

Bioactividad de compuestos fenólicos de huitlacoche (*Ustilago maydis*)

L.X. López-Martínez¹ y R. Baeza-Jiménez²

¹CONACyT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carr. a El Dorado Km 5.5. 80110. Culiacán, Sinaloa, México. ²División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa San José 2055. Col. Lomas 4ª Sección. 78216. San Luis Potosí, SLP, México. **E-mail:** lomarleticia@gmail.com

RESUMEN:

El huitlacoche son las agallas (tumores) comestibles inducidas por *Ustilago maydis* en las mazorcas de maíz, consumido tradicionalmente en México y considerado como una alternativa alimenticia ya que es una fuente rica de ácidos grasos esenciales, proteínas y fitoquímicos de naturaleza fenólica que se han asociado con la capacidad de prevenir enfermedades degenerativas como la diabetes, que se caracteriza por un estado de hiperglicemia y produce complicaciones relacionadas con el estrés oxidativo como camino común asociado a las patologías que se desarrollan en esta enfermedad. En el presente trabajo, se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante e inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa de extractos acuosos y metanólicos de huitlacoche. El contenido de compuestos fenólicos totales fue 222.19 y 661.45 mgEAG/100 g, la actividad antioxidante por el método del DPPH[•] se encontró de 623.56 3 y 5151.37 (mmoles TE/100 g), para el método ORAC 9,672.31 y 33,205.7 μ MOL TE/100 g en extractos acuosos y metanólicos, respectivamente. Los extractos metanólicos inhibieron la actividad α -glucosidasa (55%) y α -amilasa (12%) mientras que los extractos acuosos fueron menos efectivos. Las diferencias encontradas en las actividades estudiadas parecen depender del perfil único de compuestos fenólicos que poseen cada uno de los extractos.

Palabras clave: bioactividad, compuestos fenólicos, huitlacoche

ABSTRACT:

Huitlacoche is the edible galls (tumors) produced by the basidiomycete fungus *Ustilago maydis* on maize (*Zea mays* L.) ears. Contains many phenolic compounds associated with the capacity to diminish the risk of contracting degenerative diseases such as diabetes, characterized by hyperglycemia and is related to the development of complications which point at oxidative stress as the common way from which the different mechanism of associated pathogenesis diverges. In this study, we determined the total phenolic content, antioxidant capacity and the inhibition of α -glucosidase and α -amylase from aqueous and methanolic extracts from huitlacoche. The total phenolic content was 222.19 y 661.45 mgEAG/100 g, the antioxidant capacity by DPPH[•] was 623.56 3 y 5151.37 (mmoles TE/100 g), ORAC 9,672.31 y 33,205.7 μ MOL TE/100 g aqueous and methanolic extracts respectively. All methanolic extracts showed capacity of inhibition for α -glucosidase (55%) and α -amylase (12%) % respectively while the aqueous extracts showed less effectiveness. Differences in antioxidant activity and inhibition appeared to be dependent on the unique profile of phenolic compounds in the extracts.

Keywords: Bioactivities, phenolic compounds, huitlacoche

INTRODUCCIÓN

Uno de los enfoques terapéuticos para disminuir la hiperglicemia postprandial es retardar la absorción de la glucosa a través de la inhibición de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos como α -glucosidasa y α -amilasa. Estudios epidemiológicos han demostrado que dietas ricas en vegetales pueden reducir el riesgo de una amplia variedad de enfermedades incluyendo a la diabetes, debido a la presencia de compuestos de naturaleza fenólica.

Los hongos comestibles han sido muy apreciados como parte de la dieta humana y se consumen principalmente en el Sureste de Asia, Europa y México debido a sus atributos sensoriales y nutricionales. De las 2000 especies que se conocen, solamente 22 son cultivadas comercialmente, entre ellos: *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus sp.*, *Auricularis sp.*, *Tuber melanosporum* y *Marchela esculenta* (Huerta, 2013).

En México, y otros países de Latinoamérica el huitlacoche se consume tradicionalmente como un hongo comestible; en la actualidad es considerado una alternativa alimenticia, ya que en diferentes países es apreciado como una delicadeza culinaria comparada con las trufas y se le ha llamado caviar azteca debido a su sabor único. El huitlacoche son las agallas jóvenes que el hongo basidiomiceto *Ustilago maydis* induce en las mazorcas inmaduras de maíz (*Zea mays* L.). Este hongo es una buena fuente de proteínas, ácidos grasos esenciales, carbohidratos y compuestos de naturaleza fenólica (Paredes-Lopez y col., 2013).

A la fecha, los estudios dirigidos a la caracterización de fitoquímicos presentes en huitlacoche son escasos, por lo cual es importante profundizar en el conocimiento de la composición de este hongo, generando información que lo avale como un alimento funcional y nutraceutico.

De esta manera, se generará nueva información que contribuya a la promoción del consumo del huitlacoche, así como su revaloración en la dieta de la población de todo el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron muestras de huitlacoche de mercados municipales del Estado en los meses de febrero y marzo de 2017. Las muestras se limpiaron, liofilizaron y molieron hasta lograr un polvo fino y se almacenaron en la oscuridad a 4°C hasta el momento de ser utilizadas.

Obtención de los extractos crudos

La extracción acuosa se realizó pesando 4 g de muestra en un tubo de 40 mL y se adicionaron 25 mL de agua destilada y se agitaron durante 12 h con agitación constante, después de ese tiempo las muestras fueron filtradas con papel filtro Whatman No. 2, y los filtrados se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min, se retiraron los sobrenadantes y fueron almacenados a 4°C hasta el momento de ser analizados. Para la preparación de los extractos metanólicos se colocaron 14 g de muestra en un tubo de 40 mL y se adicionaron 25 mL de una mezcla metanol:agua (95:5 v/v) y se mantuvieron en agitación constante a 25°C durante 12 h, después de ese tiempo las muestras fueron filtradas, se colectaron los filtrados y se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 min a 4°C, se retiraron los sobrenadantes y se eliminó el solvente en un rotavapor a 45°C. Los extractos obtenidos fueron almacenados a 4°C hasta el momento de ser analizados.

Compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos fue determinado por el método de Gao y col. (2002), con ligeras modificaciones. 15 μL de los extractos se colocaron en una placa (Costar™, EEUU) y fueron diluidos en 240 μL de agua destilada, se adicionaron 15 μL del reactivo de Folín-Ciocalteu (2N), se mezclaron y reposaron por 3 minutos a 25°C, posteriormente se adicionó 30 μL de Na_2CO_3 (4N) y la mezcla reposó durante 120 minutos en la oscuridad, después de ese tiempo se determinó la absorbancia a 725 nm utilizando un lector de microplatos (Synergy HT, BioTek™, Inc, EEUU). Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como mg de ácido gálico/100 g de muestra.

Capacidad Antioxidante (Método ORAC)

La capacidad de los extractos para absorber especies reactivas de oxígeno fue determinada por el método de Huang y col. (2002). A partir de los extractos se realizaron diluciones (10:1990 μL , v/v) con amortiguador de fosfatos 75 mM (pH 7.4). 25 μL de la muestra, amortiguador de fosfatos como blanco, 25 μL y 25 μL de una curva estándar de trolox 400 μM fueron colocadas en una microplaca de paredes oscuras y fondo claro. El lector de microplacas fue programado para dispensar 200 μL de fluoresceína 0.96 μM y 75 μL del radical libre 2,2'-azobis,2-amidino-propano dihidrocloro (AAPH) 95.8 μM , iniciando la reacción una vez adicionado este último reactivo, midiendo la fluorescencia por 70 min con intervalos de 70 s, a una longitud de onda para excitación de 485 nm y para emisión de 580 nm. El efecto protector de las muestras se calculó restando el área integrada neta bajo la curva del control y la zona bajo la curva de la muestra [$\text{AUC}_{\text{simple}} - \text{AUC}_{\text{control}}$]. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por g de peso seco (mg TEg^{-1}).

Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

El ensayo para medir la inhibición de la actividad α -glucosidasa de los extractos fue adaptado de Yuan y col. (2012). Una mezcla de 50 μL de los extractos, 100 μL de amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 6.9 y 100 μL de una solución de α -glucosidasa de levadura *S. cerevisiae* (67 mU/ensayo) se incubaron en un plato de 96 pozos a 25°C durante 10 min, después de ese tiempo, se adicionaron 100 μL de una solución de *p*-nitrofenil α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) 0.1 M en amortiguador de fosfatos pH 6.9 a cada pozo. Esta mezcla fue nuevamente incubada a 25°C durante 10 min. La absorbancia fue determinada a 405 nm en un lector de microplatos. Los cambios en la absorbancia fueron determinados antes de la incubación y después de 30 min de la adición del *p*-NPG; y fueron comparados con una muestra control que consistió en 50 μL de amortiguador de fosfatos pH 6.9, en lugar de los extractos.

Actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa

El ensayo para medir la inhibición de la actividad de la α -amilasa por los extractos fue adaptado de Adisakwattana y col. (2009). La enzima α -amilasa (páncreas de porcino, 3 U/mL) fue disuelta en amortiguador de fosfatos salino 0.1 M pH 6.9. Se adicionaron 200 μL de los extractos en una solución de almidón (1 g/L) y la reacción se inició al adicionar 500 μL de la solución de la enzima, la mezcla fue incubada a 25°C durante 10 min, después de ese tiempo se adicionaron 500 μL de amortiguador de fosfatos 0.02 M (pH 6.9 con cloruro de sodio 6 mM). La mezcla de reacción se incubó nuevamente a 25°C durante 10 min y se detuvo por la adición de 1 mL de una solución que contenía ácido dinitrosalicílico al 1%, fenol al 0.2%, Na_2SO_3 al 0.05% e NaOH al 1% en solución acuosa. Después de ese tiempo, la mezcla se incubó a 90°C durante 5 min, y se enfrió a 25°C. Posteriormente, la mezcla se diluyó con 10 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia a 540 nm. La muestra control consistió en 200 μL de amortiguador de fosfatos pH 6.9, en lugar de los extractos.

En ambos análisis se utilizó una solución de 0.44 mg/mL de acarbose como inhibidor positivo.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y de comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos fenólicos han recibido creciente atención debido a sus actividades biológicas. Lopez-Martínez y col., (2013), han reportado que este tipo de compuestos juegan un papel importante en la actividad α -glucosidasa y α -amilasa, por lo tanto, pueden contribuir al manejo de la diabetes tipo 2, en este estudio los compuestos fenólicos constituyen el principal grupo de compuestos que actúan como antioxidantes.

El contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los extractos de huitlacoche se muestran en la Tabla I. El contenido de compuestos fenólicos totales varió de 222.19 a 661.45 mg/100 g, en la capacidad antiradical se encontró de entre 9,672.31 a 33,205.7 (método DPPH⁻), y para el método de ORAC de 623.56 a 5,151.37 para los extractos acuosos y metanólicos, respectivamente.

En estudios realizados por Valdez-Morales y col., (2016) se encontró un promedio de compuestos fenólicos totales de 415.6 a 921.8 mg/100 g y un valor de actividad antioxidante por ORAC and DE 7661.3 μ mol TE/100 g. Las diferencias entre los compuestos fenólicos extraíbles en medio metanólico y medio acuoso refleja la composición en cada uno de los extractos, la polaridad de los mismos y el grado en el cual los compuestos fenólicos presentes en ellos puedan estar esterificados y/o glicosilados. Las diferencias en el contenido de compuestos fenólicos totales se refleja en las actividades antioxidantes de los extractos como se ha sido reportado anteriormente (Sellappan y Akoh, 2002).

Tabla I. Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de extractos acuosos y metanólicos de huitlacoche			
Extracto	^aCompuestos fenólicos totales	^bDPPH⁻	^cORAC
Acuoso	222.19 \pm 12.3	623.56 \pm 3.02	9,672.31 \pm 312.6
Metanólico	661.45 \pm 20.56	5,151.37 \pm 48.22	33,205.7 \pm 1689.2

^aMiligramos equivalentes de ácido gálico/100 g

^bMilimoles equivalentes de Trolox/100 g

^cMicromoles equivalentes de Trolox/100g

Inhibición de amilasa y glucosidasa.

En los extractos metanólicos probados se encontró la mayor actividad inhibidora de glucosidasa a 1.0 mg/mL (73.20%), mientras que en los extractos acuosos se presentó a una concentración mayor (1.5 mg/mL) con una inhibición menor (55.22%) (Figura 1B).

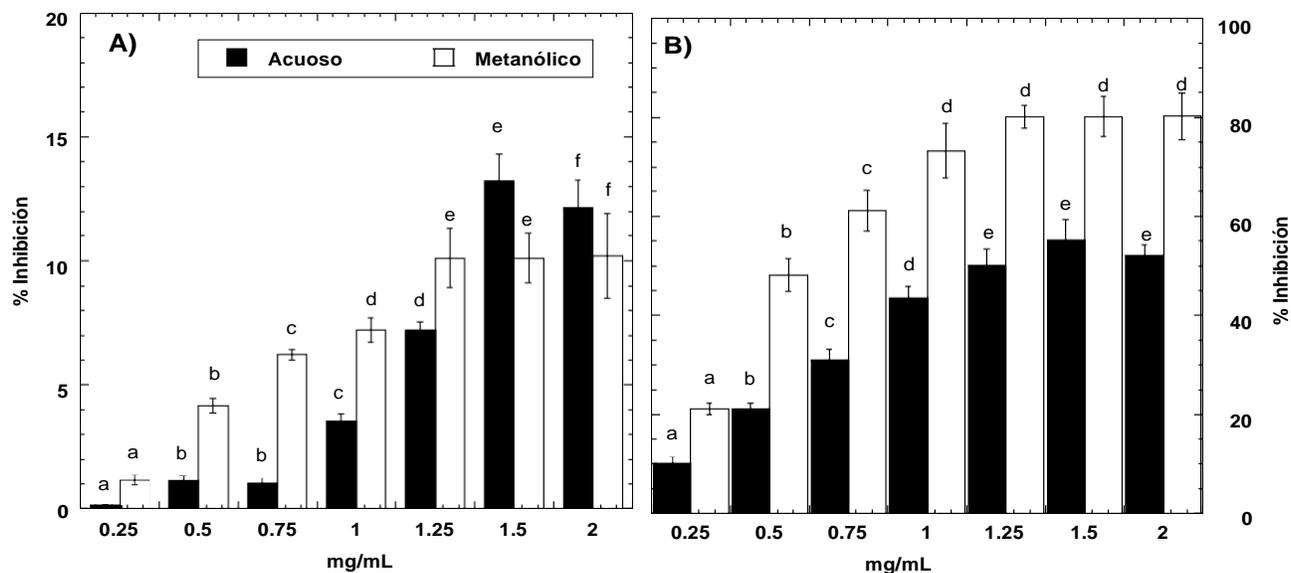


Figura 1. Inhibición de A) α -amilasa b) α -Glucosidasa por los extractos acuosos y metanólicos de huitlacoche

Ambos tipos de extractos exhibieron capacidad de inhibir la actividad de la enzima α -amilasa a las concentraciones de: 0.2 a 2 mg/mL. El porcentaje más elevado se observó a concentración de 1.5 mg/mL en los extractos acuosos (13.2%), y de los extractos metanólicos (10.2%), respectivamente (Figura 1A) también estos extractos fueron menos efectivos comparados con la droga terapéutica acarbosa (87% de inhibición).

En general la actividad inhibitoria de los extractos metanólicos es mayor que la de los extractos acuosos probablemente debido al tipo de compuestos fenólicos que se encuentran presentes en cada uno de ellos. Las diferencias en compuestos fenólicos y actividad antioxidante encontradas en este estudio con respecto a estudios previos pudieran ser debidas a la diferencia entre las variedades estudiadas, a su origen, incluyendo los factores climáticos, además del tipo de extracción y concentración de compuestos fenólicos a los que cada uno fue evaluado.

CONCLUSIONES

El contenido de compuestos fenólicos totales se encuentra relacionado con la actividad antioxidante e inhibitoria de α -glucosidasa, mas no así con la inhibición de α -amilasa. La fuerte inhibición de α -glucosidasa y la menor inhibición de α -amilasa indican que el huitlacoche podría representar una opción para la reducción de glucosa postprandial en sangre con efectos secundarios mínimos. Se continúa en estudios más profundos sobre su efecto potencial como promotor de la salud, así como de la identificación de cuáles de los compuestos fenólicos u otros fitoquímicos responsables de las actividades aquí estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

Adisakwattana, S., Chantarasinlapin, P., Thammarat, H., & Yibchok-Anun, S. (2009). A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal alpha-glucosidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24 (5), 1194–1200.

- Gao, L., Oomah, B. D. & Mazza, G. (2002). *Wheat quality: antioxidant activity wheat millstreams*. In P. Ng, & C. W. Wrigley (Eds.), *Wheat quality elucidation*. St. Paul, MN: AACC International, AACC Press. 233 Pp.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444.
- Huerta Esparza, G. (2013). Efecto del huitlacoche sobre indicadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas y normales.
- Paredes-López, O. P., Lara, F. G., & Bello-Pérez, L. A. 2013. *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. Fondo de cultura económica.
- López-Martínez, L. X., Aguilar Cisneros, L. M., & Dublán-García, O. 2014. Actividad antioxidante e inhibidora de α -glucosidasa y α -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.). *Nova scientia*, 6(12), 234-347.
- Sellappan, S. & Akoh, C. C. (2002). Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown *Vidalia onions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5338-5342.
- Valdez-Morales, M., Carlos, L. C., Valverde, M. E., Ramírez-Chávez, E., & Paredes-López, O. 2016. Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Lipid Profile of Huitlacoche Mushroom (*Ustilago maydis*) Produced in Several Maize Genotypes at Different Stages of Development. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4), 436-443.
- Yuan, T., Wan, C., Liu, K. & Seeram, N.P. 2012. New maplexins FI and phenolic glycosides from red maple (*Acer rubrum*) bark. *Tetrahedron*, 68 (4), 959–964.