

## Extracción preliminar y determinación de la actividad biológica de péptidos de semilla de *Prosopis laevigata* (mezquite)

Ulises Joseph Acosta Salas<sup>a</sup>, Kenia Mirozlava Favela González<sup>a</sup>, Laura Andrea Pérez García<sup>a</sup>, Cindy Nataly del Rio Arellano<sup>a</sup>, Norma M. De la Fuente-Salcido<sup>a\*</sup>

Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad Ciencias Biológicas. Bioprospección y Bioprocesos, Blvd Torreón-Matamoros Km. 7.5. 27276 Coahuila, México.

\*normapbr322@gmail.com

**Palabras clave:** Biopéptidos, *Prosopis laevigata*, Actividad antibacteriana.

### Introducción

El mezquite ha sido estudiado extensivamente revelando propiedades medicinales atribuidas a los alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos distribuidos en las partes leñosas de la planta, así como en hojas y en polen (Dhananjaya y col., 2014). En las vainas y semillas de mezquite se han reportado 10-15 % proteínas y particularmente un 38% de proteína en los núcleos de la semilla, considerándolas una excelente fuente de péptidos bioactivos. (Peña-Avelino y col., 2014; Del Valle y col., 2006).

El objetivo de investigación fue extraer péptidos de semillas de mezquite y determinar *in vitro* la actividad biológica para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de importancia en salud pública.

### Metodología

Las vainas de *P. laevigata* (mezquite) se recolectaron en Irapuato Guanajuato, México de mayo a julio, se secaron en horno (70°C), se desengrasaron (éter de petróleo) y se molieron obteniendo harina con partículas de 0.5 mm.

#### Extracción y detección de péptidos hidrosolubles en semilla

Se mezclaron semillas molidas y buffer de extracción frío (50 mM buffer de fosfato (pH 7), 2 mM EDTA, 5% glicerol, 50 mM NaCl) (v/p) y se agitaron 2h/4°C para la extracción total de proteínas. Se centrifugó 12,000 rpm/20min/4°C y el sobrenadante con proteínas se filtró (0.45 µM Merck Millipore). Se cuantificó la cantidad de proteínas hidrosolubles<sup>1</sup> y se realizó electroforesis desnaturante Tris-tricina (SDS-PAGE) para proteínas de 1 a 100 kDa<sup>2</sup> con buffer de carga con 2-mercaptoetanol como agente reductor y calentado (5min/100°C) previo a la corrida de dos geles (16%) a voltaje constante (100mV). Un primer gel se tiñó con azul de Coomassie para detectar las bandas y peso molecular, con insulina (6kDa) como marcador.

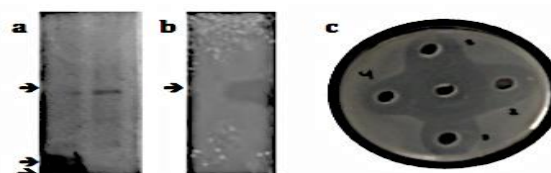
#### Bioensayos para determinar actividad antimicrobiana

a) **Sobrecapa en gel SDS-PAGE.** El segundo gel se utilizó para determinar la actividad antimicrobiana. Se fijó cada carril con solución isopropanol-ácido acético (20%-10%) por 2 h en agitación orbital y se lavó con agua destilada estéril (1h). Cada carril se colocó en caja Petri estéril y se cubrió con una sobrecapa de agar de pozos (0.7% agar soya tripticasa-AST-inoculado con  $1 \times 10^8$  cel/mL del cultivo a ensayar, crecido en caldo nutritivo (30°C/150rpm) toda la noche (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *staphylococcus xylosum*, *pseudomona*, *Escherichia coli*). Las cajas se incubaron a 30°C/24h y se detectó presencia de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano en *cereus* y un poco en *aureus*.

b) **Difusión en pozos de agar.** Se utilizaron *S.aureus* y *B.cereus* (por ser quienes presentaron algo de inhibición) en la misma proporción para realizar placas de agar de pozos (0.7% CST y  $1 \times 10^8$  cel/mL), se dejaron solidificar y se perforaron pozos (8 mm diámetro) para depositar 100 µL de solución de péptidos y separadamente un control positivo (KI 3%), se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente a 30°C/24 h. Se determinó la presencia y diámetro de halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de cada pocillo y se calculó la actividad antimicrobiana en unidades (U) aplicando la formula  $A = \pi r^2$ . Una unidad corresponde a 1mm<sup>2</sup> del halo de inhibición<sup>2</sup>.

### Resultados y discusión

Se detectó en el péptido de semilla de *Prosopis* una cantidad de proteína de 0.3927 mg/mL (Bradford)<sup>3</sup>, y se confirmó la extracción visualizada por SDS-PAGE con tinción Coomassie (Fig. 1 a). Además se confirmó la actividad antimicrobiana del péptido por sobrecapa en gel contra *B. cereus* (Fig. 1 b) y difusión en pozos (Fig. 1c) para *S. aureus* (402 U).



**Fig. 1** Péptido de semilla de *P. laevigata*. a) SDS-PAGE. carril 1, doble flecha marcador (insulina); carril 2, flecha péptido detectado con tinción Coomassie. b) Actividad antimicrobiana por sobrecapa contra *B. cereus*. c) Actividad antimicrobiana de péptido contra *B. cereus* por difusión en pozos.

### Conclusiones

Los biopéptidos aislados de semilla de mezquite mostraron *in vitro* actividad inhibitoria contra *B. cereus*, bacteria patógena sin embargo contra *S.aureus* no se mostro actividad antimicrobiana. Se realizan más bioensayos contra hongos y levaduras patógenos.

### Referencias

- Schagger H, Von Jagow G. Anal Biochem 1987; 166: 368-379.
- De la Fuente-Salcido NM, Pimentel, A, Valenzuela, A, Gutiérrez, E, Valencia C. C.M., Villarreal Prieto. J.M., Salcedo Hernández, R., Barboza-Corona, J.E., & Castañeda Ramírez, J.C. (2016). Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1 (2), 353-359.
- Bradford, MM.. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.