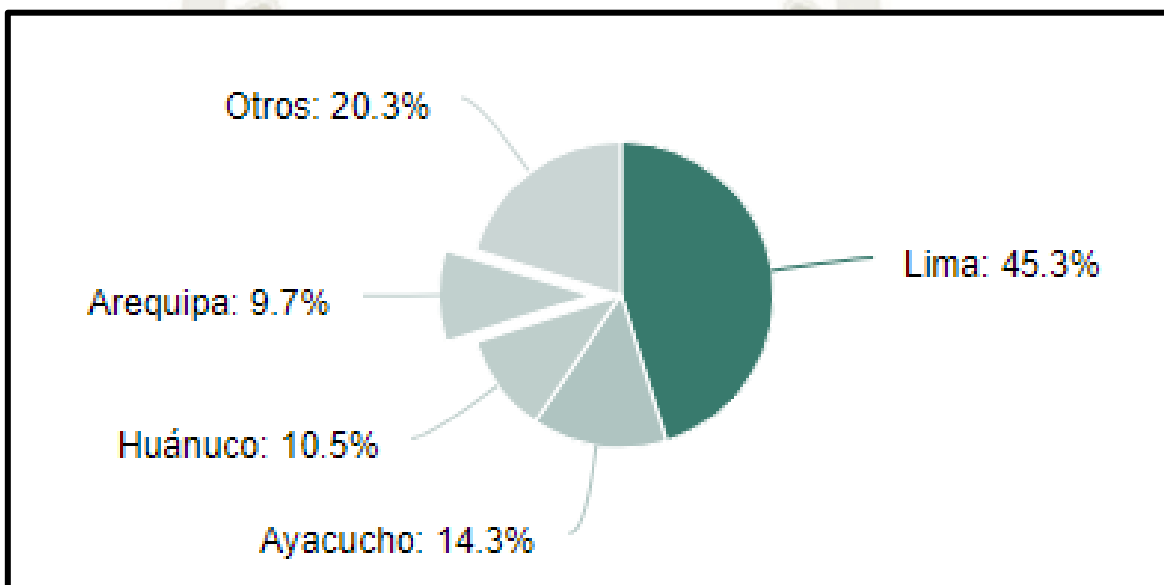
### 1.3. MAIZ MORADO (*Zea mays* L.)

El maíz es una planta oriunda de América, encontrando restos de este cereal en Canadá hasta el norte de Argentina. El maíz morado es el único en el mundo, que presenta la pigmentación morada tanto en los granos como en la coronta, esta pigmentación se debe a la presencia de las antocianinas, que constituyen un colorante natural de alta importancia en el campo de la medicina y en la industria de alimentos. En el caso del Perú, las diferentes variedades de este maíz provienen de la raza "Kulli" (negro en quechua). Esta raza se cruzó con otras de la zona, transfiriendo así sus colores característicos a las razas derivadas, como el San Jerónimo, Canteño, Huancavelicano, Piscoruto, Cuzco, Huayleño e Iqueño. (58) (59)

#### 1.3.1. Producción

De alta distribución en América Latina, donde principalmente crecen en los Andes del Perú y Bolivia; también pueden encontrarse cultivos en Colombia y Ecuador, pero no en gran cantidad. En el Perú el maíz morado se cultiva desde el nivel del mar hasta los 3000 msnm, donde se estima que se tienen alrededor de 5000 ha de este cultivo en el país; siendo las zonas de mayor concentración de cultivo las regiones de Arequipa, Lima, Huánuco, Cajamarca y Ayacucho. (60) (61) (62)

El Perú es un gran exportador de maíz morado, siendo la región de Arequipa una de las principales productoras del país, concentrando casi el 10% de la producción nacional (Fig. 6) (63) (64) (52) (65) (66). El maíz morado exportado desde el Perú tiene tres presentaciones: en mazorca y en polvo. En el 2018 se exportó en mazorca 869 653 kg. Los principales países importadores son Estados Unidos 79%, Corea del Sur 15%, Canadá 4% y otros 2%. (67)



**Figura 6.-** Producción a nivel nacional de maíz morado. (64)

Las diferentes zonas geográficas en donde se realice el cultivo del maíz morado, podrían influir en su composición en compuestos bioactivos y sus propiedades funcionales. Existe solo una investigación en el Perú donde se tomaron 18 muestras de maíz morado cultivado en diferentes localidades (Arequipa, Cajamarca, Canta, La Molina y Pacaran), realizando una comparación de la cantidad de antocianinas y polifenoles totales según su ubicación geográfica, concluyendo que la ubicación geográfica del cultivo afecta el porcentaje total de antocianinas y fenoles totales, siendo las muestras de Cajamarca las que tuvieron los mayores valores (68). Este es un tema que no se ha investigado en la región de Arequipa.

### 1.3.2. Clasificación Taxonómica.

El maíz se clasifica de la siguiente manera, según Takhtajan et al. (69)

**Reino:** Plantae

**División:** Angiospermae

**Clase:** Monocotiledónea

**Subclase:** Apetala

**Orden:** Poales

**Familia:** Poaceae

**Género:** *Zea*

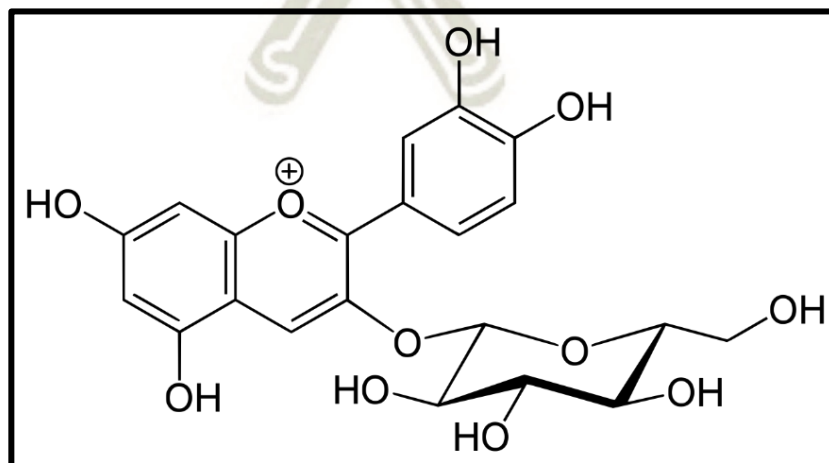
**Especie:** *Zea mays* L.

**Nombre común:** Maíz morado

### 1.3.3. Propiedades Bioactivas

El maíz morado es un alimento con alto contenido de antocianinas. Las antocianinas principales presentes en el maíz morado incluyen la cianidina-3-glucósido (C-3-G) (Fig. 7), pelargonidina-3-glucósido (Pg3-glu), peonidina-3-glucósido (Pn-3-glu) y sus derivados acilados formados cuando el azúcar se une a un radical acilo proveniente de ácidos orgánicos (alifáticos o aromáticos). (70).

En los últimos años se han realizado varios estudios *in vitro* y algunos *in vivo* en los cuales se ha investigado la bioactividad del maíz morado y sus posibles beneficios a la salud como capacidad antioxidante y efecto hipoglucémico. (71) (72)



**Figura 7.-** Cianidina-3-glucósido. (70)

Diversos estudios han mostrado que la C-3-G presenta actividad antiinflamatoria *in vivo*, proporcionando la base bioquímica para el uso potencial de fuentes ricas en C-3-G como un componente importante en el desarrollo de alimentos funcionales (73) (74). Asimismo, las antocianinas del maíz morado han presentado una mayor capacidad antioxidante *in vitro* que el arándano. (75)

En Tailandia, una investigación determinó la composición fitoquímica y el potencial contra la obesidad de extractos de seda del maíz morado centrándose en la interrupción del ciclo de vida de los adipocitos, comprobando que expresan una significativa actividad antiproliferativa y efectos antiobesidad (71). Otro estudio realizado en Japón propone que la disfunción de los adipocitos está fuertemente asociada con el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina, demostrándose que un extracto de maíz morado rico en C-3-G presentó una acción farmacológica única en adipocitos de rata aislados; por lo que las antocianinas de este tipo tuvieron implicaciones importantes para prevenir la obesidad y la diabetes (76). Otra investigación examinó si las antocianinas presentes en el maíz morado, principalmente la cianidina -3- glucósido y la cianidina -3- (6"- malonil glucósido) pueden atenuar la proliferación de células mesangiales y la acumulación de glucosa, principales características de glomeruloesclerosis diabética; se utilizaron cultivos de células renales humanas, se comprobó que los extractos de antocianinas provenientes del maíz morado detuvieron la fibrosis e inflamación mesangial asociada a la diabetes (77). Un estudio realizado en Japón estudió la capacidad antioxidante de las antocianinas del maíz morado y su efecto potenciador de la actividad superóxido dismutasa (SOD) en animales monogástricos, defensa antioxidante en rumiantes; se evaluó el efecto de la suplementación de un pigmento púrpura de maíz rico en antocianinas en las actividades antioxidantes de la sangre y la resistencia a la oxidación en 12 ovejas; resultando que la ingesta del pigmento de maíz morado aumentó la actividad de la SOD y el potencial de la actividad antioxidante del plasma en ovejas. (78)

El maíz morado también ha presentado otras propiedades bioactivas relevantes a la salud como potencial antiproliferativo y efecto cardioprotector en modelos *in vitro* e *in vivo*. (79) (80)

## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. LUGAR DE INVESTIGACION

El presente trabajo de investigación se realizó durante los meses de marzo del 2018 a enero del 2019, en el Laboratorio de Ciencia de Alimentos de la Vicerrectoría de Investigación (Pabellón F-404) de la Universidad Católica De Santa María.

#### 2.2. MATERIALES

##### 2.2.1. Obtención y Almacenamiento del Material Vegetal

El material vegetal utilizado correspondió a mazorcas completas de maíz morado (*Zea mays* L.) de la región de Arequipa. Se seleccionó una variedad de maíz morado (Canteño) y se recolectó aleatoriamente muestras (mazorcas) de 3 fundos o campos de cultivo de dos zonas geográficas. Las zonas geográficas seleccionadas correspondieron a los distritos de Iray y Chuquibamba (provincia de Condesuyos). Se consideró que un grupo de muestras de mazorcas de cada fundo o campo de cultivo corresponde a una réplica biológica.

Para efectos comparativos, se incluyó un grupo de muestras (4) procedentes de Corire (provincia de Castilla), ya que esta es la zona de mayor producción de maíz morado a nivel de la región Arequipa (64); sin embargo, en todos los casos se desconoce la variedad utilizada. La información de cada fundo junto con los códigos asignados a cada muestra se muestra en la Tabla 3.

Durante la colecta se recopiló información de las condiciones pre y post cosecha aplicadas al cultivo de cada muestra (Anexo 1). También se recogieron datos meteorológicos provistos por el Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (Senamhi) de las zonas de Chuquibamba y Corire, mas no de Iray, ya que el Senamhi no posee una sede en esta región (Anexo 2).

Las mazorcas colectadas estaban aún húmedas por lo que una vez trasladadas al laboratorio se secaron inmediatamente en una estufa con aire forzado a una temperatura de 42 °C por 3 días. (81) (82)

**Tabla 3.-** Lugar de colecta y código dispuesto para las muestras.

Provincia	Zona	Localidad / Distrito	Altura (m.s.n.m.)	Código	Lugar	Localización geográfica Latitud/ Longitud
Condesuyos	1	Chuquibamba	2768	CH-01	Huayra	15°50'20.7" S 72°38'33.4" W
			2759	CH-02	Huayra	15°50'53.5" S 72°38'33.6" W
			2896	CH-03	Chiringay	15°48'59.6" S 72°38'33.3" W
	2	Iray	2249	IR-01	Puyara	15°51'54.7" S 72°37'7.4" W
			2337	IR-02	Huychara	15°50'34.2" S 72°38'9.3" W
			1712	IR-03	Pacaychare	15°53'43.2" S 72°34'10" W
Castilla	3*	Corire	310	CO-01	Torán	16°21'04" S 72°28'34" W
			532	CO-02	Querulpa	16°09'40" S 72°29'17" W
			429	CO-03	Corire	16°13'24" S 72°28'16" W
			1570	CO-04	Maran	15°22'38" S 73°17'32" W

\* Incluida para efectos comparativos. Zona de mayor producción en Arequipa.

### 2.2.2. Insumos y Reactivos Químicos

- 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (N1377-5G) (Merck).
- ABTs (2,2-azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) 98% (Sigma-Aldrich).
- Acarbosa 95% (Merck).
- Acetona p.a. (Merck).
- Ácido Clorhídrico fumante 37% (Merck).
- Almidón p.a. (Merck).
- Difosfato de Sodio ACS (Merck).
- DNS (ácido dinitrosalicílico) 98% (Sigma-Aldrich).
- DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrasil) 98% (Sigma-Aldrich).

- Etilo acetato p.a. (Merck).
- Fosfato Dipotásico p.a. (Merck).
- Fosfato Disódico p.a. (Merck).
- Fosfato Mono potásico p.a. (Merck).
- Hidróxido de Sodio p.a. (Merck).
- Metanol p.a. (Merck).
- Persulfato de Potasio p.a. (Merck).
- Trolox (6 – hidroxí - 2, 5, 7, 8 –tetrametilcroman–2- ácido carboxílico) 97% (Sigma-Aldrich).

### **Enzimas**

- $\alpha$ -amilasa pancreática (Type VI-B,  $\geq 10$  unid/mg; Sigma, A3176-10 MU) Número EC 232-565-6.
- $\alpha$ -glucosidasa de levadura (Sigma, G5003-100UN) Número EC 232-604-7.

### **2.2.3. Material de Laboratorio**

- Columnas SPE 6 ml Thermo Scientific™ HyperSep™ Verify-CX
- Frascos ámbar.
- Matraz aforado de 5, 10 y 500 ml.
- Micropipetas de 0.2-20  $\mu$ l, 20-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l y 500-5000  $\mu$ l.
- Microplacas (transparente) 96 pocillos de 400 $\mu$ l c/u.
- Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 ml.
- Probetas de 10, 50, 100 y 500 ml.
- Tamiz de 500  $\mu$ m.
- Tubos de centrífuga 15 y 50 ml.
- Tubos de ensayo de 25 ml.
- Tubos de microcentrífuga 2 ml.
- Vasos de precipitado 50 y 250 ml.

### **2.2.4. Equipos e Instrumentación**

- Agitador magnético (ASHA serie, A & amp, China).
- Agitador orbital (SK-O330-Pro, SCIOLOGEX, EEUU).
- Balanza analítica (Explorer® Analítica, OHAUS, EEUU).

- Bomba al vacío (2546, Welch, Alemania)
- Campana extractora (FHI800(P), BIOBASE, EEUU).
- Centrífuga (RH5A/RH5, RongHua, China).
- Cocina eléctrica (Dinamic Inox Duo - MGF: 8022, Magefesa, EEUU).
- Equipo Manifold (60103-351, Thermo Scientific™, EEUU)
- Espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific, EEUU).
- Estufa de secado (OMS60 / OMS100, Heratherm General Protocol Ovens, EEUU).
- Lector de microplacas (DIAREader ELX800G, DIALAB, EEUU).
- Molinillo (MKM6003, Bosch, Alemania).
- Molino (Nutribullet 600 series, Magic Bullet, EEUU).
- Molino manual (WF2541, Wolfbox, EEUU).
- Potenciómetro (HI 3220, HANNA Instruments, Italia).
- Rotavapor con baño maría y bomba de vacío (Rotavapor® R-100, Buchi, Alemania).
- Selladora (PFS-300, Chen-he Machine, China).
- Sistema de producción de agua ultrapura (Simplicity®, MERK, EEUU).
- Vortex (WIZARD IR Infrared Vortex Mixer, Velp Scientifica, Italia).

## 2.3. MÉTODOS

### 2.3.1. Metodología de preparación de muestras y extracción

#### 2.3.1.1. Preparación de muestra

Los granos y los marlos secos se molieron en diferentes condiciones. Los marlos se trituraron primero con un molino manual para luego ser pulverizados en un molinillo eléctrico, se procedió al tamizado y almacenamiento en bolsas de polietileno de alta densidad en oscuridad a -18°C. Los granos por otro lado se molieron directamente en un molinillo eléctrico, se tamizaron y las harinas se almacenaron en iguales condiciones que los marlos.

### **2.3.1.2. Extracción de la fracción fenólica libre**

Se pesaron 5 y 1 g de harina de grano y marlo de maíz morado, respectivamente, luego se adicionaron 20 ml de solución de metanol: acetona: agua (45:45:10 v/v/v) acidificado con 0.1% de HCl p.a. y la mezcla fue llevada a un agitador orbital a 200 rpm durante 1 h a temperatura ambiente y protegidos de la luz, la mezcla luego fue centrifugada a 4000 rpm durante 15 min y se separó el sobrenadante; se reextrajo dos veces más para la muestra de marlo y una vez más para el caso del grano. Los sobrenadantes en ambos casos (marlo y grano) se juntaron y se concentraron al vacío hasta sequedad en un rotavapor a 180 rpm a 45 °C. Los compuestos fenólicos de la fracción libre fueron resuspendidos con 10 ml de agua ultra pura. (83)

### **2.3.1.3. Extracción de la fracción fenólica ligada**

Se pesaron 0.5 g y 0.1 g de harina de grano y marlo de maíz morado, respectivamente. Se procedió a adicionar 2 ml de solución de metanol: acetona: agua (45:45:10 v/v/v) acidificado con 0.1% de HCl p.a. y se procedió de la misma forma que en el punto 3.1.2. Se descartó la fracción fenólica libre y se conservó el pellet (fracción insoluble). El residuo se mezcló con 20 ml de NaOH 3N y se procedió con la hidrólisis alcalina por 88 min a temperatura ambiente en un agitador orbital a 200 rpm. La suspensión fue acidificada con HCl hasta un pH aproximado de 2.5-3. La solución final fue extraída seis veces con 10 ml acetato de etilo, separando luego de cada extracción la fracción orgánica (acetato de etilo) por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, finalmente las fracciones de acetato de etilo se juntaron y se concentraron al vacío a 45°C a sequedad. La fracción fenólica ligada se resuspendió en 5 ml de agua ultra pura. (83)

## **2.3.2. Métodos de Análisis**

### **2.3.2.1. Determinación de Humedad**

Se determinó el contenido de humedad de las muestras para poder expresar los resultados de los parámetros evaluados en base seca. Para esto se empleó el método de la A.O.A.C. a través del uso de una estufa con aire forzado hasta

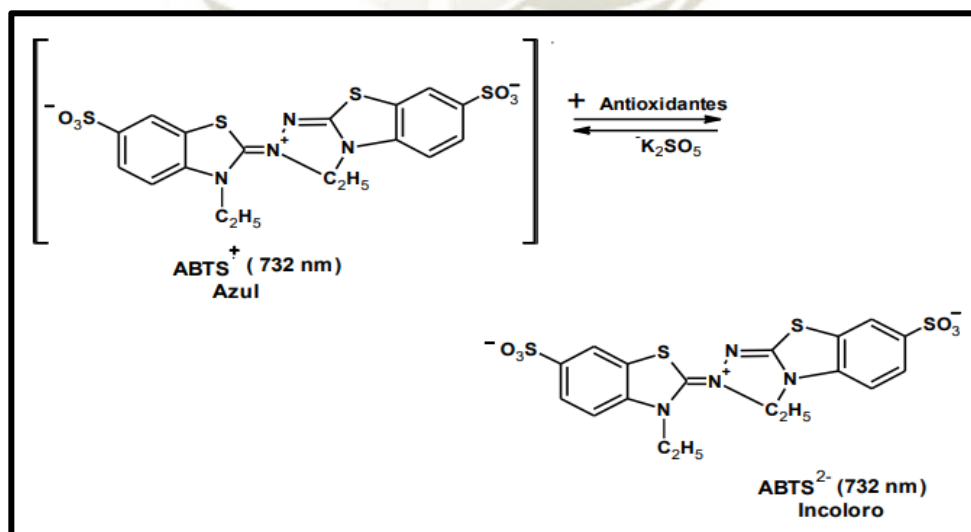
peso constante. Los resultados se expresaron en porcentaje (%) peso/peso.  
(84)

### 2.3.2.2. Capacidad antioxidante

- **Inhibición del radical ABTS●+**

La generación del radical ABTS●+ es uno de los métodos espectrofotométricos más utilizados para medir la actividad antioxidante de diferentes soluciones. La manera más apropiada de realizar este ensayo consiste en la técnica de decoloración, donde el radical se forma de manera estable antes de su reacción con los antioxidantes. (85)

El método consiste en la formación directa del cromóforo ABTS●+ (verde-azul), a través de la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ). Este cromóforo presenta tres máximos de absorbancia a las longitudes de onda de 645nm, 734nm y 815nm. Los antioxidantes reducen al radical preformado a ABTS. De este modo el grado de decoloración representa el porcentaje de inhibición del radical catión ABTS●+ (Fig. 8), determinado en función al tiempo y la concentración, utilizando como estándar al Trolox (análogo de la vitamina E) en las mismas condiciones. (85) (86)



**Figura 8.-** Estructura del ABTS●+ antes y después de la reacción con el antioxidante. (85)

### Procedimiento

El procedimiento se desarrolló según Pérez-Jiménez et al (87). Se preparó la solución madre de ABTS, pesando primero 16.8 mg de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) y 96 mg de ABTS para luego disolver ambos en 25 ml de agua destilada; se dejó en agitación constante por 16 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Por último, se deja en refrigeración con un tiempo máximo de uso de 2 semanas.

La solución de trabajo se preparó al momento, diluyendo la solución madre con metanol hasta obtener una Absorbancia igual a  $0.700 \pm 0.002$ .

Se preparó una curva estándar de Trolox utilizando un rango de concentraciones desde 50 a 600  $\mu M$ , esta fue preparada en cada corrida de análisis.

En cubetas de 5 ml se agregó primero 100  $\mu l$  de la muestra, luego se adicionó 3.9 ml de la solución de trabajo y se dejó en incubación durante 6 min en oscuridad. La medición se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm. Se corrió un control bajo las mismas condiciones utilizando en lugar de la muestra, metanol.

Se determinó el porcentaje (%) de inhibición con la siguiente ecuación:

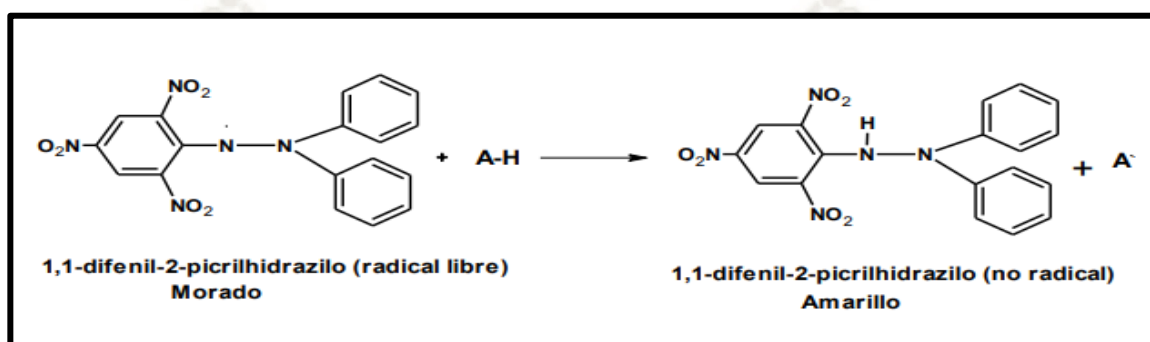
$$\% \text{Inhibición} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{Abs_{control}} * 100 \quad (\text{ec. 1})$$

Los resultados fueron expresados como  $\mu$ moles Equivalentes de Trolox (ET)/ 100 g de muestra en base seca (bs), utilizando una curva estándar de Trolox.

- **Inhibición del radical DPPH**

La molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrasil) se conoce por ser un radical libre estable por la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo tanto, la molécula no se dimeriza, como es el caso en la mayoría de radicales libres. Esta deslocalización del electrón provoca también la intensificación del color violeta de este

cromóforo, la cual presenta una absorbancia a 517 nm en presencia de metanol. La solución de DPPH al entrar en contacto con el sustrato antioxidante pierde su color violeta, ya que este le dona un átomo de hidrógeno a la misma (Fig. 9). Este cambio de color se monitorea de manera espectrofotométrica para determinar las propiedades antioxidantes de los sustratos. La mayoría de estudios donde se utiliza este ensayo determinó como tiempo de reacción de 20-30 min. (85) (86)



**Figura 9.-** Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante. (85)

### Procedimiento

El procedimiento se desarrolló según Pérez-Jiménez et al. (87). Se preparó la solución madre de DPPH, pesando primero 12.5 mg de DPPH, para disolver en 100 ml de metanol; se dejó en agitación suave y protegido de la luz hasta disolución. Por último, se deja en refrigeración con un tiempo máximo de uso de 2 semanas. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución madre con metanol a 2.5 mg/100 ml.

Se preparó una curva estándar de Trolox utilizando un rango de concentraciones desde 50 a 600  $\mu$ M, esta fue preparada en cada corrida de análisis.

En cubetas de 5 ml se agregó primero 100  $\mu$ l de la muestra, luego 3.9 ml de la solución de trabajo, se dejó en incubación durante 25 min en oscuridad. La medición se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. Se corrió un control bajo las mismas condiciones utilizando en lugar de la muestra, metanol.

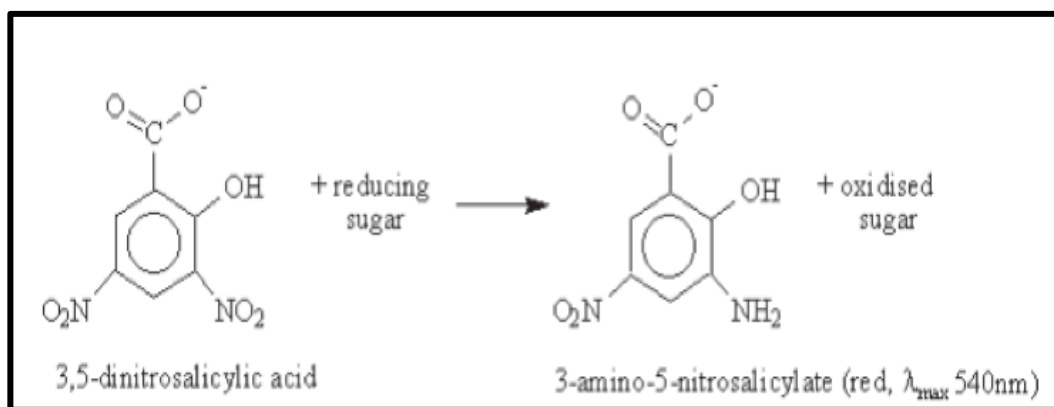
Se determinó el porcentaje (%) de inhibición con la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{Abs_{control}} * 100 \quad (\text{ec. 2})$$

Los resultados fueron expresados como  $\mu$ moles Equivalentes de Trolox (ET)/ 100 g de muestra en base seca (bs), utilizando una curva estándar de Trolox.

### 2.3.2.3. Inhibición *in vitro* de la enzima $\alpha$ -amilasa

Este método está basado en la disminución de la hidrólisis enzimática produciendo una pérdida de color del compuesto reactante (DNS), la cual es correlacionada de forma proporcional a la presencia de compuestos fenólicos u otros compuestos inhibidores presentes en los extractos de estudio. Se utilizó el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) para la detección de azúcares reductores formados a partir de la hidrólisis del almidón por la acción de la  $\alpha$ -amilasa. El procedimiento se basa en una reacción redox, donde el azúcar reductor se oxida a causa del DNS, provocando su propia reducción endotérmica en el proceso (Fig. 10). Esta reacción es colorimétrica, ya que el DNS es de color amarillo, mientras que el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico resultante de la reacción posee un color rojo pardo oscuro, cuya intensidad depende de la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Al finalizar la reacción se hace la lectura por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. (88)



**Figura 10.-** Oxidación de azúcares reductores por la acción del DNS. (88)

### Procedimiento

El procedimiento se realizó según lo indicado por Worthington V. et al. (55) y modificado por Gonzales A. et al. (1). Se dejó incubar 500 µl de cada extracto de las muestras de maíz morado y 500 µl de la enzima α-amilasa (0.5 mg/ml) contenida en buffer fosfato de sodio 0.02 M (pH 6.9 con NaCl 0.006 M) a temperatura ambiente durante 10 minutos en un tubo de ensayo. Luego se añadió 500 µl de una solución de almidón al 1% en buffer fosfato de sodio 0.02 M (pH 6.9 con NaCl 0.006 M) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente se agregó 1 ml del reactivo de color DNS y las muestras se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. La mezcla se diluyó con 15 ml de agua destilada, se mezcló bien y se midió la absorbancia a 540 nm. También se registró la absorbancia de un blanco de muestra (buffer en lugar de la solución enzimática) y de un control (buffer en lugar del extracto de muestra). La absorbancia a trabajar se obtuvo al restar la absorbancia del blanco de muestra a las lecturas de absorbancia de las muestras. Los resultados se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

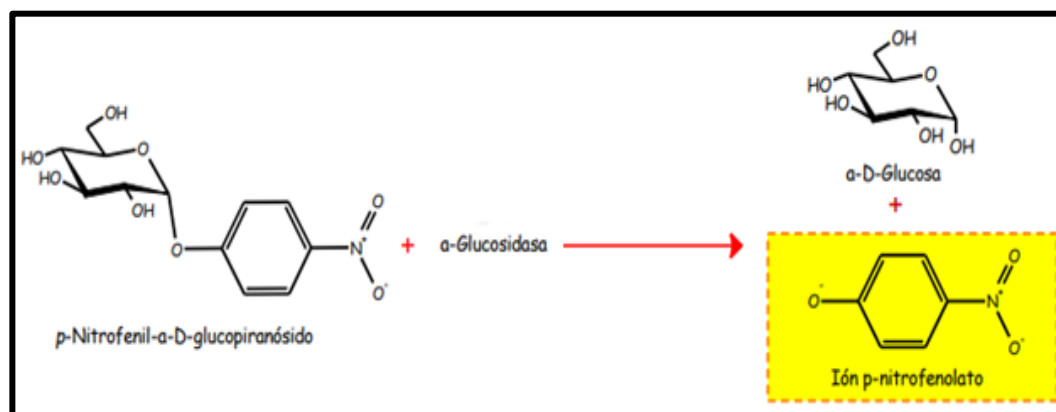
$$\%Inhibición = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{Abs_{control}} * 100 \quad (ec. 3)$$

Los resultados se expresaron como % de inhibición por mg de muestra y se evaluó si existió dosis dependencia a 3 diferentes cantidades de muestra (mg).

#### **2.3.2.4. Inhibición *in vitro* de la enzima α-glucosidasa**

Este método consiste en la inhibición de la hidrólisis enzimática del sustrato sintético p-NFGP (p-nitrofenil-α-D-glucopiranosido), que por la acción de la α-glucosidasa libera unidades de p-nitrofenolato y α-D-glucosa (Fig. 11). El ión p-nitrofenolato presenta una coloración amarillo claro, lo que indica que la hidrólisis enzimática se ha producido. La disminución de esta hidrólisis resulta en la pérdida de color, la cual se atribuye de forma proporcional a la

presencia de compuestos inhibidores como los compuestos fenólicos u otros presentes en los extractos de estudio. (56) (89)



**Figura 11.-** Hidrólisis enzimática del p-nitrofenil-D glucopiranosido por acción de la α-glucosidasa. (89)

### Procedimiento

El procedimiento se realizó según lo indicado por Worthington V. et al. (56) y modificado por Gonzales A. et al. (1). En una microplaca de 96 pozos se dejó incubar 50 µl de extracto de cada muestra de maíz morado (o sus respectivas diluciones) con 50 µl de buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.9) y 100 µl de la enzima α-glucosidasa (1.0 U/ml) preparada en buffer de fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.9) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se añadió 50 µl de la solución de p-NFGP a 5mM en buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.9) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se registraron las absorbancias en un lector de microplacas antes y después (a tiempo 0 y a los 5 minutos) de la incubación a 405 nm y se las comparó con un control que contenía 50 µl de buffer en lugar del extracto. Los resultados se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{(Abs_{control} - Abs_{muestra})}{Abs_{control}} * 100 \quad (ec. 4)$$

Para los cálculos, las absorbancias del tiempo 0 se restaron a las del tiempo 5 min. Los resultados se expresaron como % de inhibición por

mg de muestra y se evaluó si existió dosis dependencia a 3 diferentes cantidades de muestra (mg).

### 2.3.3. Análisis Estadístico

Para observar si hubo diferencias significativas en las propiedades evaluadas de las muestras procedentes de Iray y Chuquibamba se realizó un análisis estadístico con la prueba “t” de student para medidas de dos muestras emparejadas, a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) usando el programa Statgraphics Centurion (XV) 16.1.15.



## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. ANALÍISIS DE HUMEDAD

En la tabla 4 se puede apreciar el contenido de humedad de las muestras recolectadas en las diferentes zonas geográficas de Arequipa. Se determinó el contenido de humedad para así poder expresar los resultados de los diferentes análisis en base seca. La humedad estuvo en todos los casos por debajo del valor recomendado que aseguran una adecuada estabilidad de los granos secos para su almacenamiento (15 %). (84)

**Tabla 4.-** Contenido de humedad de las muestras de maíz morado evaluadas.

Variedad	Zona	Contenido de humedad (%)	
		Marlo	Grano
Canteño	Chuquibamba*	5.855 ± 0.504	9.262 ± 0.653
	Iray*	7.423 ± 1.225	10.547 ± 1.395
Desconocida	Corire**	5.882 ± 1.030	10.738 ± 0.356

\*n=3, \*\*n=4

Los contenidos de humedad obtenidos podrían ser menores a los recomendados a causa de los tratamientos a los que son sometidas las muestras utilizadas.

#### 3.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados de capacidad antioxidante determinada por el método de inhibición del radical ABTS de las fracciones fenólicas libres y ligadas de las muestras de marlo y grano de maíz morado de diferentes zonas geográficas de cultivo se presentan en las tablas 5 y 6; mientras que los resultados obtenidos por el método de inhibición del radical DPPH se presentan en las Tablas 8 y 9. Se incluyó la zona de Corire para efectos comparativos en todos los casos.

##### 3.2.1. Inhibición del radical ABTS

En el Anexo 7 se presentan los resultados obtenidos de todas las repeticiones de cada zona trabajada, donde se aprecia como los valores obtenidos varían entre cada fundo de donde se recogieron las muestras, esto se podría explicar debido que, a pesar de que las muestras sean procedentes de una misma zona geográfica, hay más variables que afectan el crecimiento y desarrollo de estas muestras,

como lo es el tipo de suelo o los tratamientos a los que se someten los cultivos (90). En el Anexo 8 se muestra la curva de calibración que fue utilizada finalmente para obtener los valores de  $\mu$ moles Equivalentes de Trolox.

Según las tablas 5 y 6 se puede apreciar que la fracción libre presentó los mayores valores de capacidad antioxidante respecto a las fracciones fenólicas ligadas. Siendo aproximadamente 3 veces mayor en comparación con la fracción ligada. Esto podría relacionarse con la composición fenólica de la fracción libre, la cual está principalmente constituida por antocianinas; Pedreschi R. et al. (91), Aoki H. et al. (92) y Yang Z. et al. (93) reportaron que la fracción fenólica libre del maíz morado de origen peruano es rica en antocianinas del tipo cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido, y la capacidad antioxidante medida por diferentes métodos *in vitro* se correlacionó significativamente por la presencia de antocianinas, siendo esta propiedad mayor en las fracciones fenólicas libres. Sin embargo, en maíces con pigmentación de grano más claros se observó que la mayor capacidad antioxidante se encontraba en las fracciones fenólicas ligadas (94) (1). En otros casos como el grano de mijo, también la mayor concentración de polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos) se encontró en la fracción ligada. (95)

Asimismo, al comparar los resultados de las Tablas 5 y 6, se observa que la capacidad antioxidante fue mayor en los marlos que en los granos. Monroy Y. et al. (96) evaluó la composición fenólica y algunas propiedades funcionales en el marlo y grano de maíz morado de origen peruano y encontró que el marlo tuvo una cantidad de 63.09 mg C3G (equivalentes de cianidina-3-glucósido/g bs (base seca)), mientras que el grano presentó 12 mg C3G/g bs. Esto podría explicar la mayor capacidad antioxidante del marlo encontrado en la presente investigación.

Hosada K. et al. (78), Mazewska C. et al. (79) y Petroni K. et al (80) reportaron que la cianidina-3-glucósido, la mayor antocianina encontrada en el maíz morado, presentó una alta capacidad antioxidante al utilizar modelos *in vitro* e *in vivo*, siendo esta una posible razón por la cual según diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo continuo de alimentos con altos contenidos de antocianinas podría disminuir los factores de riesgo de las

ECNT asociadas al estrés oxidativo, sin embargo, los estudios en ensayos clínicos aún son escasos.

En relación a las diferencias de los resultados por zona geográfica de cultivo, se observó, según el Anexo 9 que existieron diferencias significativas en los resultados de capacidad antioxidante del marlo y grano, siendo las muestras procedentes de Chuquibamba las que presentaron los mayores valores respecto a las muestras de Iray tanto en la fracción fenólica libre, ligada y total.

**Tabla 5.-** Capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre ABTS del marlo de maíz morado ( $\mu\text{moles ET}/100 \text{ g bs}$ ).

ZONA	Fracción fenólica libre	Fracción fenólica ligada	TOTAL
Iray*	20909.274 $\pm$ 2923.826 <sup>a</sup>	9000.293 $\pm$ 486.265 <sup>a</sup>	29909.567 $\pm$ 2927.340 <sup>a</sup>
Chuquibamba*	27564.585 $\pm$ 1674.677 <sup>b</sup>	9737.305 $\pm$ 600.038 <sup>a</sup>	37301.890 $\pm$ 1147.010 <sup>b</sup>
Corire**	19722.021 $\pm$ 3042.250	8558.682 $\pm$ 344.420	28280.703 $\pm$ 3335.131

\*n=3, \*\*n=4. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 6.-** Capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre ABTS del grano de maíz morado ( $\mu\text{moles ET}/100 \text{ g bs}$ ).

ZONA	Fracción fenólica libre	Fracción fenólica ligada	TOTAL
Iray*	3546.886 $\pm$ 148.965 <sup>a</sup>	1372.385 $\pm$ 21.502 <sup>a</sup>	4919.271 $\pm$ 134.151 <sup>a</sup>
Chuquibamba*	4076.321 $\pm$ 501.329 <sup>b</sup>	1462.852 $\pm$ 28.099 <sup>b</sup>	5539.173 $\pm$ 473.815 <sup>b</sup>
Corire**	2729.936 $\pm$ 134.348	1281.513 $\pm$ 51.462	4011.449 $\pm$ 129.363

\*n=3, \*\*n=4. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

En el caso de las muestras (grano y marlo) de la región de Corire, la cual fue incluida para efectos comparativos, se puede observar que en todos los casos se obtuvieron valores menores a los presentados por las muestras de Iray y Chuquibamba en las fracciones fenólicas libres y ligadas, esto podría deberse a que las muestras de esta zona tendrían una menor cantidad de polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos) en sus fracciones fenólicas libres y ligadas y

por lo tanto no presentan una mayor acción sobre el radical libre ABTS respecto a las muestras de las otras zonas geográficas, sin embargo más investigaciones son necesarias para comprobar esta premisa.

En la tabla 7 se presentan los resultados de capacidad antioxidante *in vitro* total por el método de inhibición del ABTS obtenidos en la presente investigación y las reportadas por otros autores para maíz morado, negro o con otro tipo de pigmentación, también se muestran las procedencias de las muestras y la parte de la mazorca evaluada (grano/marlo).

Los valores obtenidos en el estudio actual son generalmente mayores a los encontrados en diferentes investigaciones internacionales tanto en marlo y grano de maíz morado. Adicionalmente, se observa que la capacidad antioxidante del maíz morado es mayor al encontrado en maíz de pigmentaciones más claras. Esto se explicaría posiblemente a que las muestras evaluadas presentan mayores contenidos de polifenoles que las analizadas en las otras investigaciones. Además del origen, diversos factores como la variedad (factores genéticos), las condiciones agroclimáticas de cultivo, condiciones de manejo pre y post cosecha y posibles diferencias en los métodos de análisis podrían explicar estas diferencias.

**Tabla 7.-** Capacidad antioxidante total (libre+ligada) ( $\mu$ moles ET/100 g bs) por el método de inhibición del radical ABTS de maíz de diferentes procedencias en comparación con los resultados del estudio actual.

Procedencia	Marlo	Grano	Color de grano	Referencia
Iray	29909.567	4919.271	Morado	Estudio actual
Chuquibamba	37301.890	5539.173	Morado	Estudio actual
Corire (Perú)	28280.703	4011.449	Morado	Estudio actual
Serbia	No reporta	3600.000	Azul claro	(97)
Perú	No reporta	9456.370	Morado	(94)
Tailandia	9460.000	No reporta	Morado	(98)
Chile	No reporta	2362.700	Amarillo	(72)
India	No reporta	1787.600	Amarillo	(99)

### 3.2.2. Inhibición del radical DPPH

En el Anexo 10 se muestran los valores obtenidos de todos los fondos trabajados, al igual que en el punto anterior se observa la diferencia que existe entre las réplicas biológicas. El Anexo 11 se tiene la curva de calibración utilizada en este caso.

Similar a lo observado con el método de inhibición del ABTS, las fracciones fenólicas libres presentaron los mayores valores de capacidad antioxidante con respecto a la fracción fenólica ligada utilizando el método de inhibición del radical DPPH (Tablas 8 y 9). En algunos casos, la diferencia fue 4 veces mayor a los valores de la fracción ligada. Esto podría explicarse por la alta concentración de antocianinas de la fracción fenólica libre como ha sido reportado por diferentes autores, las cuales estarían contribuyendo significativamente a la capacidad antioxidante in vitro. (91) (92) (93)

Al comparar las tablas 8 y 9 se aprecia que los valores de marlo son mayores a los obtenidos con las muestras de grano. Diferentes estudios han presentado que existe una mayor concentración de polifenoles, sobre todo antocianinas, en la composición del marlo del maíz morado respecto al grano, como se mencionó en el punto 2.1. (96). Lo que explicaría la mayor capacidad antioxidante del marlo respecto al grano.

De acuerdo a lo presentado en el Anexo 12, existieron diferencias significativas en la capacidad antioxidante del marlo (fracción libre y ligada) por efecto de la zona geográfica de procedencia, siendo las muestras procedentes de Chuquibamba las que presentaron los mayores valores respecto a las muestras de Iray tanto en las fracciones fenólicas libres, ligadas y total.

**Tabla 8.-** Capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre DPPH del marlo de maíz morado ( $\mu$ moles ET/100 g bs).

ZONA	Fracción fenólica libre	Fracción fenólica ligada	TOTAL
Iray*	5068.642 $\pm$ 1647.556 <sup>a</sup>	1929.962 $\pm$ 371.942 <sup>a</sup>	6998.604 $\pm$ 1481.794 <sup>a</sup>
Chuquibamba*	7163.493 $\pm$ 567.216 <sup>b</sup>	2319.727 $\pm$ 49.234 <sup>b</sup>	9483.220 $\pm$ 576.452 <sup>b</sup>
Corire**	4754.578 $\pm$ 568.648	1839.709 $\pm$ 184.689	6594.287 $\pm$ 651.697

\*n=3, \*\*n=4. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 9.-** Capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre DPPH del grano de maíz morado ( $\mu$ moles ET/100 g bs).

ZONA	Fracción fenólica libre	Fracción fenólica ligada	TOTAL
Iray*	906.290 $\pm$ 15.303 <sup>a</sup>	274.709 $\pm$ 44.245 <sup>a</sup>	1180.999 $\pm$ 59.474 <sup>a</sup>
Chuquibamba*	1677.551 $\pm$ 28.679 <sup>a</sup>	306.958 $\pm$ 8.429 <sup>b</sup>	1984.509 $\pm$ 32.354 <sup>b</sup>
Corire**	886.867 $\pm$ 301.219	239.290 $\pm$ 37.147	1126.157 $\pm$ 330.640

\*n=3, \*\*n=4. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

En la tabla 10 se representan los resultados de la capacidad antioxidante *in vitro* total obtenida por el método de inhibición del DPPH de la presente investigación comparándolos con aquéllos reportados por otros autores para maíz morado y otros tipos de maíz. Los resultados obtenidos en la presente investigación son mayores en el caso de marlo a los reportados por otros autores y comparables para el caso de los resultados del grano, y al igual que lo explicado para lo observado con el método de inhibición del ABTS, las muestras evaluadas posiblemente presenten mayores concentraciones de polifenoles como antocianinas u otros flavonoides en el marlo respecto a las muestras de otras investigaciones. Además, otros factores relacionados a las diferentes condiciones agroclimáticas del cultivo del maíz, la variedad, el origen, entre otros podrían explicar estas diferencias.

Al analizar todos los resultados obtenidos por ambos métodos, las fracciones fenólicas libres de las muestras de maíz morado presentaron mayores valores de capacidad antioxidante que las fracciones fenólicas ligadas y esta propiedad *in vitro* fue mayor en el marlo que en el grano, lo anterior esté posiblemente relacionado con las diferencias en la composición y concentración de compuestos fenólicos, en especial de antocianinas como fue explicado previamente. Además, as muestras de maíz morado (grano y marlo) procedentes de la región Chuquibamba presentaron los mayores valores de inhibición del radical ABTS y DPPH que las muestras procedentes Iray y la zona de referencia (Corire).

**Tabla 10.-** Valores de capacidad antioxidante total (libre+ligada) ( $\mu$ moles ET/100 g bs) por el método de inhibición del radical DPPH de maíz de diferentes procedencias en comparación con los resultados del estudio actual.

Procedencia	Marlo	Grano	Color de grano	Referencia
Iray	6998.604	1180.999	Morado	Estudio actual
Chuquibamba	9483.220	1984.509	Morado	Estudio actual
Corire (Perú)	6594.287	1126.157	Morado	Estudio actual
Serbia	No reporta	2700.000	Azul claro	(97)
Perú	3750.000	987.400	Morado	(96)
India	No reporta	1500.000	Morado	(100)
China	No reporta	1003.000	Amarillo	(95)
India	No reporta	1577.000	Amarillo	(72)

En el Anexo 2 se presentan las diferentes condiciones climáticas que fueron proporcionadas por el SENAMHI de las provincias de Condesuyos (Chuquibamba) y Aplao (Corire) durante el período de cultivo de maíz morado de las muestras evaluadas. No se encontraron mayores diferencias en los parámetros como: humedad relativa, precipitación total mensual, temperatura máxima, temperatura mínima y velocidad del viento. Sin embargo, se observa que los valores de las temperaturas máximas alcanzadas en la provincia de Aplao (Corire) (9.9 – 30.4 °C) fueron mayores que aquellas presentadas en la provincia de Condesuyos (Chuquibamba) (4.3 – 18.8 °C) (Anexo 2). Leguizamón G. et al. (101) y Mori K. et al. (102) explican que la temperatura influye en la síntesis de flavonoides, ya que temperaturas mayores a los 30 °C se promueve la inhibición de distintas enzimas involucradas en la síntesis de antocianinas (fenilalanina amoniaco liasa (PAL), UDP-glucosa: flavonoide-3-O- glucotransferasa (UFGT), chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (F3H), dihidro flavonol 4-reductasa (DFR), leucoantocianidin dioxigenasa (LDOX), entre otras); en el trabajo de Mori K. et al. (102) se obtuvieron valores más altos de antocianinas totales en las muestras de uva que fueron cultivadas en regiones donde la temperatura máxima no sobrepasó los 15°C, a comparación de las muestras que fueron cultivadas en regiones con temperaturas mayores a 30 °C.

En la presente investigación, posiblemente las mayores temperaturas alcanzadas en la región de Corire se relacione con la inhibición parcial de la síntesis de

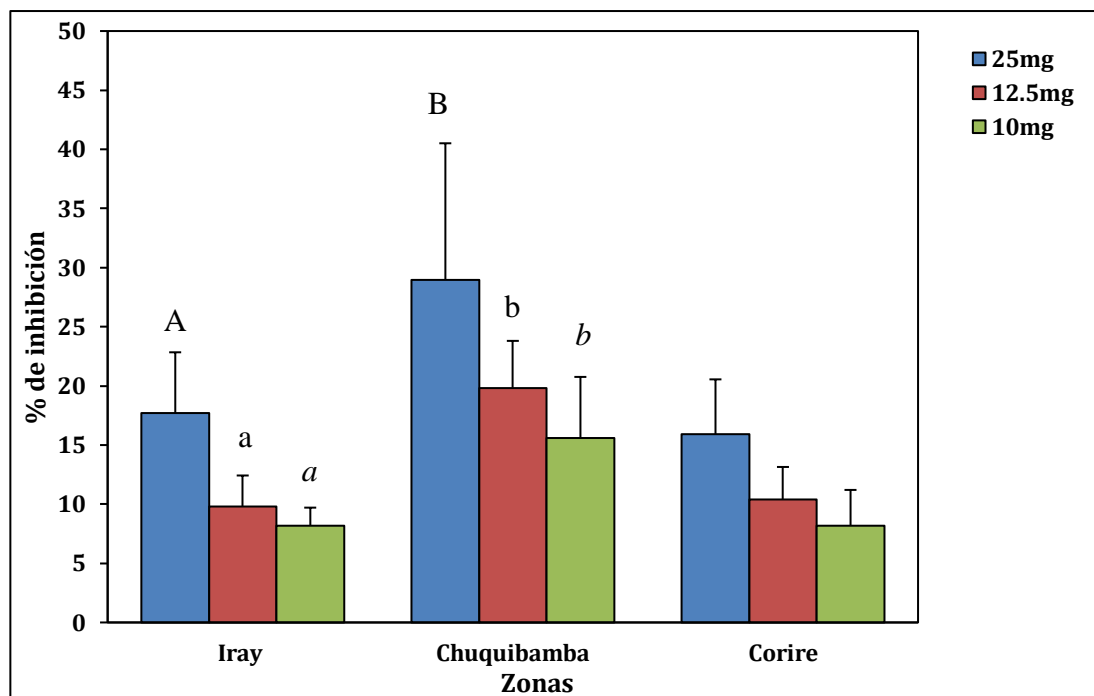
antocianinas y otros compuestos fenólicos lo que explicaría la menor capacidad antioxidante *in vitro* en el maíz morado cultivado en esta zona respecto a los valores encontrados en el maíz morado de las zonas de mayor altura como Iray y Chuquibamba. En otras investigaciones, se ha reportado que la mayor radiación relacionada con zonas geográficas localizadas a mayor altura induce una mayor biosíntesis de antocianinas, por lo que este factor también podría explicar las diferencias encontradas en la capacidad antioxidante de las muestras evaluadas según su procedencia (21) (103). Serían necesarias investigaciones a futuro en condiciones controladas de cultivo para determinar exactamente los factores agroclimáticos que expliquen tales diferencias.

### 3.3. INHIBICIÓN *IN VITRO* DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA

De la misma forma que se observa en los casos anteriores, en los resultados por fundo de recolección de la muestra se muestran diferentes entre sí en la misma zona (Anexo 14). En la Tabla 31 del Anexo 14 se tiene el control positivo de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa realizada con la acarbosa, que con una concentración de 1 mg/ml se obtiene un porcentaje de inhibición aproximado a 80 %, esto se utiliza para comprobar que la enzima este trabajando de manera óptima. (55)

En las figuras 12 y 13 se presentan los resultados de inhibición (%) *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa encontrados en las fracciones fenólicas libres de los marlos y granos, respectivamente, del maíz morado procedente de las zonas de Iray y Chuquibamba. Adicionalmente, se incluyeron los resultados del maíz morado procedente de la zona de Corire para efectos comparativos. Esta propiedad fue evaluada a 3 dosis diferentes de muestra (10, 12.5, 25 y 50, 62.5, 125 mg de muestra de marlo y grano, respectivamente).

De acuerdo a las figuras 12 y 13, la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa tuvo una tendencia dosis dependiente en las muestras de grano y marlo, además se observó que a pesar que las cantidades de muestra de marlo evaluadas fueron menores a las del grano, el porcentaje de inhibición encontrado en el marlo fue mayor que en las muestras de grano (Anexo 15). Esto se podría explicar porque el marlo concentra una mayor cantidad de antocianinas (96). Algunos trabajos han reportado que muestras con altos contenidos de antocianinas presentan una mayor inhibición de la  $\alpha$ -amilasa. (94)

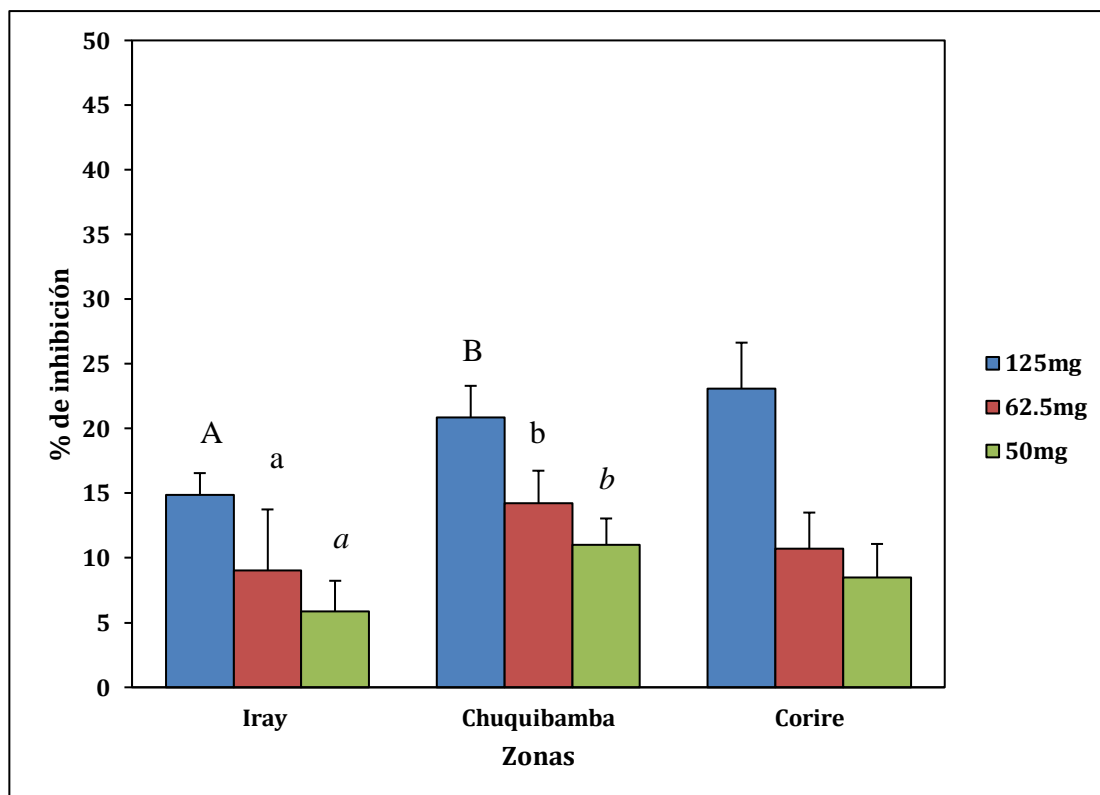


**Figura 12.-** Porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa por extractos de la fracción fenólica libre del marlo. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma dosis de muestra indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.

Al comparar los resultados según las zonas geográficas de procedencia, de acuerdo a la Figura 12, el porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ; Tabla 37 del Anexo 15) en las muestras de marlo de maíz morado procedente de la zona de Chuquibamba respecto a las muestras de la zona de Iray a todas las dosis evaluadas, siendo que se obtuvo un valor de  $30.646 \pm 11.39\%$  para la muestra de Chuquibamba (dosis de 25 mg de muestra) mayor que el resultado de la muestra procedente de Iray ( $18.162 \pm 4.99$ ) a igual dosis de muestra. Similar resultado se observó para el caso de las muestras de grano de maíz morado procedente de Chuquibamba (Tabla 28 del Anexo 15).

Como pruebas adicionales, se realizó la pre-purificación de la fracción fenólica libre de las muestras de marlo debido a que ésta presentó la mayor capacidad antioxidante *in vitro*. La purificación permitió excluir compuestos no fenólicos posiblemente presentes en el extracto original y que pudieran influir también en esta propiedad, y se realizó según lo descrito en el Anexo 18. La tendencia fue similar que la observada en los resultados obtenidos en los extractos originales ( Figura 25 del Anexo 18), la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa fue mayor en el extracto purificado procedente de la zona

de Chuquibamba en comparación con las zonas de Iray y Corire, lo que podría estar relacionado con la diferencia en el contenido de compuestos fenólicos en cada caso, sin embargo, son necesarios ensayos adicionales para determinar el contenido y perfil exacto de compuestos fenólicos y evaluar una posible correlación con la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa.



**Figura 13.-** Porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa por extractos de la fracción fenólica libre del grano. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma dosis de muestra indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.

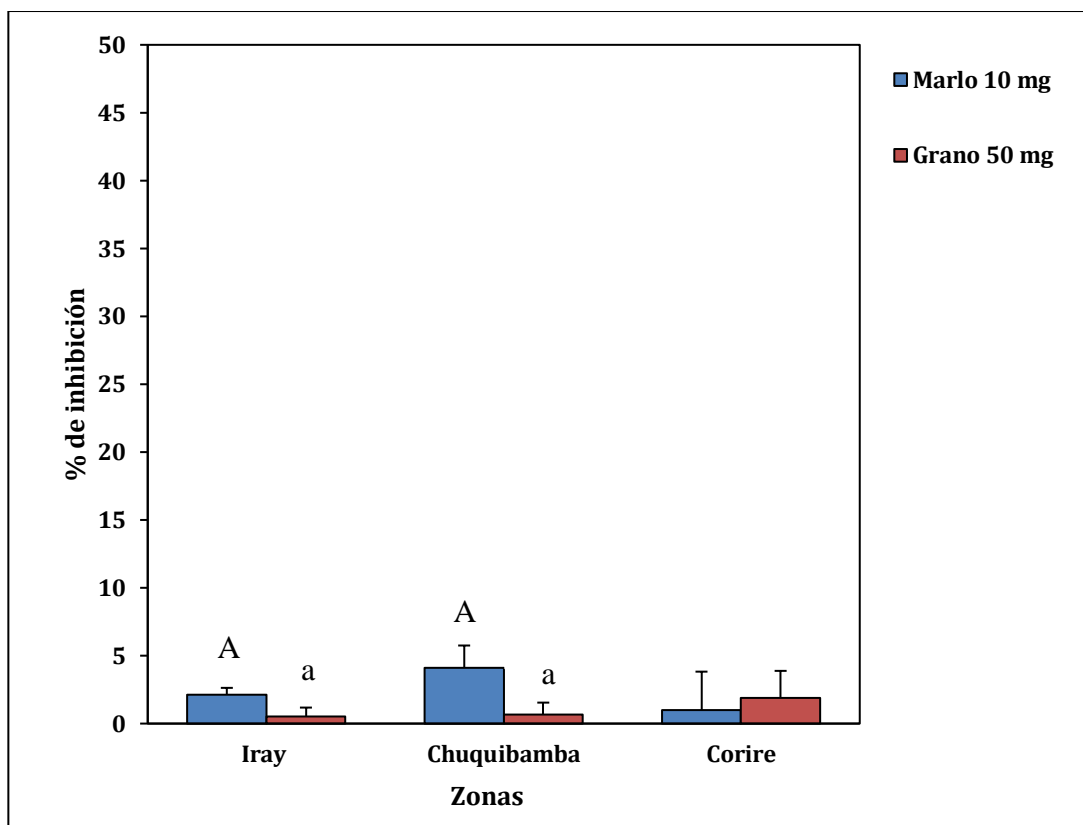
Al comparar los resultados según las zonas geográficas de procedencia, de acuerdo a la Figura 12, el porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ; Tabla 37 del Anexo 15) en las muestras de marlo de maíz morado procedente de la zona de Chuquibamba respecto a las muestras de la zona de Iray a todas las dosis evaluadas, siendo que se obtuvo un valor de  $30.646 \pm 11.39\%$  para la muestra de Chuquibamba (dosis de 25 mg de muestra) mayor que el resultado de la muestra procedente de Iray ( $18.162 \pm 4.99$ ) a igual dosis de muestra. Similar resultado se observó para el caso de las muestras de grano de maíz morado procedente de Chuquibamba (Tabla 28 del Anexo 15).

Como pruebas adicionales, se realizó la pre-purificación de la fracción fenólica libre de las muestras de marlo debido a que ésta presentó la mayor capacidad antioxidante *in vitro*. La purificación permitió excluir compuestos no fenólicos posiblemente presentes en el extracto original y que pudieran influir también en esta propiedad, y se realizó según lo descrito en el Anexo 18. La tendencia fue similar que la observada en los resultados obtenidos en los extractos originales ( Figura 25 del Anexo 18), la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa fue mayor en el extracto purificado procedente de la zona de Chuquibamba en comparación con las zonas de Iray y Corire, lo que podría estar relacionado con la diferencia en el contenido de compuestos fenólicos en cada caso, sin embargo, son necesarios ensayos adicionales para determinar el contenido y perfil exacto de compuestos fenólicos y evaluar una posible correlación con la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa.

En el caso del maíz morado procedente de la zona Corire se observó que los valores de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa de las muestras de marlo son menores a las de Chuquibamba e Iray (16% a una dosis de 25 mg). Por el contrario, en las muestras de grano esta propiedad fue mayor a la encontrada en las otras dos zonas (23% a una dosis de 125 mg). Estos resultados son solo referenciales ya que como se muestra en el Anexo 1, la variedad, y otros parámetros relacionados a las condiciones de cultivo de las muestras de esta zona fueron diferentes respecto al maíz morado cultivado en las zonas de Chuquibamba e Iray, por lo que los resultados obtenidos podrían estar influenciados por cualquiera de esos factores.

En la Figura 14 se presentan los resultados de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa de las fracciones fenólicas ligadas de las muestras de grano y marlo del maíz morado procedente de las zonas geográficas evaluadas. Como los resultados obtenidos en los extractos sin diluir dieron valores menores al 5% de inhibición, no se evaluaron menores dosis de muestra.

Similar a lo observado para el caso de las fracciones fenólicas libres, el porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa fue mayor ( $p < 0.05$ ) en las muestras de marlo que en el grano (Tabla 39, Anexo 15). Sin embargo, al evaluar el efecto de la zona de procedencia sobre los resultados, los valores no mostraron diferencias estadísticas significativas (Tabla 40 del Anexo 15).



**Figura 14.-** Porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa por extractos de la fracción fenólica ligada de marlo y grano. Letras diferentes en las barras correspondientes al mismo tipo de muestra, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.

Analizando de manera global los resultados, las fracciones fenólicas libres mostraron un mayor potencial de inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa que las fracciones fenólicas ligadas, y los resultados fueron mayores en las muestras de marlo que en el grano. Asimismo, las muestras procedentes de la zona de Chuquibamba presentaron mayores valores de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa que las muestras de Iray (en ambos casos el maíz morado fue de la misma variedad y el cultivo fue en similares condiciones) y esta tendencia se correlaciona con lo observado previamente en los resultados de capacidad antioxidante. Estudios previos han reportado una elevada concentración de antocianinas en la fracción fenólica libre del maíz morado, y que estos compuestos se concentran principalmente en el marlo que en el grano (72) (104). Por lo tanto, estos compuestos podrían estar relacionados con los mayores valores de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa encontrados en las fracciones fenólicas libres del marlo. Las antocianinas han mostrado un alto potencial de inhibición del tipo no competitivo de la  $\alpha$ -amilasa en otros estudios *in vitro* publicados. Sin embargo, otros

compuestos fenólicos presentes en el maíz morado además de las antocianinas podrían ejercer un efecto sinérgico. (5) (6) (21) (105)

Las diferencias encontradas en esta propiedad por efecto de la zona de procedencia (Chuquibamba e Iray) podrían estar relacionadas con la composición en compuestos fenólicos de las muestras evaluadas, como fue explicado anteriormente para el caso de la variabilidad observada en la capacidad antioxidante. Algunas investigaciones muestran que las propiedades bioactivas como capacidad antioxidante e inhibición de las enzimas digestivas como la  $\alpha$ -amilasa u otras propiedades fue mayor en muestras cultivadas en zonas de mayor altura (asociadas a una mayor radiación solar). (90)

En la tabla 11 se representan los resultados de inhibición de la enzima alfa-amilasa *in vitro* obtenidos en la presente investigación y las reportadas por otros autores, también se muestran las procedencias de las muestras y el tipo de muestra que se utilizó en dichas investigaciones. Los valores de inhibición (a similares dosis de muestra) obtenidos en la presente investigación fueron mayores que los reportados en otros estudios con muestras de maíz morado u otro tipo de fruto, sin embargo, aún son pocas las investigaciones que han reportado esta propiedad en el maíz morado.

**Tabla 11.-** Valores de porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa de muestras de diferentes procedencias en comparación con los resultados del estudio actual.

Procedencia	Porcentaje (%)	Dosis de muestra (mg de muestra)	Tipo de muestra	Referencia
Iray	18.162	25	Marlo-Maíz morado	Estudio actual
Chuquibamba	30.646	25	Marlo-Maíz morado	Estudio actual
Corire (Perú)	15.913	25	Marlo-Maíz morado	Estudio actual
Perú	29.070	250	Grano-Maíz morado	(94)
Chile	No encontró	No reporta	Grano-Maíz morado	(1)
Noruega	21.400	22	Bayas nórdicas	(106)

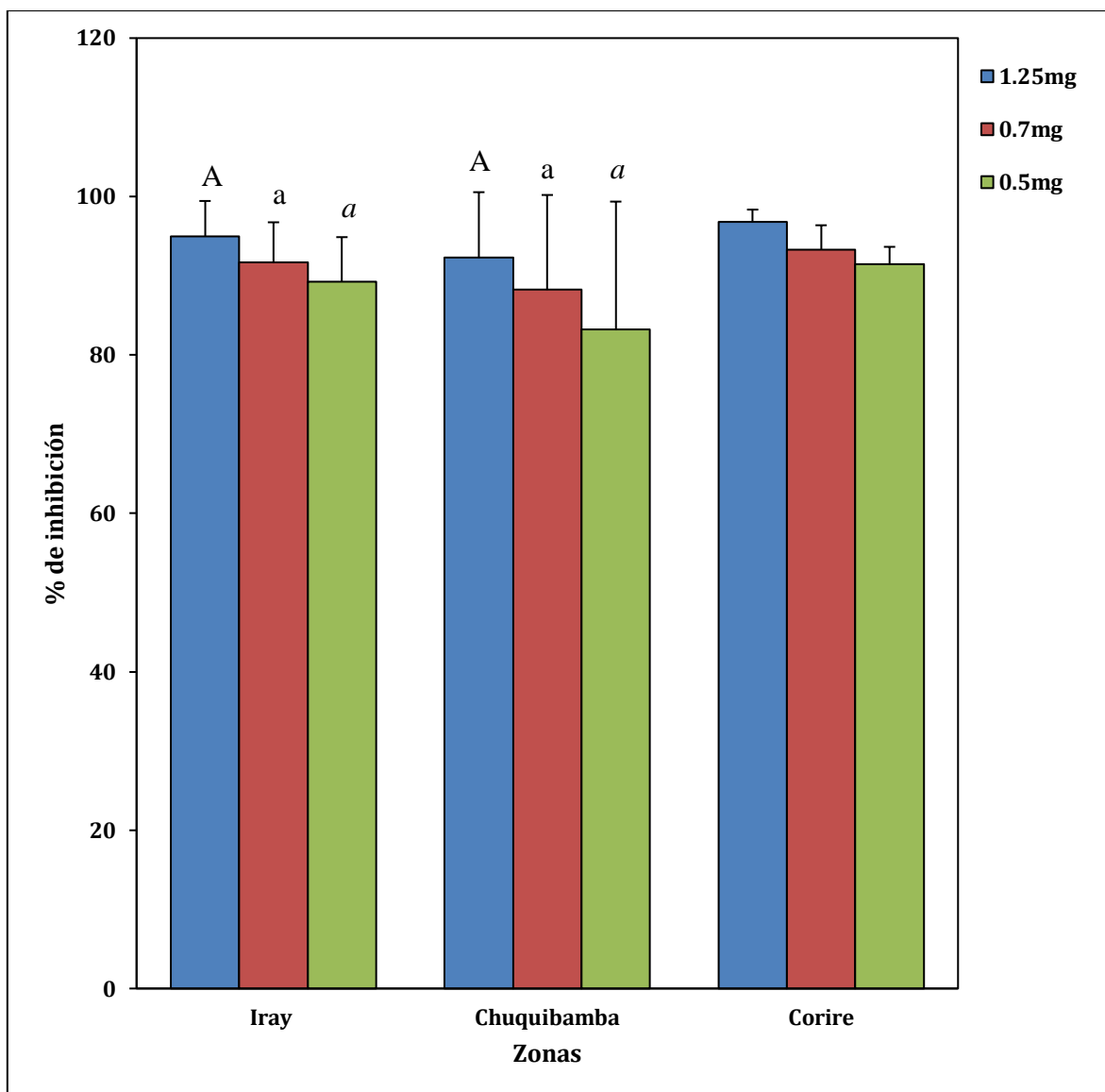
### 3.4. INHIBICIÓN *IN VITRO* DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA

En el Anexo 16 se tienen los resultados obtenidos por cada fundo de trabajo. El control positivo de inhibición con acarbosa está en la Tabla 32 del Anexo 13, donde se aprecia que a una concentración de 5 mg/ml se obtiene un aproximado de inhibición de 80%, esto se realiza para asegurarnos de que la enzima este trabajando de manera óptima. (56)

En las figuras 15 y 16 se presentan los resultados de inhibición (%) *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de las fracciones fenólicas libres de las muestras de marlos y granos, respectivamente, del maíz morado procedente de las zonas geográficas de Iray y Chuquibamba. También se encuentran los resultados de maíz morado procedente de la zona de Corire para efectos comparativos. Esta propiedad fue evaluada a 3 dosis diferentes de muestra (1.25, 0.70, 0.50 y 6.25, 3.50, 2.50 mg de muestra de marlo y grano, respectivamente).

La inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa presentó una tendencia de dosis de dependencia en las muestras de marlo como de grano, y al igual que lo observado en los resultados de la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa, el porcentaje de inhibición registrado en las muestras de marlo fue mayor que en las muestras de grano (Anexo 17) y esto podría estar relacionado con la mayor concentración de polifenoles en esta parte del maíz morado (96). Adicionalmente, los porcentajes de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa fueron mayores (40 – 98% con dosis de muestra que van de 0.5 mg a 6.25 mg) que los reportados para el caso de la  $\alpha$ -amilasa (5 – 30% con dosis de muestra que van de 10 mg a 125 mg).

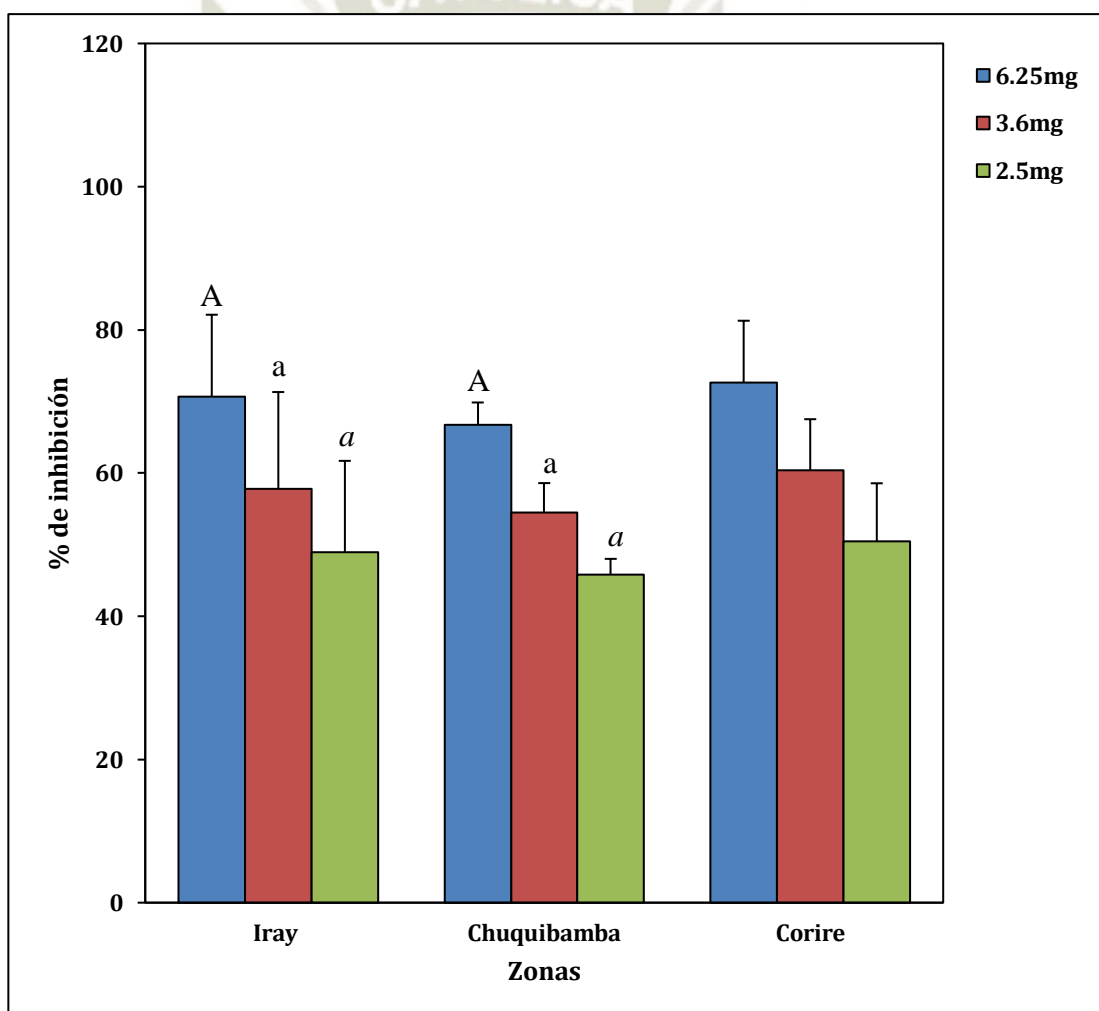
En relación a los resultados según las zonas geográficas de procedencia, no hubo una diferencia significativa entre los valores obtenidos de las muestras procedentes de las zonas de Chuquibamba e Iray a todas las dosis de muestra evaluadas ( $p < 0.05$ ; Tabla 45 y 26 del Anexo 17). Por ejemplo, el marlo presentó un porcentaje de inhibición de 92 y 95% con 1.25 mg de muestra para las muestras procedentes de Chuquibamba e Iray respectivamente. En el caso del grano, se obtuvieron valores de 67 y 70% con 6.25 mg de muestra para las muestras procedentes de Chuquibamba e Iray, respectivamente. Posiblemente, otros compuestos no fenólicos presentes en los extractos acuosos evaluados contribuyan a esta propiedad.



**Figura 15.-** Porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por extractos de la fracción fenólica libre del marlo. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma dosis de muestra, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.

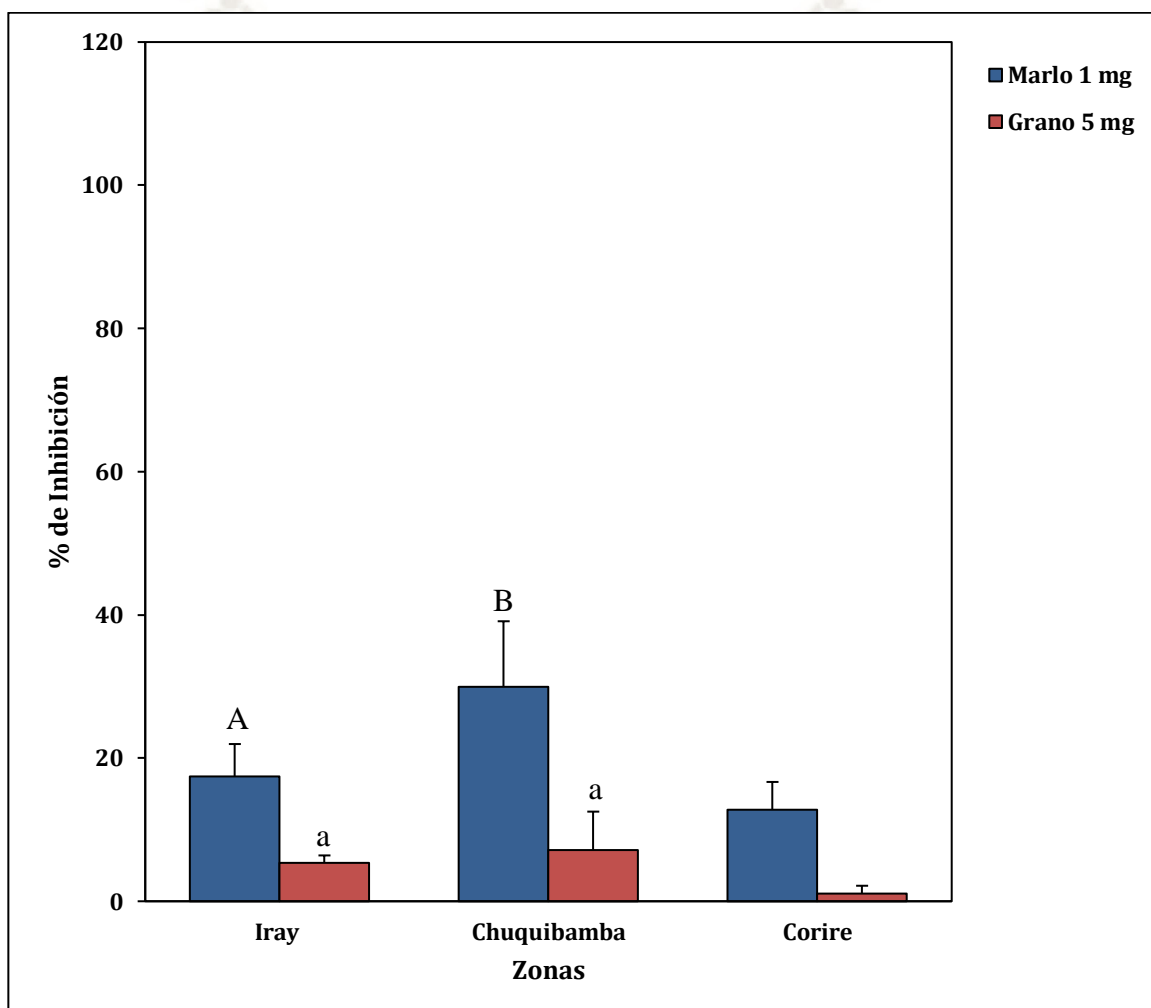
Para determinar si esta propiedad bioactiva se relaciona con los compuestos fenólicos presentes en los extractos evaluados, se realizaron pruebas adicionales de pre-purificación sólo con la fracción fenólica libre del marlo siguiendo la metodología presentada en el Anexo 18. De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 26 del Anexo 19), la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa fue ligeramente mayor (44%) en el extracto purificado procedente de la zona de Chuquibamba en comparación a la zona de Iray (41%), y esta propiedad fue mayor aún al valor obtenido en las muestras de zona de referencia de Corire (35%). Posiblemente, la mayor capacidad antioxidante

observada en las muestras de Chuquibamba (asociada con una posible mayor concentración de polifenoles como las antocianinas) se relacione con estos resultados. Si bien las antocianinas constituyen la mayor fracción de los compuestos fenólicos de la fracción libre (grano/marlo) del maíz morado, también se ha reportado la presencia de otros compuestos fenólicos como el ácido ferúlico y cumárico son algunos de los ácidos fenólicos encontrados en las muestras de maíz morado, y a estos se les atribuye también el potencial de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (21) (104) (105). Por lo anterior, otros compuestos fenólicos diferentes a las antocianinas podrían estar contribuyendo con esta propiedad bioactiva, sin embargo, es necesario realizar más estudios con las fracciones aisladas de estos compuestos.



**Figura 16.-** Porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por extractos de la fracción fenólica libre del grano. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma dosis de muestra, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.

Con respecto a las muestras de maíz morado procedente de la zona de referencia de Corire, se obtuvieron valores muy similares a los obtenidos en las muestras procedentes de Chuquibamba e Iray para ambos tipos de muestras de marlo 97% (1.25 mg) y grano 73% (6.25 mg). Al igual que lo explicado anteriormente con los resultados de inhibición de la alfa-amilasa, los resultados presentados por el maíz morado de esta zona podrían estar asociados a diversos factores debido a las diferentes condiciones de cultivo y variedad (además del origen), respecto a las muestras procedentes de Iray y Chuquibamba.



**Figura 17.-** Porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por extractos de la fracción fenólica ligada de marlo y grano. Letras diferentes en las barras correspondientes al mismo tipo de muestra, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Se incluyeron los resultados de la zona de Corire para efectos comparativos.

En la figura 17 se presentan los resultados de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de las fracciones fenólicas ligadas de las muestras de grano y marlo del maíz morado procedentes de las diferentes zonas geográficas evaluadas y la muestra de Chuquibamba (marlo) que presentó el mayor valor de inhibición; esta muestra también presentó una tendencia dosis dependiente cuando fue evaluada a diferentes concentraciones (Anexo 20).

Similar a los resultados obtenidos de la fracción fenólica libre, los porcentajes de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa fueron mayores en las muestras de marlo que en las de grano (Tabla 47 del Anexo 17) y esta propiedad fue significativamente mayor en las muestras de marlo procedentes de Chuquibamba respecto a las de Iray (30 y 16% para Chuquibamba e Iray, respectivamente (1 mg)) (Tabla 48 del Anexo 17). Adicionalmente, estos resultados se correlacionaron con los valores de capacidad antioxidante determinados en las fracciones fenólicas ligadas (grano y marlo).

En la tabla 12 se representan los resultados de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* obtenidos en la presente investigación comparadas con los reportadas por otros autores, también se muestran las procedencias de las muestras y el tipo de muestra que se utilizó en dichas investigaciones. Los resultados del presente estudio fueron superiores a los presentados por otras investigaciones, indicando un importante efecto del origen, y factores genéticos asociados como la variedad que podrían explicar las diferencias observadas. Es importante resaltar también que el maíz morado evaluado presenta una mayor actividad de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* que otros frutos conocidos por sus altos contenidos de antocianinas como los arándanos u otro tipo de bayas.

**Tabla 12.-** Valores de porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de muestras de diferentes procedencias en comparación con los resultados del estudio actual.

Procedencia	Porcentaje (%)	Dosis de muestra (mg de muestra)	Tipo de muestra	Referencia
Iray	95.014	1.25	Marlo-Maíz morado	Estudio actual
Chuquibamba	92.488	1.25	Marlo-Maíz morado	Estudio actual
Corire (Perú)	96.621	1.25	Marlo-Maíz morado	Estudio actual
Perú	70.050	25	Grano-Maíz morado	(94)
Chile	43.000	25	Grano-Maíz morado	(1)
Sudáfrica	75.000	25	Seda-Maíz morado	(105)
Noruega	34.700	22	Bayas nórdicas	(106)
China	98.000	25	Arándonos	(107)

Existen varios mecanismos por los cuales los polifenoles disminuyen los factores de riesgo relacionados a la hiperglicemia y que dan consecuencia a enfermedades como la diabetes tipo 2, como se explicó en el punto 2.3. (Capítulo I). Uno de ellos es a través de la inhibición de las enzimas digestivas  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa, para que estas no hidrolicen carbohidratos complejos, presentes en la dieta, en unidades de monosacáridos que pueden ser absorbidas en el duodeno y el comienzo del yeyuno y de esta manera llegar a la sangre. En estudios recientes se observa que el uso de los polifenoles como inhibidores de enzimas digestivas no genera efectos adversos, como la distensión abdominal, meteorismo y posible diarrea; que resulta de la fermentación bacteriana anormal de carbohidratos no digeridos en el colon, provocados normalmente por inhibidores como la acarbosa, miglitol y voglibosa. En los resultados se observó que los valores obtenidos en la prueba *in vitro* de la  $\alpha$ -glucosidasa fueron mayores que los de la  $\alpha$ -amilasa, lo cual se considera lo mejor, ya que esto previene malestares ocurridos con los fármacos que se utilizan para tratar la hiperglicemia (52) (105). Los resultados de la presente investigación muestran que el maíz morado presenta un potencial de inhibición de ambas enzimas, consecuentemente el consumo este cereal podría contribuir a través de la dieta con las actuales estrategias que apuntan a la prevención de la hiperglicemia y sus consecuencias en la salud, sin embargo, son necesarios estudios *in vivo* que confirmen estos resultados.

## CONCLUSIONES

### PRIMERA

La capacidad antioxidante medida con los métodos *in vitro* de inhibición del radical libre ABTS y DPPH en las muestras de grano y marlo de maíz morado cultivado en Arequipa fue mayor en las fracciones fenólicas libres respecto a las ligadas, y los valores de capacidad antioxidante total (libre y ligada) fueron más altos en el marlo y procedentes de la zona de Chuquibamba (37301.89 y 9483.22  $\mu$ moles ET/100 g bs con el método de inhibición del ABTS y DPPH respectivamente), con respecto a los encontrados en la zona de Iray (37301.89 y 6998.60  $\mu$ moles ET/100 g bs con el método de inhibición del ABTS y DPPH respectivamente).

### SEGUNDA

Las fracciones fenólicas libres y ligadas de las muestras de grano y marlo de maíz morado evaluado presentaron potencial de inhibición *in vitro* de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, siendo las fracciones fenólicas libres del marlo las que presentaron los mayores valores de inhibición; 18.162% y 30.646% con 25 mg para Iray y Chuquibamba respectivamente en inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa; y 95.014% y 92.488% con 1.25 mg de muestra para Iray y Chuquibamba respectivamente en inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

### TERCERA

El análisis estadístico reveló un efecto significativo de la zona de procedencia, siendo que las muestras de maíz morado (en especial el marlo) procedentes de Chuquibamba presentaron los mayores valores de capacidad antioxidante, en ABTS Chuquibamba superó a Iray por 7392.323  $\mu$ moles TE/100 g; en DPPH fue 2484.616  $\mu$ moles TE/100 g y en  $\alpha$ -amilasa la diferencia fue de 12.484% con una muestra de 25 mg.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios futuros donde se evalúe el efecto de las diferentes variables agroclimáticas sobre las propiedades bioactivas evaluadas y en variedades comerciales de mayor consumo interno y de exportación.
- Las pruebas experimentales que se utilizaron para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* (inhibición del radical ABTS y DPHH) no reflejan con exactitud lo que pasa en un sistema vivo, por lo que se recomienda que, con la base de estos resultados, se proceda a realizar trabajos *in vivo* y, por último, ensayos clínicos.
- Las pruebas experimentales *in vitro* utilizadas para determinar la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa no reflejan con exactitud lo que ocurre en un sistema vivo, por lo cual se recomienda confirmar los resultados bioquímicos de la presente investigación con pruebas *in vivo* y posteriores ensayos clínicos
- Analizar diferentes productos derivados del maíz morado, y las posibles diferencias que se puedan encontrar bajo distintas condiciones como el efecto de la cocción u otros.
- Realizar estudios *in vivo* de la posible toxicidad de los compuestos fenólicos sobre organismos orgánicos, para luego pasar a ensayos clínicos.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González-Muñoz A., Quesille-Villalobos A., Fuentealba C., Shetty K. y Gálvez L. Potential of Chilean Native Corn (*Zea mays* L.) Accessions as Natural Sources of Phenolic Antioxidants and in Vitro Bioactivity for Hyperglycemia and Hypertension Management. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61: p. 10995–11007.
2. Quiñones M., Migue M. y Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* 2012; 27: p. 76-89.
3. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C y Pouysgu L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Nat. Prod.* 2011; 50: p. 586–621.
4. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nut. Rev.* 1998; 56: p. 317-333.
5. Yu J., Vasanthan T. y Temelli F. Analysis of Phenolic Acids in Barley by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: p. 4352–4358.
6. Sen A., Bergvinson D., Miller S., Atkinson J., Fulcher G. y Amason J. Distribution and Microchemical Detection of Phenolic Acids, Flavonoids, and Phenolic Acid Amides in Maize Kernels. *J. Agric. Food Chem.* 1994; 42: p. 1879-1883.
7. Bily A., Reid L., Taylor J., Johnston D., Malouin C., Burt A., Bakan B., Regnault-Roger C., Pauls K., Arnason J. y Philogène B. Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to *Fusarium graminearum*. *Gen. Resist.* 2003; 93(6): p. 712-719.
8. Shahidi F. y Yeo J. Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules.* 2016; 21(1216): p. 1-22.
9. Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J. y Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidants. *Nutri. Hosp.* 2002;(17): p. 271-278.
10. Winkel-Shirley B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Phys.* 2001; 126: p. 485–493.
11. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. y Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin. Nutr.* 2004; 79: p. 727–747.
12. Harbone J. y Grayer R. The anthocyanins. Chapman and Hall Ltd. 1988.
13. Garzón G. Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. *Biol. Colombiana.* 2008; 13: p. 27 – 36.
14. Castañeda-Sánchez A. y Guerrero-Beltrán J. Pigmentos en frutas y hortalizas: antocianinas. *Selec. de Ing. de Alimentos.* 2015; 9: p. 25-33.

15. Badui S. Química de los Alimentos. Antocianinas. 4th ed.; 2006.
16. Estévez L. y Mosquera R. Conformational and Substitution Effects on the Electron Distribution in a Series of Anthocyanidins. *J. Phys. Chem.* 2009; 113: p. 9908–9919.
17. Miyazawa T., Nakagawa K., Kudo M., Muraishi K. y Someya K. Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-glucoside and Cyanidin-3,5-diglucoside, into Rats and Humans. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: p. 1083–1091.
18. Ghiselli A., Nardini M., Baldi A. y Scaccini C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *J. Agri Food Chemistry.* 1998; 46: p. 361-367.
19. Aguilera Ortiz M., Reza Vargas M., Chew Madinaveitia R. y Meza Velázquez J. Propiedades Funcionales de las Antocianinas. *Rev. de C. Bio. y de la Salud.* 2011; 8: p. 16-22.
20. Jara E, Hidalgo J., Flores C., Pérez M., Yáñez A., Hidalgo A., Quiñones L., Hancke J. y Burgos R. Estudio de un Extracto Estandarizado de Maqui Rico en Delfinidinas en el Mantenimiento del Balance de Glucosa. *Farmacología Chile.* 2012; 5: p. 27-34.
21. Wu Y., Zhou Q., Chend X., Lia X., Wang Y., Zhanga J. Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and  $\alpha$ -glucosidase inhibition effect. *Food Res. Int.* 2017; 100: p. 312 - 324.
22. Heleno S., Martinis A., Queiroz M. y Ferreira I. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem.* 2015; 173: p. 501-513.
23. Porras A. y Lopez-Malo A. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 2009; 3: p. 121-134.
24. Ministerio de Salud de Argentina. ¿Qué son las enfermedades no transmisibles? Dirección Nacional de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades no Transmisibles. [Online].; 2015 [cited 2019 enero 20. Available from: <http://www.msal.gov.ar/ent/index.php/informacion-para-ciudadanos/ique-son-icuales-son>.
25. Ezzati M. y Riboli E. Can Noncommunicable Diseases Be Prevented? Lessons from Studies of Populations and Individuals American Association for the Advancement of Science (AAAS). *AAAS.* 2012; 337: p. 1482-1487.
26. OMS/FAO. Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas. Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. 2003; 916: p. 40-54.
27. FAO/OPS. obrepeso en Perú afecta a más de la mitad de la población, sobre todo a mujeres y niños. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [Online].; 2017 [cited 2019 enero 20. Available from: <http://www.fao.org/peru/noticias/detail-events/es/c/463701/>.

28. Ferreira González L. y Canalejo A. Clasificación del Sobrepeso y Obesidad. 2017. ;: p. 1-13.
29. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Perú: Enfermedades No Transmisibles y Transmisibles. 2014;; p. 25-26.
30. García-García E., De la Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M., Tusié-Luna M., Calzada-León R., Vázquez-Velázquez V., Barquera-Cervera S., Caballero-Romo A., Orozco L., Velásquez-Fernández D., Rosas-Peralta M., Barriguete-Meléndez A. y Zacarías-Castillo R. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública. Una reflexión. Salud México. 2008; 50: p. 530-547.
31. Pérez A., Franch J., Cases A., González J., Conthe P., Gimeno E. y Matali A. Relación del Grado de Control Glucémico con las Características de la Diabetes y el Tratamiento de la Hiperglucemia en la Diabetes Tipo 2. Medicina Clínica. 2012; 12: p. 505-511.
32. Alegría Ezquerro E., Castellano Vázquez J. y Alegría Barrero A. Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. Prev. Cardiova. 2008; 61: p. 752-764.
33. Bosch X., Alfonso F. y Bermejo J. Diabetes y enfermedad cardiovascular. Una mirada hacia la nueva epidemia del siglo XXI. Rev. Esp. de Card. 2002; 55: p. 525-527.
34. Coronado M., Vega y León S., Gutiérrez R., Vázquez M. y Radilla C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Rev Chil Nutr. 2015; 42: p. 1-20.
35. Nayra E. Estudio fitoquímico preliminar y actividad antioxidante de las hojas de *Achyrocline alata* DC. (HUIRA-HUIRA) y su relación con su contenido de compuestos fenólicos totales. UCSM. 2014.
36. Calderón Salinas J., Muñoz Reyes E. y Quintanar Escorza M. Estrés Oxidativo y Diabetes Mellitus. REB. 2013; 32: p. 53-66.
37. Furukawa S., Matsuda M. y Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J. Clin Invest. 2017; 114: p. 1752-1761.
38. Henriksen E., Diamond-Stanic M. y Marchionne E. Oxidative Stress and the Etiology of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. Free Radical Bio. & Med. 2011; 51: p. 993-999.
39. Muhammada S., Bierhaus A. y Schwaninger M. Reactive Oxygen Species in Diabetes-induced Vascular Damage, Stroke, and Alzheimer's disease. J. Alzheimer's Disease. 2009; 16: p. 775-785.
40. Brand-Williams W., Cuvelier M. y Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm-Wiss. 1995; 28: p. 25-30.

41. Fernández J., Da Silva-Grigolettob M. y Túnez-Fiñanac I. Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev Andal Med Deporte*. 2009; 2(1): p. 19-34.
42. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*. 2002; 31(2): p. 126-133.
43. Romagnoli M. Mecanismo de producción de radicales libres en la diabetes: Importancia de la xantina oxidasa e implicación del factor nuclear-KB. *Universitat de València*. 2007.
44. Miller N. y Rice-Evans C. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem*. 1997; 60(3): p. 331-337.
45. Ramirez-Tortosa C., Andersen O., Gardner P., Morrice P., Wood S., Duthie S., Collins A. y Duthie G. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and dna damage in vitamin e-depleted rats. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001; 31(9): p. 1033–1037.
46. Kuskoski E., Asuero A., García-Parilla M., Troncoso A. y Fett R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2004; 24(4): p. 691-693.
47. Criado C. y Moya M. Vitaminas y antioxidantes. In M. M. Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid : Universidad Autónoma de Madrid; 2009.
48. López J., Mesejo A. y Montejo J. Nutrición artificial en la hiperglucemia y Diabetes mellitus en pacientes críticos. *Nutr. Hosp*. 2005; 20: p. 34-37.
49. Cruz J., Licea M., Hernández P., Abraham E. y Yanes M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*. 2011; 58(1): p. 4-15.
50. Villena J. Epidemiología de la Diabetes Mellitus en el Perú. *Diagnóstico*. 2016; 55: p. 173-181.
51. Pino Chávez W. Obesidad, dieta y actividad física en escolares de 5 a 10 años en el distrito de Sachaca, Arequipa. UCSM. 2014;; p. 1-90.
52. Lao F. y Giusti M. Quantification of Purple Corn (*Zea mays* L.) Anthocyanins Using Spectrophotometric and HPLC Approaches: Method Comparison and Correlation. *Food Analysis Methods*. 2016; 9: p. 1367–1380.
53. Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H. y Poutanen K. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci*. 2010; 11: p. 1365-1402.
54. Anhe F., Desjardins Y., Pilon G., Dudonne S., Genovese M., Lajolo F. y Marette A. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. *Pharm. Nut*. 2013; 1: p. 105–114.

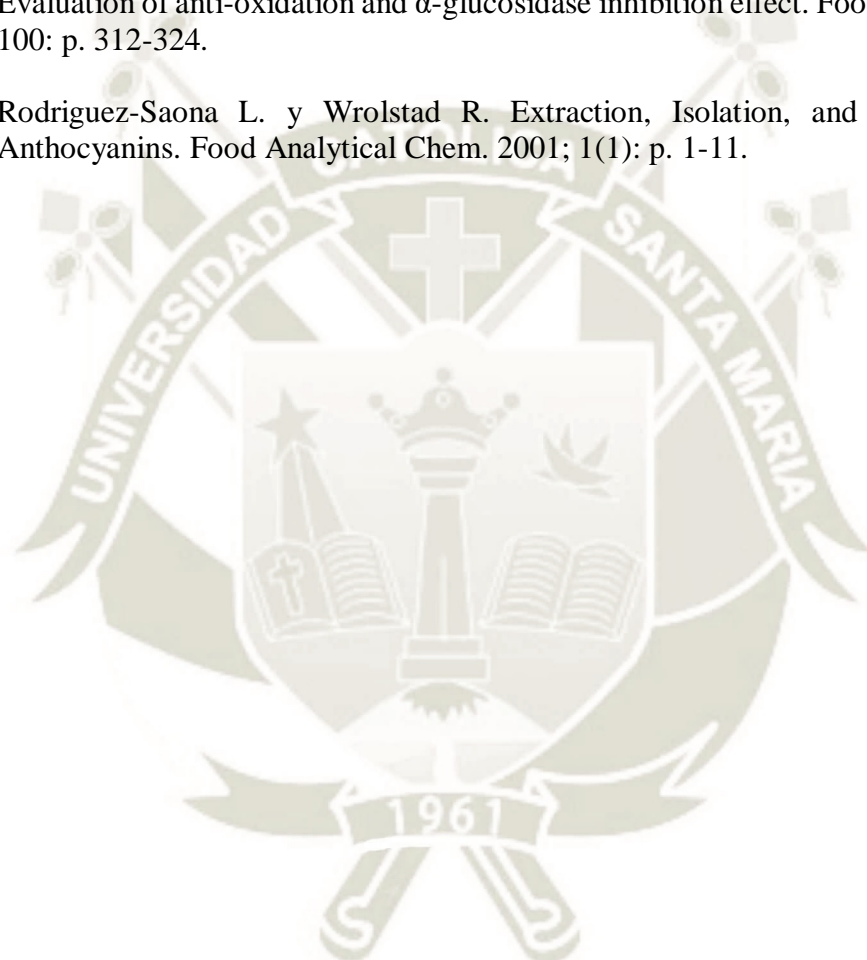
55. Worthington, V. y Corporation, W. Worthington enzyme manual: Enzymes and related biochemicals – alpha amylase: Worthington Biochemical Corporation; 1993.
56. Worthington, V. y Corporation, W. Worthington enzyme manual: Enzymes and related biochemicals – maltase-glucosidase Corporation WB, editor.; 1993.
57. Rey D. Evaluación in vitro del efecto de un extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre algunas carbohidrasas intestinales. Universidad Nacional de Colombia. 2013.
58. Bonavia D. y Grobman A. Revisión de las pruebas de la existencia de maíz precerámico de los andes centrales. Bol. de Arq. PUCP. 1999;; p. 239-261.
59. Gorriti A., Arroyo J., Negron L., Jurado B., Purizaca H., Santiago I., Taype E. y Quispe F. Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays* L.): Método de extracción. Boletín Latinoamericano. 2009; 8(6): p. 509 – 518.
60. Schwarz M., Hillebrand S., Habben S., Degenhardt A. y Winterhalter P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. J. Biochem. Engineering. 2003; 14: p. 179–189.
61. Escribano-Bailon M., Santos-Buelga C. y Rivas-Gonzalo J. Anthocyanins in cereals. J. Chromatography. 2004; 1054: p. 129-141.
62. MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego, PE). Maíz amiláceo, principales aspectos de la cadena agroproductiva. Dirección General de Competitividad Agraria. Ira edición ed. Lima; 2012.
63. Sifuentes E., Albuja E., Contreras S., León C., Carlos J. y Santa María J. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola y Ganadera. MINAGRI. 2016.
64. MINAGRI. Perú: Calendario de siembras de maíz morado (%) 2009-2015. [Online].; 2015 [cited 2019 enero 22. Available from: <http://siea.minagri.gob.pe/calendario/>.
65. Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA. Cultivo de Maíz Morado en la Sierra. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú. [Online].; 2016 [cited 2018 diciembre 2. Available from: <http://www.inia.gob.pe/capacitacion-a-distancia/cap-cursos-virtuales/171-capacitacion/cursos-2015/962-curso-2015-02>.
66. Gorriti A., Quispe F., Arroyo J., Córdova A., Jurado B., Santiago I. y Taype E. Extracción de Antocianinas de las Corontas de *Zea mays* L. “Maíz Morado”. Ciencia e Invest. 2009; 12: p. 64-74.
67. AGRODATA PERU. Maíz Morado Perú Exportación 2017 noviembre. [Online].; 2017 [cited 2019 enero 2. Available from: <https://www.agrodataperu.com/2017/12/maiz-morado-peru-exportacion-2017-noviembre.html>.

68. Jing P., Noriega V., Schawrtz S. y Giusti M. Effects of Growing Conditions on Purple Corn cob (*Zea mays* L.) Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: p. 8625–8629.
69. Takhtajan A. Outline of the Classification of Flowering Plants (*Magnoliophyta*). *Botanical Review.* 1980; 46(3): p. 225-359.
70. Salinas Y., García C., Coutiño B. y Vidal V. Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013; 36: p. 285 – 294.
71. Chaiittianan R., Sutthanut K. y Rattanathongkom A. Purple corn silk: A potential anti-obesity agent with inhibition on adipogenesis and induction on lipolysis and apoptosis in adipocytes. *J. Ethnopharmacology.* 2017; 201: p. 9-16.
72. Das A. y Singh V. Antioxidant free and bound phenolic constituents in botanical fractions of Indian specialty maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Food Chem.* 2016; 201: p. 298-306.
73. Ortíz K. Elaboración de un Sorbete a Base de Harina de Maíz Morado (*Zea mays* L.) Mezclado con Bacterias Lácteas Naturales México; 2013.
74. Gorriti Gutierrez A., Arroyo Acevedo J., Negron Ballarte L., Jurado Teixeira B., Purizaca Llajaruna H., Santiago Aquisé I., Taype Espinoza E. y Quispe Jacobo F. Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays* L.): Método de extracción. *Boletín Latinoamericano.* 2009; 8: p. 509-518.
75. Lieberman S. The Antioxidant Power of Purple Corn. *Alter. Comp. Therapies.* 2007;; p. 107-110.
76. Tsuda T., Ueno Y., Aoki H., Koda Y., Horio F., Takahashi N., Kawada T y Osawa T. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004; 316: p. 149-157.
77. Li J., Lim S., Lee J., Kim J., Kang S., Kim J. y Kang Y. Purple corn anthocyanins dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and inflammation: possible renoprotective role in diabetic nephropathy. *J. Nutri. Biochem.* 2012; 23: p. 320-331.
78. Hosoda K., Miyaji M., Matsuyama H., Haga S., Ishizaki H. y Nonaka K. Effect of supplementation of purple pigment from anthocyanin-rich corn (*Zea mays* L.) on blood antioxidant activity and oxidation resistance in sheep. *Livestock Scie.* 2012; 145: p. 266–270.
79. Mazewska C., Liang K. y González de Mejía E. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays. *Food Chem.* 2018; 242: p. 378-388.

80. Petroni K., Trinei M., Fornari M., Calvenzani V., Marinelli A., Micheli L., Pilu R., Matros A., Mock H., Tonelli C. y Giorgio M. Dietary cyanidin 3-glucoside from purple corn ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Nutri. Metab. Cardio. Diseases*. 2016.
81. Adekanye T., Adegbenro V. y Saliu K. Development of maize on cob dryer for small scale farmers. *Scie. Agric*. 2016; 14(1): p. 172-178.
82. Rodríguez J. y Bartosik R. *Secado de Granos*. 2006..
83. Galvez L., Christopher A., Sarkar D., Shetty K., Chirinos R. y Campos D. Phenolic Composition and Evaluation of the Antimicrobial Activity of Free and Bound Phenolic Fractions from a Peruvian Purple Corn (*Zea mays* L.) Accession. *J. Food Science*. 2017; 1(1): p. 1-9.
84. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. USA; 1990.
85. Tovar del Rio J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH Y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira. 2013.
86. Londoño J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *GRIAL*. 2015; 9(3): p. 129-162.
87. Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research Inter*. 2006; 39: p. 791-800.
88. Miller G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analy. Chem*. 1959; 31(3): p. 426-428.
89. Cihan A., Ozcan B., Tekin N. y Cokmus C. Characterization of a thermostable  $\alpha$ -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* F84a. *Current Res*. 2010; 1: p. 945-955.
90. Su S., Wang L., Feng C., Liu Y., Li C., Du H., Tang Z., Xu J., Wang J. Fingerprints of anthocyanins and flavonols of *Vaccinium uliginosum* berries from different geographical origins in the Greater Khingan Mountains and their antioxidant capacities. *Food Control*. 2015.
91. Pedreschi R. y Cisneros-Zevallos L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chem*. 2007; 100: p. 956-963.
92. Aoki H., Kuze N. y Kato Y. Researchgate. [Online].; 2001 [cited 2019 Junio 22. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/265925745\\_Anthocyanin\\_isolated\\_from\\_purple\\_corn\\_Zea\\_mays\\_L](https://www.researchgate.net/publication/265925745_Anthocyanin_isolated_from_purple_corn_Zea_mays_L).

93. Yang Z. y Zhai W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010; 11: p. 169–176.
94. Gálvez L., Huamán-Alvino C., Flores-Báez O., Aquino-Méndez E., Chirinos R., Campos D., Sevilla R., Fuentealba C., Pedreschi R., Sarkar D. y Shetty K. Evaluation of phenolic antioxidant-linked in vitro bioactivity of Peruvian corn (*Zea mays* L.) diversity targeting for potential management of hyperglycemia and obesity. *J Food Sci Technol*. 2019 Junio; 56(6): p. 2909–2924.
95. Pradeep P. y Sreerama Y. Soluble and bound phenolics of two different millet genera and their milled fractions: Comparative evaluation of antioxidant properties and inhibitory effects on starch hydrolysing enzyme activities. *J. Functional Foods*. 2017; 35: p. 682-693.
96. Monroy Y., Rodrigues R., Sartoratto A. y Cabral F. Extraction of bioactive compounds from cob and pericarp of purple corn (*Zea mays* L.) by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol, and water as solvents. *J. Supercritical Fluids*. 2016 Enero; 107: p. 250-259.
97. Žilic S., Serpen A., Akilhoglu G., Gökmen V. y Vancetovic J. Phenolic Compounds, Carotenoids, Anthocyanins, and Antioxidant Capacity of Colored Maize (*Zea mays* L.) Kernels. *J. Agric.Food Chem*. 2012; 60: p. 1224–1231.
98. Harakotr B., Suriharn B., Tangwongchai R. y Scott M. Anthocyanin, phenolics and antioxidant activity changes in purple waxy corn as affected by traditional cooking. *Food Chem*. 2014; 164: p. 510-517.
99. Medina L. y Ujueta A. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2005; 25(4): p. 726-732.
100. Panga Y., Ahmeda S., Xua Y., Betab T., Zhuc Z., Shaoc Y. y Baoa J. Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice. *Food Chem*. ; 240: p. 212-221.
101. Leguizamón G., González A., Sotelo R., Islas M., García J. García K., Carvallo T. y Báez R. Efecto del sombreado de racimos sobre el color y la capacidad antioxidante en uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.). *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*. ; 9(2): p. 138-147.
102. Mori K., Sugaya S. y Gemma H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scie. Horticul*. 2005; 105: p. 319–330.
103. Carrasco-Ríos L. Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *IDESIA (Chile)*. 2009; 27(3): p. 59-76.
104. Cuevas E. Hillebrand S., Antezana A. y Winterhalter P. Soluble and Bound Phenolic Compounds in Different Bolivian Purple Corn (*Zea mays* L.) Cultivars. *J. Agric. Food Chem*. 2011; 59: p. 7068–7074.

105. Sabiu S., O'Neill F. y Ashafa A. Kinetics of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential of *Zea mays* Linnaeus (*Poaceae*), *Stigma maydis* aqueous extract: An in vitro assessment. *J. Ethnopharmacology*. 2016;; p. 1-35.
106. Ho G., Nguyen T., Kase E., Tadesse M., Barsett H. y Wangenstein H. Enhanced Glucose Uptake in Human Liver Cells and Inhibition of Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes by Nordic Berry Extracts. *Molecules*. 2017; 22(1806): p. 1-15.
107. Wub Y., Zhou Q., Chend X., Lia X., Wang Y. y Zhanga J. Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and  $\alpha$ -glucosidase inhibition effect. *Food Res. Int.* 2017; 100: p. 312-324.
108. Rodriguez-Saona L. y Wrolstad R. Extraction, Isolation, and purification of Anthocyanins. *Food Analytical Chem.* 2001; 1(1): p. 1-11.



## ANEXOS

### Anexo 1. Condiciones pre y post cosecha de las diferentes zonas de recolección de muestras.

MUESTRA	Siembra		Cosecha				Secado
	Meses	Preparación de tierra	Meses	Fertilizante	Plaga	Control de plaga	
CH-01	Noviembre	Arado	Mayo	Compost, Biol	Gusano cogollero Asmopalpus	Biocida de origen natural (Extracto de ajo y cebolla)	Sol directo
CH-02							
CH-03							
IR-01	Noviembre	Arado	Mayo	Compost, Biol	Gusano cogollero	Biocida de origen natural (Extracto de ajo y cebolla)	Sol directo
IR-02							
IR-03							
CO-01	Abril – junio	1.Arado de disco 2.Inundación o riego pesado 3.Pasado de poli disco pesado 4.Rigido y riel 5.Surcado	Septiembre – Noviembre	NPK (Misti) 200U N 130U P 150-200U K	Gusano de tierra Elasmopalpus Caballada Cogollero Mazorquero (a veces)	1.Deshierbo químico (atrazina) 2.Herbicida de contacto (Paraquat) 3.Alfacipermetrina 4.Clorpirifos 5.Metomilo	Sol directo
CO-02							
CO-03							
CO-04							

Fuente: Encuesta realizada a los agricultores.

**Anexo 2. Condiciones Climáticas de las zonas de recolección durante la época de siembra.**

**Tabla 13.-** Chuquibamba: Periodo noviembre 2017 – mayo 2018

Código	Año	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY
HR 101	2017	45	60	-	-	-	-	-
	2018	-	-	73	81	73	66	45
PT 101	2017	0.0	7.3	-	-	-	-	-
	2018	-	-	24.1	21.1	16.3	10.1	0.0
TM 102	2017	17.9	17.7	-	-	-	-	-
	2018	-	-	17.0	16.3	17.4	17.0	18.8
TM 103	2017	4.7	4.9	-	-	-	-	-
	2018	-	-	5.0	4.8	5.5	4.9	4.3
VT 107 (SE)	2017	1,4	1,9	-	-	-	-	-
	2018	-	-	1.8	1.5	1.6	1.6	1.6

Fuente: SENAMI Arequipa

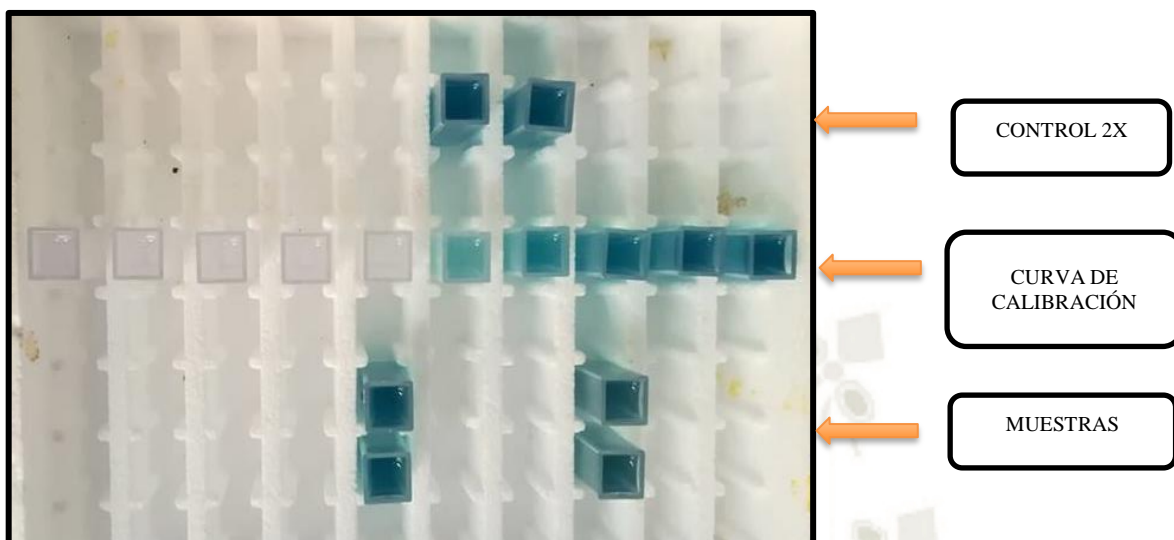
**Tabla 14.-** Aplao (Corire): Periodo abril 2017 – enero 2018

Código	Año	ABR	MAY	JUN	JUL	AGOS	SET	OCT	NOV	DIC	ENE
HR 101	2017	69	71	72	73	71	72	64	63	65	-
	2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65
PT 101	2017	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	-
	2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.0
TM 102	2017	30.4	26.6	25.2	24.3	24.8	26.3	29.0	29.5	29.8	-
	2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.1
TM 103	2017	15.8	12.9	9.9	8.5	7.5	10.2	11.0	12.4	14.9	-
	2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.4
VT 107 (SE)	2017	2.2	1.7	1.5	1.4	1.9	2.0	2.0	2.5	2.4	-
	2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.7

Fuente: SENAMI Arequipa

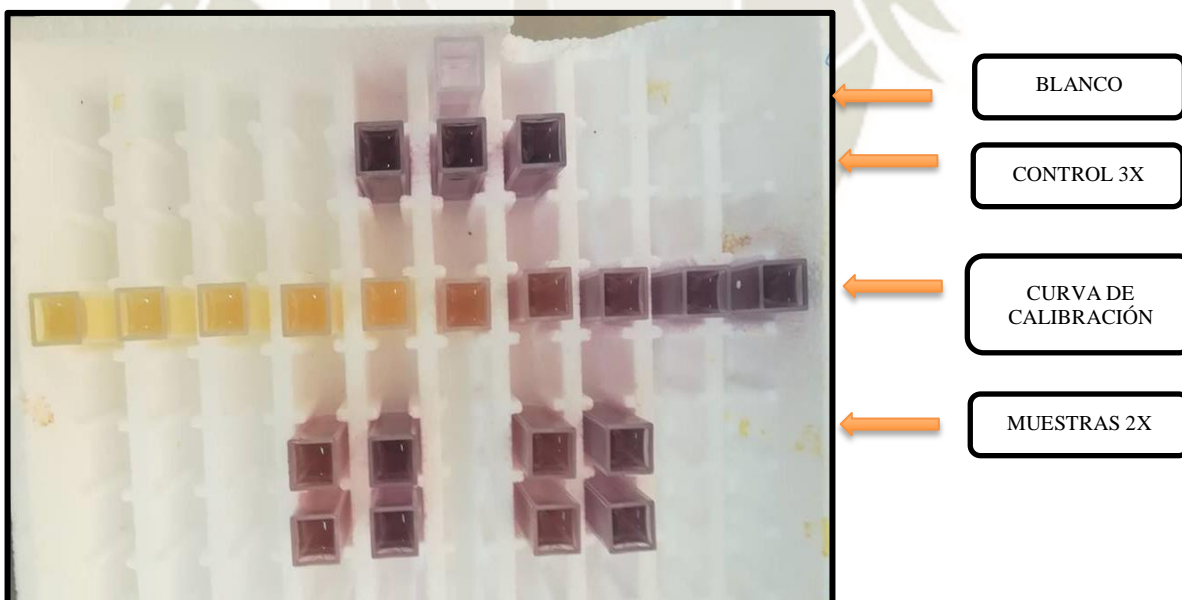
**Codificación:** HR101 (humedad relativa), PT101 (precipitación total mensual), TM102 (temperatura máxima), TM103 (temperatura mínima), VT107 (dirección (SE: Sur Este) y velocidad (m/s) del viento mensual).

**Anexo 3.- Ejemplo del método ABTS.**



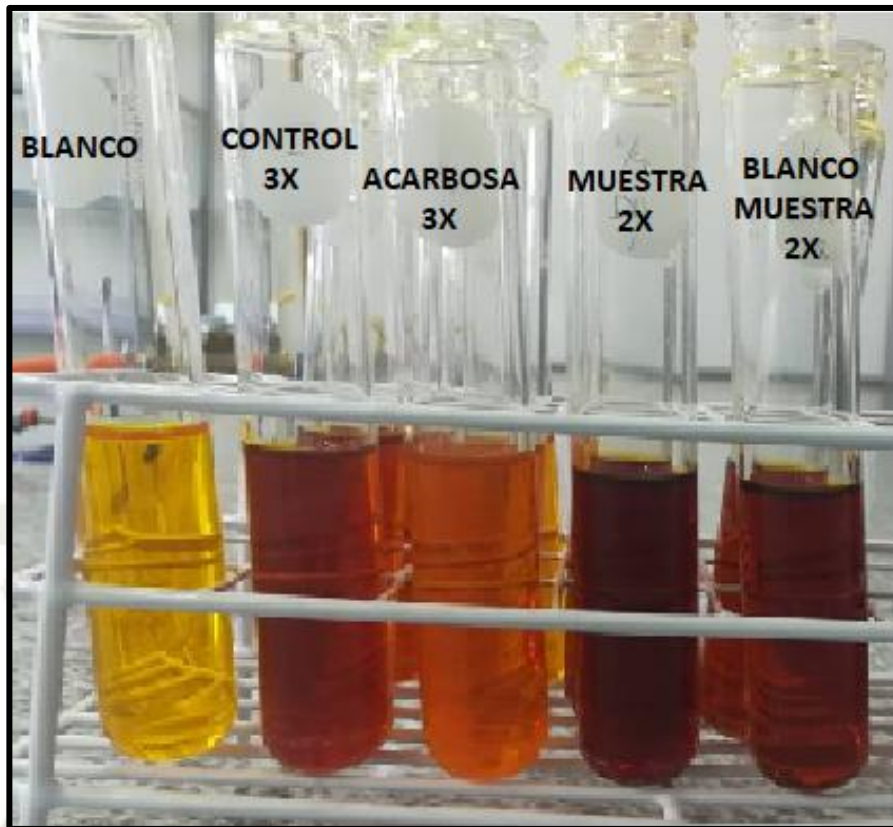
**Figura 18.- Método de inhibición del radical ABTS.**

**Anexo 4.- Ejemplo del método DPPH.**



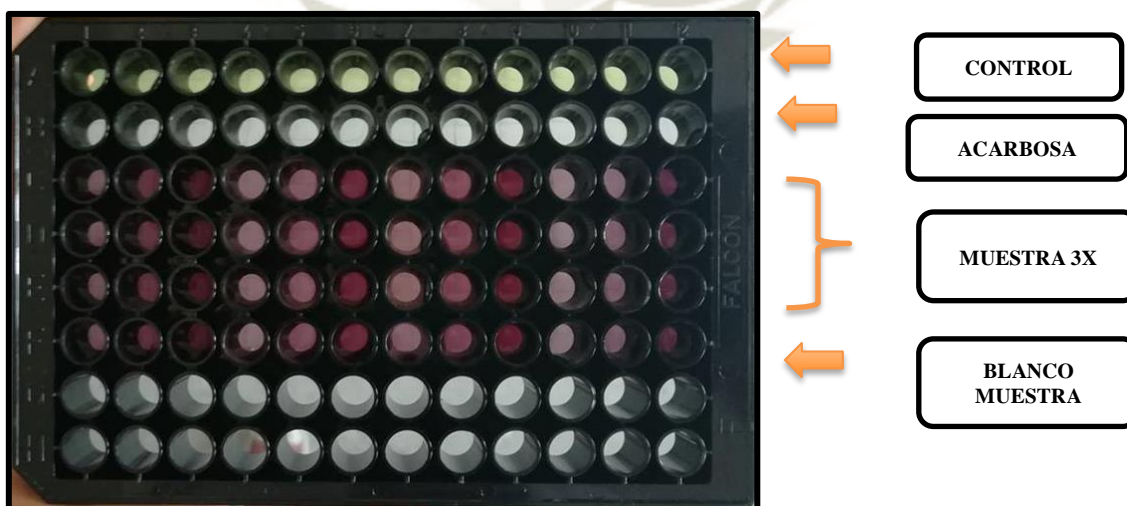
**Figura 19.- Método de inhibición del radical DPPH.**

**Anexo 5.-** Ejemplo del método de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa.



**Figura 20.-** Método de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa.

**Anexo 6.-** Ejemplo del método de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa.



**Figura 21.-** Método de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

**Anexo 7.- Resultados de la inhibición del radical libre ABTS.**

**Tabla 15.-** Resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre ABTS con extractos de la fracción fenólica libre del marlo.

Zona	Código	R1	R2	Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	18658.559	17039.136	17983.847	20909.274	2923.826
	IR-02	21564.825	20260.134	20912.480		
	IR-03	25448.223	22214.768	23831.496		
Chuquibamba	CH-01	30368.291	28214.615	29291.453	27564.585	1674.677
	CH-02	27231.703	24663.297	25947.500		
	CH-03	28084.720	26824.886	27454.803		
Corire	CO-01	20660.013	19455.989	20058.001	19722.021	3042.250
	CO-02	16634.239	15010.865	15822.552		
	CO-03	20048.677	19466.606	19757.641		
	CO-04	23538.002	22961.776	23249.889		

**Tabla 16.-** Resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre ABTS con extractos de la fracción fenólica libre del grano.

Zona	Código	R1	R2	Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	3622.413	3313.561	3467.987	3546.886	148.965
	IR-02	3888.337	3549.074	3718.706		
	IR-03	3692.956	3214.971	3453.963		
Chuquibamba	CH-01	3809.923	3343.145	3576.534	4076.321	501.329
	CH-02	4324.883	3821.618	4073.250		
	CH-03	4843.373	4314.985	4579.179		
Corire	CO-01	2896.025	2268.785	2582.405	2729.936	134.348
	CO-02	2851.681	2487.545	2669.613		
	CO-03	2879.273	2907.975	2893.624		
	CO-04	2873.085	2675.119	2774.102		

**Tabla 17.-** Resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre ABTS con extractos de la fracción fenólica ligada del marlo.

Zona	Código	R1	R2	Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	9169.640	8345.877	8757.758	9000.293	486.265
	IR-02	9847.240	9273.006	9560.123		
	IR-03	8685.672	8680.326	8682.999		
Chuquibamba	CH-01	9325.353	9255.190	9290.272	9737.305	600.038
	CH-02	10967.497	9871.026	10419.261		
	CH-03	9564.852	9439.912	9502.382		
Corire	CO-01	8914.511	7701.121	8307.816	8558.682	344.420
	CO-02	8730.650	7780.936	8255.793		
	CO-03	8956.687	8404.996	8680.842		
	CO-04	9109.662	8870.896	8990.279		

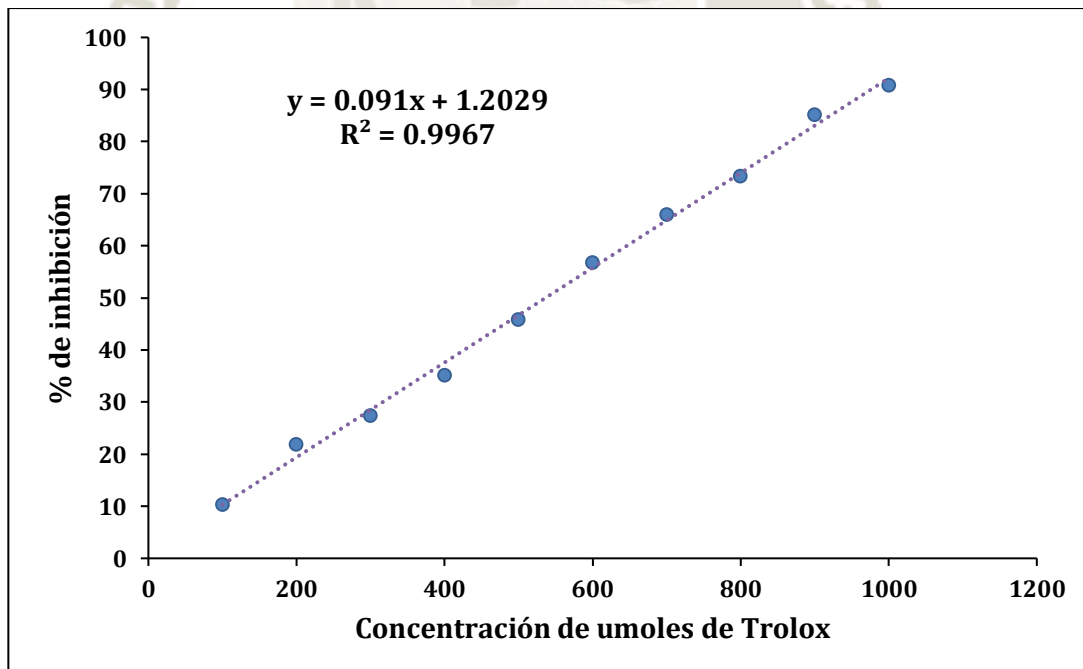
**Tabla 18.-** Resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre ABTS con extractos de la fracción fenólica ligada del grano.

Zona	Código	R1	R2	Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	1470.286	1321.346	1395.816	1372.385	21.502
	IR-02	1469.814	1237.296	1353.555		
	IR-03	1431.144	1304.427	1367.786		
Chuquibamba	CH-01	1554.215	1432.879	1493.547	1462.852	28.099
	CH-02	1582.227	1331.006	1456.617		
	CH-03	1530.657	1346.133	1438.395		
Corire	CO-01	1359.734	1294.248	1326.991	1281.513	51.462
	CO-02	1262.637	1183.414	1223.025		
	CO-03	1340.353	1166.817	1253.585		
	CO-04	1420.220	1224.684	1322.452		

**Anexo 8.-** Curva de calibración del método de inhibición *in vitro* del radical libre  
ABTS.

**Tabla 19.-** Curva de calibración para el ABTS.

Concentración	% de inhibición			
	1	2	3	Promedio
100	9.214	9.688	11.891	10.264
200	20.299	21.456	23.782	21.846
300	25.912	27.552	28.653	27.372
400	34.051	34.499	36.819	35.123
500	44.434	44.991	47.994	45.806
600	56.080	56.616	57.450	56.716
700	64.359	64.981	68.625	65.988
800	72.217	72.921	74.928	73.355
900	83.583	84.546	87.249	85.126
1000	90.879	90.784	90.688	90.784



**Figura 22.-** Curva de calibración para el ABTS.

**Anexo 9.- Análisis estadístico de los resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre ABTS.**

**Tabla 20.- Estadístico t-student para la inhibición del radical ABTs fracción libre.**

<b>Localidad</b>	<b>Grano</b>	<b>Marlo</b>
Valor -t	2.479	5.019
Valor-p	<b>0.033</b>	<b>0.001</b>
Iray	3546.886 ± 148.965	20909.274 ± 2923.826
Chuquibamba	4076.321 ± 501.329	27564.585 ± 1674.677

**Tabla 21.- Estadístico t-student para la inhibición del radical ABTs fracción ligada.**

<b>Localidad</b>	<b>Grano</b>	<b>Marlo</b>
Valor -t	3.879	2.026
Valor-p	<b>0.003</b>	<b>0.070</b>
Iray	1372.385 ± 21.502	9000.293 ± 486.265
Chuquibamba	1462.852 ± 28.099	9737.305 ± 600.038

**Tabla 22.- Estadístico t-student para la inhibición del radical ABTs total.**

<b>Localidad</b>	<b>Grano</b>	<b>Marlo</b>
Valor -t	2.132	2.776
Valor-p	<b>0.036</b>	<b>0.009</b>
Iray	4919.271 ± 134.151	29909.567 ± 2927.340
Chuquibamba	5539.173 ± 473.815	37301.890 ± 1147.010

**Anexo 10.- Resultados de la inhibición del radical libre DPPH.**

**Tabla 23.-** Resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre DPPH con extractos de la fracción fenólica libre del marlo.

Zona	Código	R1	R2	Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	3567.881	3421.382	3494.632	5068.642	1647.556
	IR-02	5137.614	4722.940	4930.277		
	IR-03	6900.872	6661.163	6781.017		
Chuquibamba	CH-01	7962.328	7494.407	7728.367	7163.493	567.216
	CH-02	6821.838	6366.089	6593.964		
	CH-03	7315.009	7021.285	7168.147		
Corire	CO-01	4795.517	4168.893	4482.205	4754.578	568.648
	CO-02	4460.774	4445.655	4453.214		
	CO-03	4626.708	4324.380	4475.544		
	CO-04	5521.733	5692.961	5607.347		

**Tabla 24.-** Resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre DPPH con extractos de la fracción fenólica libre del grano.

Zona	Código	R1	R2	Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	939.621	838.826	889.223	906.290	15.303
	IR-02	969.934	867.646	918.790		
	IR-03	957.743	863.971	910.857		
Chuquibamba	CH-01	1726.217	1611.314	1668.765	1677.551	28.679
	CH-02	1765.550	1543.035	1654.293		
	CH-03	1805.028	1614.162	1709.595		
Corire	CO-01	518.080	449.961	484.020	886.867	301.219
	CO-02	909.278	762.908	836.093		
	CO-03	1119.087	1013.937	1066.512		
	CO-04	1256.954	1064.731	1160.843		

**Tabla 25.-** Resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre DPPH con extractos de la fracción fenólica ligada del marlo.

Zona	Código	R1	R2	Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	2363.286	2284.903	2324.094	1929.962	371.942
	IR-02	1654.880	1515.373	1585.126		
	IR-03	1980.740	1780.592	1880.666		
Chuquibamba	CH-01	2410.606	2300.075	2355.340	2319.727	49.234
	CH-02	2426.522	2254.072	2340.297		
	CH-03	2291.848	2235.240	2263.544		
Corire	CO-01	1931.886	1872.685	1902.285	1839.709	184.689
	CO-02	2028.831	1892.600	1960.715		
	CO-03	1666.204	1463.790	1564.997		
	CO-04	1988.997	1872.685	1930.841		

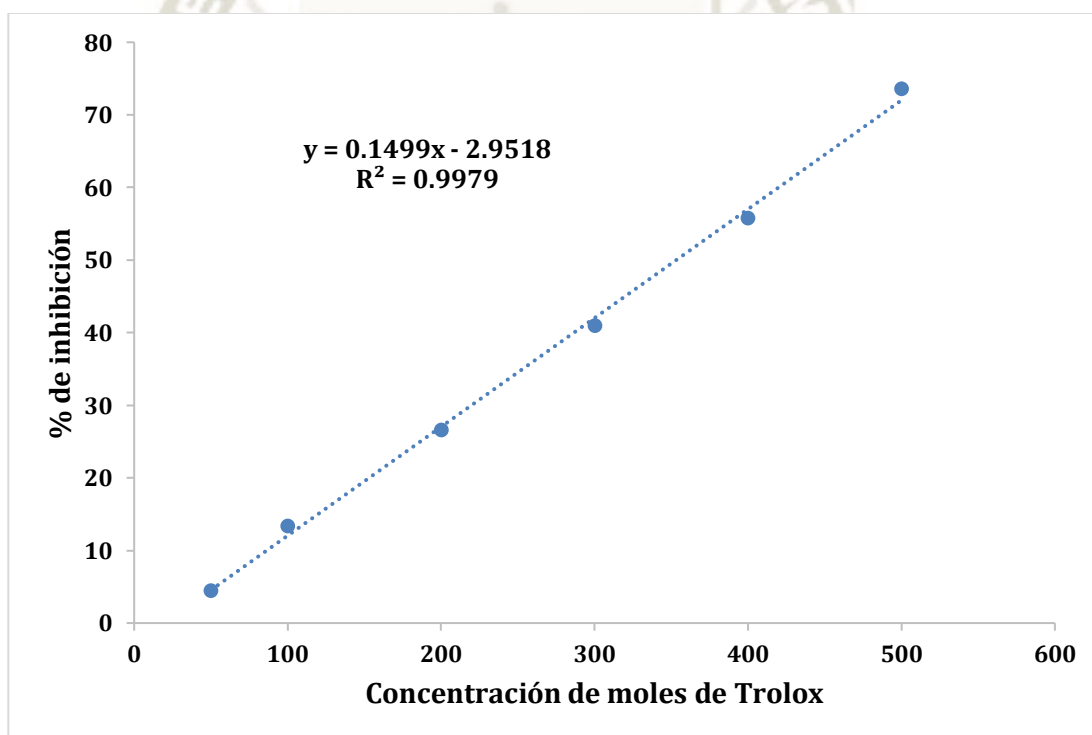
**Tabla 26.-** Resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre DPPH con extractos de la fracción fenólica ligada del grano.

Zona	Código	R1	R2	Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	244.795	209.607	227.201	274.709	44.245
	IR-02	342.330	287.148	314.739		
	IR-03	294.300	270.075	282.187		
Chuquibamba	CH-01	311.860	282.620	297.240	306.958	8.429
	CH-02	330.459	292.263	311.361		
	CH-03	333.262	291.286	312.274		
Corire	CO-01	229.474	195.547	212.510	239.290	37.147
	CO-02	221.702	212.313	217.007		
	CO-03	242.148	226.801	234.474		
	CO-04	307.921	278.415	293.168		

**Anexo 11.-** Curva de calibración para el método de inhibición *in vitro* del radical libre DPPH.

**Tabla 27.-** Curva de calibración para el DPPH.

Concentración	% de inhibición			
	1	2	3	Promedio
50	4.516	4.575	4.292	4.461
100	13.196	13.286	13.451	13.311
200	25.954	26.749	27.124	26.609
300	39.763	41.399	41.593	40.918
400	54.757	56.049	56.460	55.755
500	72.512	73.339	74.912	73.588



**Figura 23.-** Curva de calibración para el DPPH.

**Anexo 12.- Análisis estadístico de los resultados de la inhibición *in vitro* del radical libre DPPH.**

**Tabla 28.- Estadístico t-student para DPPH Fracción libre.**

Localidad	Grano	Marlo
Valor -t	42.703	3.147
Valor-p	1.1903x10 <sup>-12</sup>	0.010
Iray	906.290 ± 15.303	5068.642 ± 1647.556
Chuquibamba	1677.551 ± 28.679	7163.493 ± 567.216

**Tabla 29.- Estadístico t-student para DPPH fracción ligada.**

Localidad	Grano	Marlo
Valor -t	1.753	2.788
Valor-p	0.110	0.019
Iray	274.709 ± 44.245	1929.962 ± 371.942
Chuquibamba	306.958 ± 8.429	2319.727 ± 49.234

**Tabla 30.- Estadístico t-student para DPPH total.**

Localidad	Grano	Marlo
Valor -t	4.303	3.182
Valor-p	0.031	0.0002
Iray	1180.999 ± 59.474	6998.604 ± 1481.794
Chuquibamba	1984.509 ± 32.354	9483.220 ± 576.452

**Anexo 13.- Control positivo de inhibición de las enzimas digestivas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa utilizando acarbosa.**

El procedimiento se realizó según lo indicado por Worthington V. et al. (56) y modificado por Gonzales A. et al. (1). Donde la acarbosa se preparó a una concentración de 1 mg/ml y 5 mg/ml para el caso de la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa respectivamente, luego se procedió a trabajar de la misma manera que con las muestras para ambos casos.

**Tabla 31.- Control positivo con acarbosa para la  $\alpha$ -amilasa.**

Repetición	% de inhibición	Promedio
1	86.104	84.757
2	86.270	
3	85.360	
4	86.104	
5	86.270	
6	85.360	
7	82.419	
8	83.077	
9	83.641	
10	82.967	

**Tabla 32.- Control positivo con acarbosa para la  $\alpha$ -glucosidasa.**

Repetición	% de inhibición	Promedio
1	86.677	86.717
2	86.438	
3	86.404	
4	85.647	
5	87.460	
6	86.929	
7	87.480	
8	86.794	
9	86.992	
10	86.352	

**Anexo 14.- Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa.**

**Tabla 33.-** Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa con extractos de la fracción fenólica libre de marlo.

Zona	Código	Peso (mg)	% inhibición		Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	25.0	17.228	19.382	18.305	18.162	5.129
	IR-02		13.568	11.055	12.312		
	IR-03		23.689	21.348	22.519		
	IR-01	12.5	8.786	8.355	8.570	10.336	2.603
	IR-02		8.403	7.756	8.079		
	IR-03		13.819	11.809	12.814		
	IR-01	10.0	6.374	8.699	7.537	8.119	1.534
	IR-02		7.849	6.279	7.064		
	IR-03		10.134	9.715	9.925		
Chuquibamba	CH-01	25.0	47.029	36.333	41.681	30.646	11.525
	CH-02		26.316	25.891	26.104		
	CH-03		18.593	19.765	19.179		
	CH-01	12.5	25.373	23.090	24.232	20.325	3.931
	CH-02		16.181	17.027	16.604		
	CH-03		19.421	18.114	18.768		
	CH-01	10.0	22.476	20.632	21.554	16.235	5.172
	CH-02		11.289	13.452	12.371		
	CH-03		14.939	10.738	12.838		
Corire	CO-01	25.0	19.440	18.081	18.761	15.897	4.657
	CO-02		20.289	19.949	20.119		
	CO-03		10.218	9.213	9.715		
	CO-04		13.735	16.248	14.992		
	CO-01	12.5	9.031	7.620	8.325	10.944	2.730
	CO-02		15.189	13.521	14.355		
	CO-03		8.964	8.777	8.870		
	CO-04		10.594	9.647	10.121		
	CO-01	10.0	6.115	3.481	4.798	8.370	3.023
	CO-02		12.116	11.853	11.984		
	CO-03		6.723	7.563	7.143		
	CO-04		8.527	9.130	8.829		

**Tabla 34.-** Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa con extractos de la fracción fenólica libre de grano.

Zona	Código	Peso (mg)	% inhibición		Promedio	Promedio	DS	
Iray	IR-01	125.0	15.840	17.755	16.797	15.248	1.683	
	IR-02		15.370	12.963	14.167			
	IR-03		14.534	12.794	13.664			
	IR-01	62.5	14.227	12.986	13.606	9.632	4.447	
			IR-02	4.991	4.436			4.713
			IR-03	9.677	8.933			9.305
	IR-01	50.0	8.437	7.031	7.734	5.877	2.375	
			IR-02	2.495	3.882			3.189
			IR-03	6.700	6.617			6.658
Chuquibamba	CH-01	125.0	24.195	20.714	22.454	21.870	1.461	
	CH-02		22.802	21.323	22.063			
	CH-03		18.611	17.407	18.009			
	CH-01	62.5	14.737	16.651	15.694	14.623	2.537	
			CH-02	16.746	14.545			15.646
			CH-03	12.384	10.166			11.275
	CH-01	50.0	13.589	13.014	13.301	11.681	2.045	
			CH-02	11.196	9.474			10.335
			CH-03	10.259	8.503			9.381
Corire	CO-01	125.0	20.888	21.410	21.149	23.097	3.543	
	CO-02		22.367	23.064	22.715			
	CO-03		20.463	20.185	20.324			
	CO-04		26.632	29.765	28.198			
	CO-01	62.5	6.297	7.801	7.049	10.805	2.792	
			CO-02	10.996	9.398			10.197
			CO-03	11.798	12.453			12.125
			CO-04	14.128	12.844			13.486
	CO-01	50.0	4.793	5.733	5.263	8.919	2.592	
			CO-02	7.707	7.331			7.519
			CO-03	11.891	9.270			10.581
			CO-04	11.284	9.908			10.596

**Tabla 35.-** Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa con extractos de la fracción fenólica ligada de marlo.

Zona	Código	Peso (mg)	%inhibición	Promedio	DS
Iray	IR-01	10	2.210	2.118	0.513
	IR-02	10	1.565		
	IR-03	10	2.578		
Chuquibamba	CH-01	10	5.985	4.113	1.638
	CH-02	10	3.407		
	CH-03	10	2.947		
Corire	CO-01	10	-1.934	1.964	2.838
	CO-02	10	0.460		
	CO-03	10	4.880		
	CO-04	10	0.552		

**Tabla 36.-** Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa con extractos de la fracción fenólica ligada de grano.

Zona	Código	Peso (mg)	%inhibición	Promedio	DS
Iray	IR-01	50	1.281	0.519	0.661
	IR-02	50	0.184		
	IR-03	50	0.092		
Chuquibamba	CH-01	50	1.657	0.675	0.870
	CH-02	50	0.000		
	CH-03	50	0.368		
Corire	CO-01	50	2.013	1.898	1.987
	CO-02	50	4.666		
	CO-03	50	0.549		
	CO-04	50	0.366		

**Anexo 15.- Análisis estadístico de los resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa**

**Tabla 37.- Análisis estadístico para comparación del porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa fracción libre de marlo.**

		CONCENTRACIÓN		
		25	12.5	10
<b>Marlo</b>	Valor-t	2.329	5.644	3.517
	Valor-p	0.042	0.00021	0.0122
	Iray	18.162 $\pm$ 4.994	10.336 $\pm$ 2.552	8.119 $\pm$ 1.721
	Chuquibamba	30.646 $\pm$ 11.39	20.325 $\pm$ 3.804	16.235 $\pm$ 5.142

**Tabla 38.- Análisis estadístico para comparación del porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa fracción libre de grano.**

		CONCENTRACIÓN		
		125	62.5	50
<b>Grano</b>	Valor-t	4.636	2.577	4.228
	Valor-p	0.0009	0.028	0.002
	Iray	15.248 $\pm$ 1.960	9.632 $\pm$ 4.206	5.860 $\pm$ 2.324
	Chuquibamba	21.870 $\pm$ 2.650	14.623 $\pm$ 2.674	11.006 $\pm$ 2.094

**Tabla 39.- Estadístico t-student para el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa fracción ligada.**

Grupos	Iray	Chuquibamba
Valor -t	-3.309	-3.211
Valor-p	0.029	0.034
Grano (50 mg)	0.519 $\pm$ 0.661	0.675 $\pm$ 0.870
Marlo (10 mg)	2.118 $\pm$ 0.513	4.113 $\pm$ 1.638

**Tabla 40.-** Estadístico t-student para el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa fracción ligada.

Grupos	Grano (50 mg)	Marlo (10 mg)
Valor -t	0.248	2.014
Valor-p	0.817	0.114
Iray	0.519 $\pm$ 0.661	2.118 $\pm$ 0.513
Chuquibamba	0.675 $\pm$ 0.870	4.113 $\pm$ 1.638



**Anexo 16.- Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.**

**Tabla 41.-** Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con extractos de la fracción fenólica libre de marlo.

Zona	Código	Peso (mg)	% Inhibición			Promedio	Promedio	DS	
Iray	IR-01	1.25	96.566	96.835	96.633	96.678	95.014	2.690	
	IR-02		89.900	90.568	90.818	90.428			
	IR-03		98.413	98.016	97.381	97.937			
	IR-01	0.70	93.800	93.727	93.655	93.727	91.858	3.156	
			IR-02	85.984	86.803	86.639			86.475
			IR-03	95.370	95.146	95.594			95.370
	IR-01	0.50	90.927	91.667	91.398	91.331	89.450	3.660	
			IR-02	82.943	83.508	83.347			83.266
			IR-03	93.830	93.905	93.529			93.755
Chuquibamba	CH-01	1.25	95.559	96.431	96.511	96.167	92.488	5.291	
	CH-02		82.905	83.949	83.307	83.387			
	CH-03		98.413	97.243	98.079	97.911			
	CH-01	0.70	93.242	94.208	94.449	93.966	88.484	7.448	
			CH-02	74.553	76.504	75.935			75.664
			CH-03	96.866	95.956	94.641			95.821
	CH-01	0.50	91.399	91.399	92.363	91.720	83.439	10.605	
			CH-02	64.548	65.444	65.363			65.118
			CH-03	93.601	91.590	95.247			93.480
Corire	CO-01	1.25	94.951	95.040	95.660	95.217	96.599	1.843	
	CO-02		97.110	95.709	95.271	96.030			
	CO-03		98.747	100.537	98.657	99.314			
	CO-04		96.377	94.475	96.649	95.833			
	CO-01	0.70	92.415	93.287	93.200	92.967	93.428	3.020	
			CO-02	92.491	92.125	91.758			92.125
			CO-03	97.707	97.707	97.884			97.766
			CO-04	90.497	91.030	91.030			90.853
	CO-01	0.50	89.965	89.529	89.878	89.791	91.374	2.372	
			CO-02	90.575	90.575	90.485			90.545
			CO-03	94.723	95.528	94.454			94.902
			CO-04	90.522	89.739	90.522			90.261

**Tabla 42.-** Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con extractos de la fracción fenólica libre de grano.

Zona	Código	Peso (mg)	% Inhibición			Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	6.25	81.616	83.635	82.521	82.591	70.671	7.939
	IR-02		58.851	58.665	58.851	58.789		
	IR-03		71.645	69.986	70.274	70.635		
	IR-01	3.60	73.072	73.748	72.395	73.072	58.908	8.570
	IR-02		47.335	48.329	48.871	48.178		
	IR-03		52.946	56.333	57.143	55.474		
	IR-01	2.50	62.989	63.915	66.406	64.437	49.992	8.833
	IR-02		37.984	38.434	39.154	38.524		
	IR-03		45.758	47.426	47.861	47.015		
Chuquibamba	CH-01	6.25	66.667	67.918	66.756	67.113	67.069	1.935
	CH-02		63.727	64.182	64.636	64.182		
	CH-03		69.911	69.732	70.089	69.911		
	CH-01	3.60	53.461	52.459	54.189	53.370	54.917	2.755
	CH-02		50.919	51.746	53.125	51.930		
	CH-03		59.006	58.474	60.870	59.450		
	CH-01	2.50	45.018	46.125	46.771	45.972	45.768	1.292
	CH-02		44.151	42.830	45.377	44.119		
	CH-03		48.310	45.819	47.509	47.212		
Corire	CO-01	6.25	61.111	64.087	64.881	63.360	73.195	7.596
	CO-02		72.348	72.917	72.538	72.601		
	CO-03		81.731	81.346	82.019	81.699		
	CO-04		75.405	75.214	74.738	75.119		
	CO-01	3.60	50.857	51.238	54.476	52.190	61.159	7.215
	CO-02		59.942	61.100	58.494	59.846		
	CO-03		67.960	70.945	69.751	69.552		
	CO-04		62.701	62.701	63.739	63.047		
	CO-01	2.50	41.611	40.379	42.559	41.517	50.844	8.704
	CO-02		47.980	48.586	46.970	47.845		
	CO-03		60.969	61.918	63.913	62.267		
	CO-04		51.431	52.004	51.813	51.749		

**Tabla 43.-** Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con extractos de la fracción fenólica ligada de marlo.

Zona	Código	Peso (mg)	% Inhibición			Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	1.00	22.562	23.448	21.970	22.660	16.361	3.814
	IR-02		11.765	11.475	11.668	11.636		
	IR-03		14.202	14.105	16.051	14.786		
	IR-01	0.50	-	-	-	-	-	-
	IR-02		-	-	-	-		
	IR-03		-	-	-	-		
	IR-01	0.25	-	-	-	-	-	-
	IR-02		-	-	-	-		
	IR-03		-	-	-	-		
Chuquibamba	CH-01	1.00	36.467	37.377	36.998	36.947	29.945	6.247
	CH-02		21.816	15.696	21.224	19.579		
	CH-03		32.830	34.415	32.679	33.308		
	CH-01	0.50	4.691	4.378	5.551	4.874	6.973	2.969
	CH-02		-	-	-	-		
	CH-03		7.776	10.109	9.331	9.072		
	CH-01	0.25	3.701	3.392	2.930	3.341	4.048	1.000
	CH-02		-	-	-	-		
	CH-03		4.955	2.027	7.282	4.755		
Corire	CO-01	1.00	15.774	18.056	17.758	17.196	12.768	3.898
	CO-02		6.917	8.103	8.696	7.905		
	CO-03		13.385	9.796	12.609	11.930		
	CO-04		10.808	12.929	18.384	14.040		
	CO-01	0.50	-	-	-	-	-	-
	CO-02		-	-	-	-		
	CO-03		-	-	-	-		
	CO-04		-	-	-	-		
	CO-01	0.25	-	-	-	-	-	-
	CO-02		-	-	-	-		
	CO-03		-	-	-	-		
	CO-04		-	-	-	-		

**Tabla 44.-** Resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con extractos de la fracción fenólica ligada de grano.

Zona	Código	Peso (mg)	% Inhibición			Promedio	Promedio	DS
Iray	IR-01	5.00	6.589	8.272	4.685	6.515	5.383	1.381
	IR-02		3.711	3.024	6.873	4.536		
	IR-03		4.162	4.266	6.868	5.099		
Chuquibamba	CH-01	5.00	1.655	6.134	7.595	5.128	7.173	3.903
	CH-02		1.729	4.374	3.357	3.154		
	CH-03		10.711	13.365	15.640	13.239		
Corire	CO-01	5.00	1.449	2.208	1.725	1.794	1.06	1.11
	CO-02		-0.353	-0.071	0.989	0.188		
	CO-03		1.330	3.149	2.169	2.216		
	CO-04		-2.511	2.654	-0.072	0.024		



**Anexo 17.- Análisis estadístico de los resultados de la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa**

**Tabla 45.-** Análisis estadístico para comparación de porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa fracción libre de marlo.

		CONCENTRACIÓN		
		1.25	0.7	0.5
<b>Marlo</b>	Valor-t	-0.981	-0.962	-1.235
	Valor-p	0.341	0.357	0.245
	Iray	95.014 $\pm$ 2.691	91.858 $\pm$ 3.156	89.450 $\pm$ 3.661
	Chuquibamba	92.488 $\pm$ 5.292	88.48 $\pm$ 7.44	83.439 $\pm$ 10.606

**Tabla 46.-** Análisis estadístico para comparación de porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa fracción libre de grano.

		CONCENTRACIÓN		
		6.25	3.6	2.5
<b>Grano</b>	Valor-t	-1.017	-1.022	-1.091
	Valor-p	0.336	0.332	0.306
	Iray	70.672 $\pm$ 7.939	58.908 $\pm$ 8.571	49.992 $\pm$ 8.833
	Chuquibamba	67.069 $\pm$ 1.935	54.917 $\pm$ 2.755	45.768 $\pm$ 1.292

**Tabla 47.-** Estadístico t-student para el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa fracción ligada.

Grupos	Iray	Chuquibamba
Valor -t	-6.240	-7.128
Valor-p	0.000	0.000
Grano (5 mg)	5.383 $\pm$ 1.381	7.173 $\pm$ 3.903
Marlo (1 mg)	16.360 $\pm$ 3.814	29.945 $\pm$ 6.247

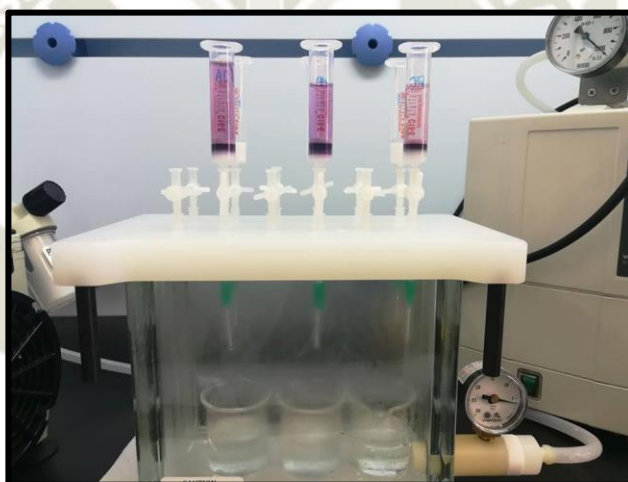
**Tabla 48.-** Estadístico t-student para el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa fracción ligada.

Grupos	Grano (5 mg)	Marlo (1 mg)
Valor -t	0.997	4.278
Valor-p	0.334	0.0005
Iray	5.383 $\pm$ 1.381	16.361 $\pm$ 3.814
Chuquibamba	7.173 $\pm$ 3.903	29.945 $\pm$ 6.247



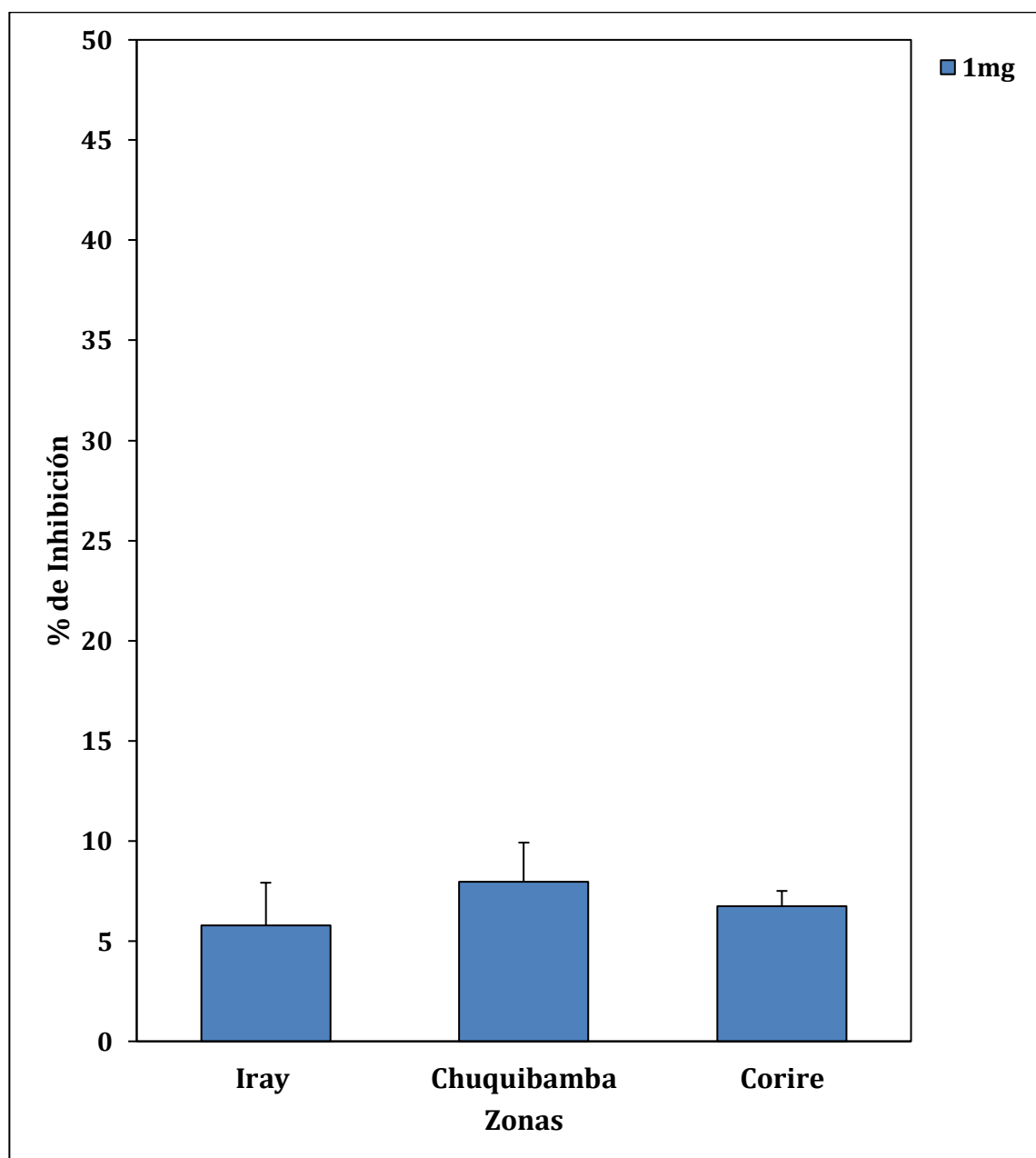
**Anexo 18. Purificación de la fracción fenólica libre por extracción en fase sólida (SPE).**

La purificación de polifenoles se realizó a través del método de Rodríguez-Saona et al. (108). Se acondicionó la columna SPE C18 con 12 ml de metanol 0.01 % HCl, luego se adicionó 18 ml de H<sub>2</sub>O 0.01 % HCl. Colocar 100 µl del extracto de la fracción fenólica libre (marlo), la muestra se lavó con 12 ml de H<sub>2</sub>O 0.01% HCl y finalmente se eluyó la muestra con 12 ml de metanol p.a. La elución se llevó a rota evaporación a 40°C hasta sequedad. Se resuspendió en 5 ml de agua ultra pura y se almacenó a -18 °C.

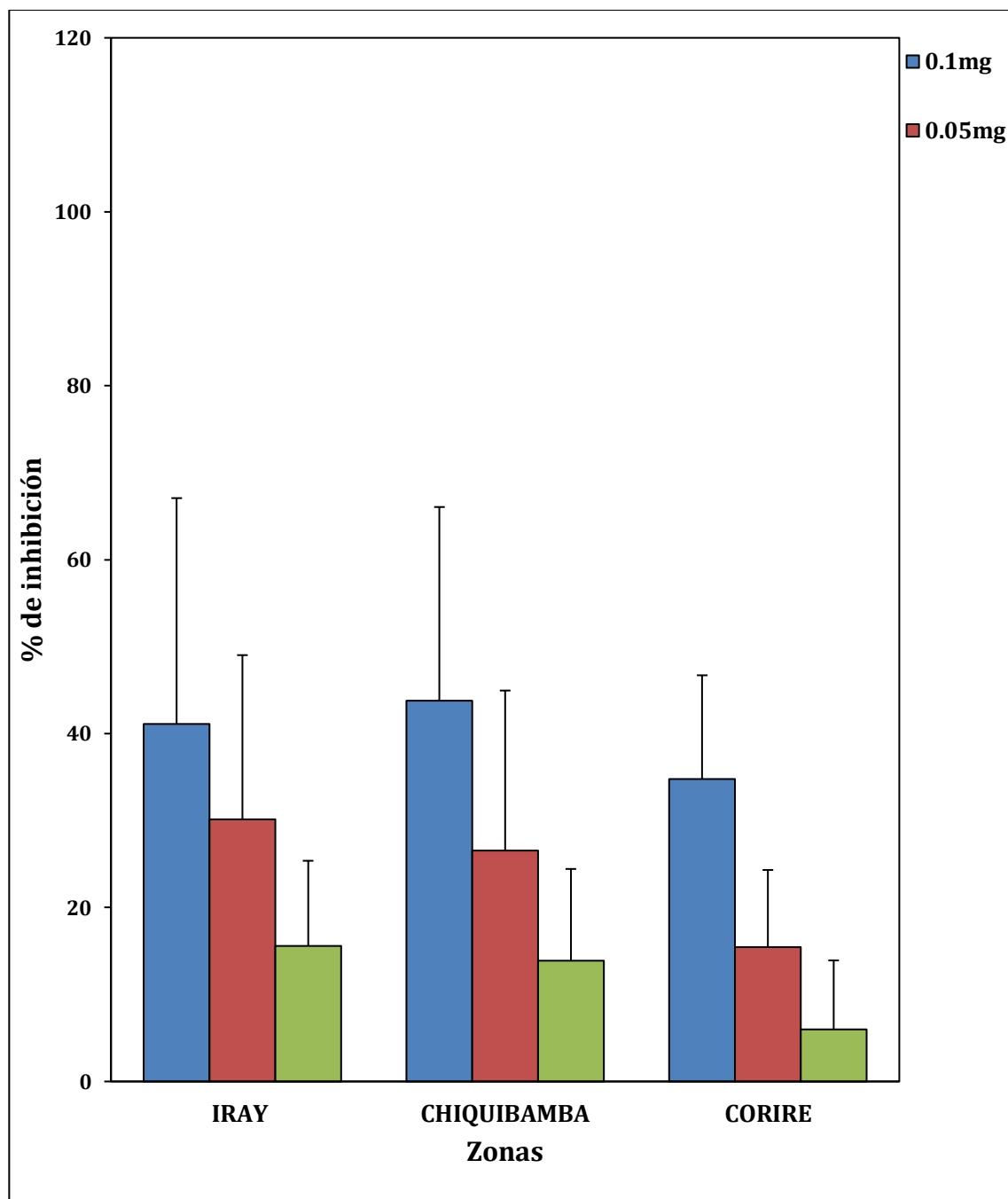


**Figura 24.-** Equipo Manifold con bomba de vacío utilizado para la purificación de la fracción fenólica libre del marlo usando columnas SPE C18.

**Anexo 19. Resultados de inhibición de enzimas con extractos de antocianinas a partir de marlo.**

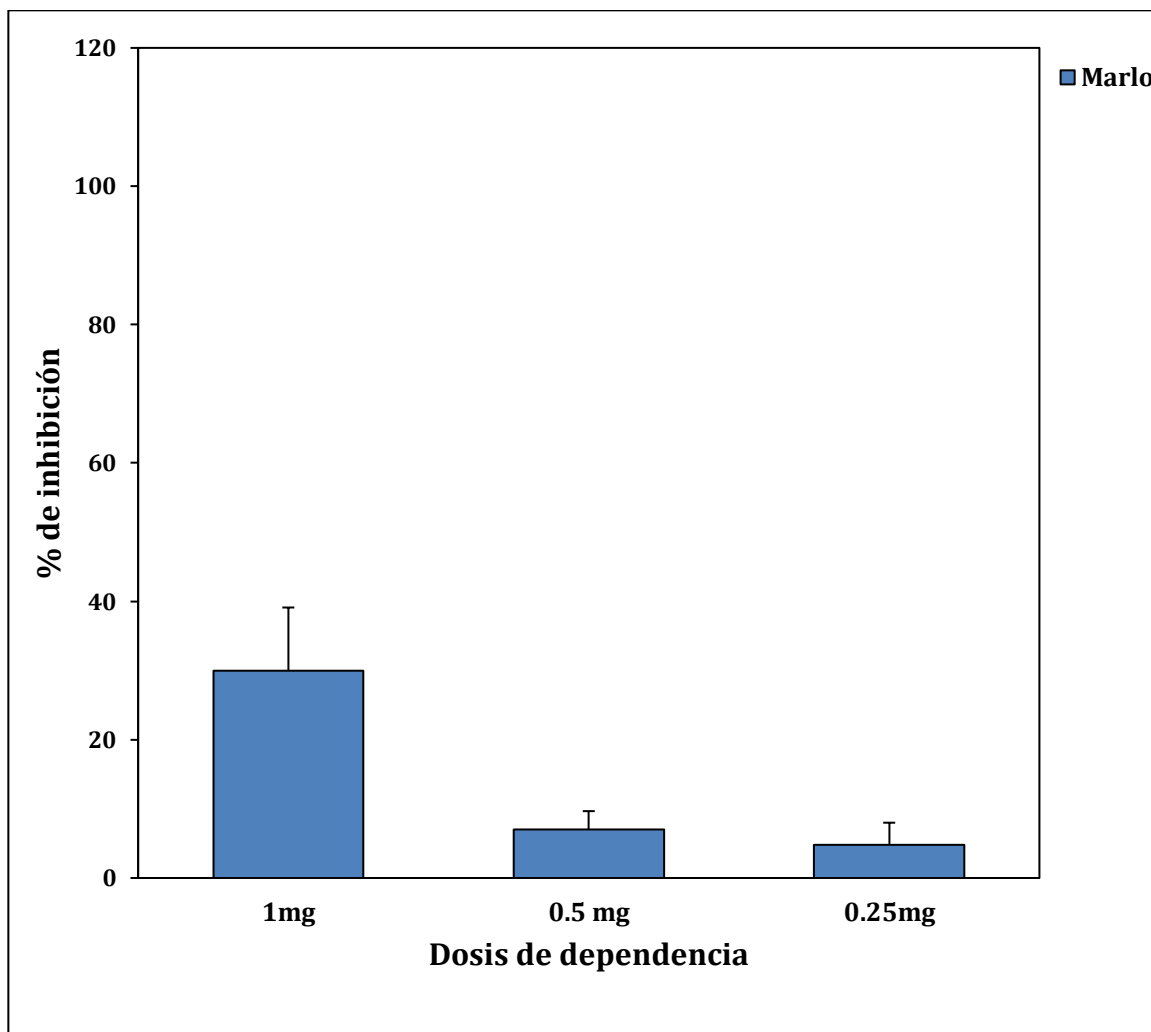


**Figura 25.-** Inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa por extractos de antocianinas del marlo pre-purificada por extracción en fase sólida.



**Figura 26.-** Inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por extractos de antocianinas del marlo pre-purificada por extracción en fase sólida.

**Anexo 20. Resultados de inhibición de la enzima  $\alpha$ - glucosidasa con extractos de la fracción ligada provenientes de marlo de la región Chuquibamba.**



**Figura 27.-** Inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por extractos de marlo.