

## **Extractos crudos de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) con efecto de actividad inhibitoria contra bacterias y levaduras patógenas de importancia en salud humana y hongos fitopatogenos**

R.D. Pacheco-Cano<sup>1</sup>, R. Salcedo-Hernández<sup>1</sup>, J.E. Barboza-Corona<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. [rd.pachecocano@ugto.mx](mailto:rd.pachecocano@ugto.mx); [Josebar@ugto.mx](mailto:Josebar@ugto.mx)

### **RESUMEN:**

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) es uno de los productos agrícolas mas importantes en Guanajuato, y nuestro Estado es el principal exportador a nivel nacional de dicha hortaliza. Su importancia es tal que está considerado dentro de las áreas estratégicas de la Industria Alimentaria Sustentable de innovación en Guanajuato. El brócoli se puede usar como nutraceutico y para el desarrollo de membranas comestibles. En particular, los péptidos antimicrobianos del brócoli no han sido estudiados. Resultados preliminares han demostrado que los extractos proteicos de florete y tallo de brócoli tienen efecto inhibitorio contra cepas patógenas Gram positivas y Gram negativas, de interés en alimentos y salud publica como (*Bacillus cereus* 186, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* y *Staphylococcus aureus*). Se detecto actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Candida albicans*. El extracto de florete se semipurifico mediante exclusión molecular, la actividad inhibitoria se analizo mediante actividad en gel contra *Staphylococcus xylosus*, se detecto una banda de aproximadamente de 10 kDa.

**Palabras clave:** brócoli, nutraceutico, péptidos antimicrobianos

### **ABSTRACT:**

Broccoli (*brassica oleracea* var. *italica*) is one of the most important agricultural products in Guanajuato, and our state is the main national exporter of this vegetable. Its importance is such that it is considered within the strategic areas of Sustainable Food innovation Industry in Guanajuato. Broccoli can be used as nutraceutical and for the development of edible membranes. In particular, antimicrobial peptides synthesized by broccoli have not been studied. Preliminary results shown that protein extracts of both broccoli floret and stem have inhibitory effect against pathogenic Gram positive and Gram negative strains of interest in food and public health, such as *Bacillus cereus* 186, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* and *Staphylococcus aureus*. In addition, we detected the crude proteins have antifungal effect against *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Candida albicans*. Currently, proteins from broccoli were purified through molecular exclusion, and the inhibitory activity against *Staphylococcus xylosus* was analyze by gel detection, detecting that proteins of approximately 10 kDa have inhibitory effect.

**Keywords:** antimicrobial peptides, broccoli, nutraceutical

## **INTRODUCCIÓN**

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son producidos por los seres vivos como un mecanismo de defensa en respuesta, a una infección causada por un patógeno, éstos representan un componente importante en la respuesta de la defensa innata de organismos pluricelulares (De Beer y Viver 2011). En plantas, los péptidos antimicrobianos han sido aislados de la raíz, semillas, hojas, tallo, hojas y tienen efecto inhibitorio hacia bacterias patógenas Gram (+), Gram (-) y contra hongos (Hammami y col., 2009; Barbosa-Pelgrini y col., 2011; Zhao y col. 2011). En muchos de eso péptidos se ha

detectado la presencia de puentes disulfuro, los cuales les permiten aumentar su estabilidad a altas temperaturas; sin embargo, aunque en menor porcentaje, también se han reportado la existencia de péptidos (p. ejemplo en el coco y en las semillas de guayaba), los cuales carecen de dicho enlace. Los PAMs de plantas ha sido aislados de *Eutrema wasabi*, *Impatiens balsamina*, *Mirabilis jalapa* (llamada Dondiego de noche), *Zea mays* (maíz), *Solanum tuberosum* (papa), entre otras (Barbosa-Pelgrini y col., 2011), pero no se han descrito péptidos obtenidos a partir del brócoli (*Brassica oleracea*). Los PAMs pueden afectar la membrana celular, la síntesis de ADN y/o ARN e inducir la apoptosis, entre otros (Cho y col., 2012). Recientemente el interés por estudiar los PAMs se ha incrementado debido a su potencial para desarrollar nuevas técnicas de control de fitopatógenos o en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos (antibióticos) o conservadores en alimentos (De la Fuente-Salcido y col., 2013). Los PAMs producidos por plantas se han clasificado en defensinas, heveinas, ciclotidos, knottinas y vicilinas, entre otras, sin embargo las defensinas representan la familia que tiene el mayor número de péptidos antimicrobianos descritos hasta ahora. Las defensinas son péptidos pequeños, básicos, estables al calor y contienen una cadena alfa y tres cadenas beta antiparalelas. En este trabajo nos interesa estudiar los péptidos antimicrobianos del brócoli (*Brassica oleracea* var *italica*) híbrido Avenger, el cual es consumido regularmente crudo en ensaladas o escaldado, y es líder en el mercado por tener amplia adaptación y excelente rendimiento. El brócoli es de importancia económica a nivel mundial debido a sus valores alimenticios y medicinales. Tanto las hojas como la inflorescencia (florete) tienen alto valor nutricional por sus contenidos de proteínas, carbohidratos, fibra, calcio y hierro, entre otros (Yanaguchi, 1983). Para proponer este proyecto hicimos una revisión exhaustiva relacionada con los péptidos antimicrobianos del brócoli y encontramos que no existe reportes relacionados con este tema, solo con algunas plantas del género *Brassica*, tales como *Brassica napus* (Cao y col., 2015). Hasta ahora el único trabajo relacionado con la actividad antibacteriana del brócoli (*Brassica oleracea* var *italica*) fue reportado por Sibi y col. (2013), sin embargo en ese trabajo no estudiaron los péptidos antimicrobianos y el efecto inhibitorio se lo atribuyeron a los alcaloides, flavonoides, glicósidos, saponinas, esteroides y terpenoides. Asimismo, se ha reportado la purificación y caracterización de una lectina del brocolini (*Brassica oleracea* L. var *italica* X *Alboglabra*), el cual es similar al brocoli, pero con los floretes más pequeños y alargados (Xu y col., 2015). Recientemente fue reportado la secuencia genómica preliminar de *B. oleracea* y la comparación genómica con su especie hermana *B. rapa* (Liu y col., 2014).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de brócoli híbrido Avenger fueron proporcionadas por la empresa MarBran, localizada en el municipio de Irapuato, Guanajuato. Para extraer los péptidos se tomaron muestras de florete y tallo de brócoli (aprox. 300 g), y se cortaron en pequeños trozos y se les adiciono agua destilada y plata ionizada al 0.35% v/v (Microdyn). La muestra se coloco en un extractor de jugos y se centrifugo para retirar los sólidos. Posteriormente el extracto se calentó a 65°C durante 5 minutos, esto nos ayuda a clarificar y precipitar proteínas que no son termorresistentes, posteriormente se centrifugo a 25000 rpm durante 30 minutos.

El precipitado se filtro usando una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y posteriormente se realizaron ensayos de actividad contra bacterias, hongos y levaduras. La actividad de los extractos fue evaluada contra cepas Gram (+) y Gram (-) utilizando *B. cereus* 186, *L. monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *S. xylosum*, *E. faecalis* y Gram (-) *S. flexneri*, *E. cloacae*, *S. sonnei*, *P. Vulgaris*, *Salmonella*, *E. coli*. Se preparó agar de pozos (0.75 gr de caldo de soya; 6 gr Agar bacteriológico / 500 mL de agua) y se realizo una mezcla (15 mL de agar de pozos con 115  $\mu\text{L}$  cepa indicadora) posteriormente se realizaron pozos de 8 mm de diámetro interior, y se coloco 100  $\mu\text{L}$  de extracto de brócoli en cada pozo, y se incubo a 28°C / 37°C respectivamente durante toda la noche y se observo el halo de inhibición.

Se realizaron ensayos de actividad inhibitoria de extractos de brócoli contra hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp. y *Fusarium oxysporum*.y levaduras *Candida albicans* y *Rhodotorula* sp.

El hongo se creció en Agar papa dextrosa a temperatura de 28°C durante 4 días, se le agrego 2 mL agua destilada estéril sobre el hongo y se raspo, posteriormente se centrifugo a 4000 rpm durante 5 minutos, quedándose con el sobrenadante y se realizaron 4 lavados con agua destilada y se centrifugo a 4000 rpm durante 5 minutos en cada lavado, una vez teniendo la pastilla se resuspendió en 2 mL de caldo YPD. Para la realización de los microensayos se adiciono en un eppendorf 10 $\mu\text{L}$  de hongo y 10 $\mu\text{L}$  de los extractos de florete y tallo de brócoli con 1 $\mu\text{L}$  de Yoduro de propidio PI (es una molécula fluorescente y un agente que se une al DNA por intercalación entre las bases) y teniendo como un máximo de excitación de fluorescencia de 535 nm y un máximo de emisión de 617 nm.

En cuanto a levaduras se crecen en medio YPD a una temperatura de 28°C en agitación constante de 180 rpm durante 8 horas y se realizaron microensayos de igual manera que en la metodología de los hongos. Para el microensayo se coloco en un porta objetos 10 $\mu\text{L}$  y se observo en un microscopio Zeiss® y con un filtro Fs20, con diferentes objetivos 5x, 40x y 100x.

También se realizo el crecimiento del hongo, en sus condiciones óptimas, y posteriormente se realizaron pozos de 8 mm de diámetro en el agar, en la región superior sin tocar el hongo y se adicionaron 100 $\mu\text{L}$  de los extractos de brócoli y se dejaron a 28°C durante 12 h y se observo el efecto inhibitorio de los extractos. También se realizo una semipurificación en un equipo de FPLC (“Fast Protein Liquid Chromatography”) de BioRad (“BioLogic Duo/Flow”). La muestras fueron separadas inicialmente en una columna de filtración en gel de Bio-Gel®P-10 la cual se equilibró con  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$  10 mM, pH 8 (Pacheco-Cano y col., 2014). Las fracciones que se observaron en el curva del cromatograma se colectaron y concentraron en un Speed Vac<sup>®</sup> hasta un volumen de 200  $\mu\text{L}$ . Posteriormente se realizo un gel Tris-Tricina bajo condiciones no reductoras para determinar la masa molecular del péptido antimicrobiano y se realizo un gel de Tris Tricina para cubrirlo con agar de pozos añadiendo como bacteria indicadora *S. xylosum* y a si poder observar la actividad en gel. Finalmente las muestras positivas fueron reducidas, alquiladas y tratadas con tripsina para ser analizadas mediante secuenciación del N-terminal y espectrometría de masas MALDI-TOF (Egorov y col. 2005) en el laboratorio del Dr. Kazimierz Wrobel de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato Campus Guanajuato. Las secuencias fueron comparadas en banco de datos del GenBank y en el EMBL.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad del extracto de florete y tallo de brócoli contra cepas patógenas, mediante el método de difusión de pozos

En la tabla I se puede apreciar las actividades antimicrobianas en unidades sobre miligramo, contra varias bacterias patógenas de interés de salud pública y alimentaria. Dentro de las cuales se encuentran las bacterias *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Shigella* son agentes causales de intoxicaciones alimentarias que perjudican especialmente a personas de la tercera edad, niños y personas con enfermedades crónicas.

Las principales fuentes son alimentos contaminados, en especial carnes de res molida, leche, agua, quesos, frutas y verduras.

Los extractos de brócoli de florete y tallo tuvieron actividad contra once bacterias patógenas lo cual nos indica que aparte del valor nutricional, tiene un gran efecto antimicrobiano debido a peptidos antimicrobianos y de compuestos fenólicos entre otros.

Dentro de todas las bacterias patógenas con la que tiene mayor actividad es con *Staphylococcus xylosus* que es una bacteria gram positiva que esta emergiendo como un patógeno hospitalario, ya que en pacientes inmunodeprimidos, desnutridos, que han recibido antibióticos de amplio espectro y que tienen catéteres centrales son susceptibles a desarrollar colonización de catéter por *S. xylosus*.

**Tabla I.** Actividad antimicrobiana de extractos de florete y tallo

| Cepas                         | Gram | Florete (U/mg) | Tallo (U/mg) |
|-------------------------------|------|----------------|--------------|
| <i>Bacillus cereus</i>        | +    | 1936±0         | 1717±81      |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | +    | 1500±35        | 843±29       |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | +    | 361±0          | 519±0        |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | +    | 2486±0         | 3072±0       |
| <i>Shigella flexneri</i>      | -    | 1936±0         | 2024±0       |
| <i>Escherichia coli</i>       | -    | 273±0          | 413±0        |
| <i>Salmonella spp.</i>        | -    | 194±0          | 0            |
| <i>Proteus vulgaris</i>       | -    | 1302±0         | 1490±0       |
| <i>Enterobacter cloacae</i>   | -    | 1880±37        | 1657±0       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -    | 554±0          | 799±29       |
| <i>Shigella sonnei</i>        | -    | 897±0          | 1173±0       |

**Efecto de sensibilidad a temperatura de extractos de florete y tallo de brócoli**

El extracto de florete y tallo de brócoli al ser expuesto a diferentes temperaturas (Tabla II) por 30 minutos y determinar su actividad inhibitoria por difusión en pozos contra la bacteria *S. xylosus*, no perdieron su actividad inhibitoria. Pueden ser considerados como termorresistentes ya que mantienen su actividad inhibitoria hasta temperatura de 120 °C durante 30 minutos. La característica interesante de la estabilidad a 120°C durante 30 min, apoya el hecho de que podría contribuir desde un punto vista como un posible uso potencial como un aditivo alimentario.

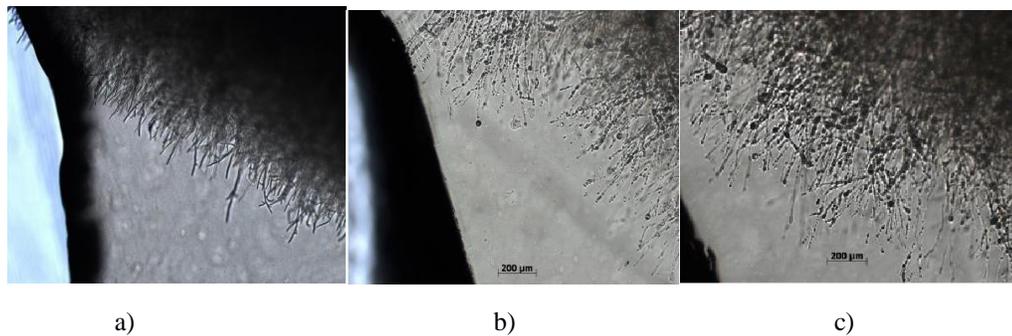
**Tabla II.** Efecto de sensibilidad a diferentes temperaturas sobre extractos de florete y tallo de brócoli

| Temperatura(°C) | Florete (U/mg) | Tallo (U/mg) |
|-----------------|----------------|--------------|
| 60              | 2486±0         | 3072±0       |
| 70              | 2486±0         | 3072±0       |
| 80              | 1936±0         | 3072±0       |
| 90              | 1936±0         | 3072±0       |
| 100             | 1157±0         | 3072±0       |
| 120             | 736±51         | 3072±0       |
| Control         | 2486±0         | 3072±0       |

### Actividad Antifúngica de extractos de florete y tallo de brócoli contra *Colletotrichum gloeosporioides*

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* es de gran importancia, ya que es un agente causal de antracnosis de aguacate, es una enfermedad que ocasiona pérdidas cercanas al 20% de la producción (Rodríguez et al. 2008). El efecto antifúngico de los extractos proteicos de florete y tallo de brócoli, es considerable ya que con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC 42374 se puede lograr ver el daño más considerado, en las hifas dañadas por lo que se puede pensar que el extracto proteico tiene un efecto inhibitorio. El hongo como mecanismo de defensa trata de segregar sustancias como se ve en la imagen (Figura 1) de microscopía de campo claro con objetivo 40x.

La actividad antifúngica de los extractos de florete y tallo se logró observar contra las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC 42374, ya que se logró un daño en la integridad de la espora y con exposición de material extracelular, cabe mencionar que el efecto antifúngico tubo una característica al aglomerar las esporas, se puede observar en comparación con el control positivo. En estos ensayos se empleo yoduro de propidio, una molécula de fluorescencia, que se une al ADN mediante una intercalación entre las bases con poca o ninguna preferencia de secuencia



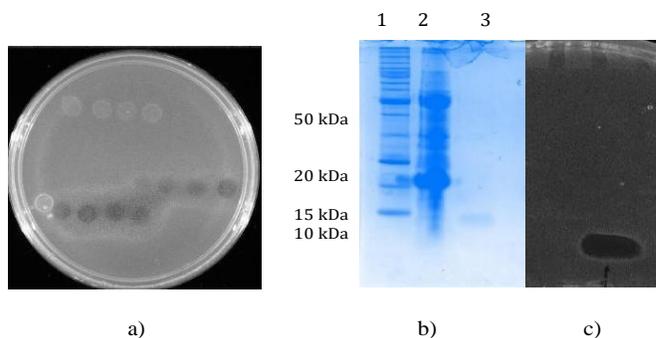
**Figura 1.** Efecto inhibitorio de extractos de brócoli contra *Colletotrichum gloeosporioides*. a) *Colletotrichum gloeosporioides* (control); b) *Colletotrichum gloeosporioides* contra florete; c) *Colletotrichum gloeosporioides* contra tallo.

### Semipurificación para detección de péptidos antimicrobianos

Para la semipurificación del extracto de florete se llevo a cabo por exclusión molecular, en una columna de poliacrilamida P10, esto indica que quedaron retinadas moléculas menores de 15 kDa y se eluyeron en la ultima fase de la cromatografía. Cabe recalcar que a todas las fracciones se les determino la actividad inhibitoria por el método de gotas sobre césped (Figura 2), las fracciones eluidas fueron de 2 mL, por lo tanto se concentraron por medio de flujo de aire caliente en el equipo SpeedVac®, hasta llegar a una concentración de 200  $\mu$ L cada fracción, posteriormente las fracciones que fueron positivas con actividad inhibitoria fueron de la 51 a la 57.

### Detección de masa molecular en extracto de florete, mediante electroforesis SDS-PAGE

Las fracciones 51 a 57 semi purificadas del extracto de brócoli, se juntaron en una sola fracción se concentro hasta quedar 1 mL, de muestra semi purificada y se realizaron geles de poliacrilamida al 16% y un gel de actividad para poder analizar la masa molecular. Se puede observar una banda menor a 10 kDa. La mayoría de los péptidos antimicrobianos de plantas varían en tamaño de 2 a 9 kDa por lo que se piensa que pudiera ser uno o varios péptidos antimicrobianos del brócoli. En el gel de actividad se detecto inhibición por debajo de los 10kDa por lo que se sugiere que puede ser un péptido antimicrobiano.



**Figura 2.** Purificación parcial de extracto de florete. a) Fracciones semipurificadas por el método de gota sobre césped; b) Gel Tris Tricina; Carril 1. marcador, Carril 2. extracto crudo, carril 3. Extracto semipurificado. c) Actividad en Gel usando como bacteria indicadora *S. xylosus*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barbosa-Pelegrini P, Perseghini del Sarto R, Nascimento-Silva O, Luiz-Franco O, Grossi-de-Sa NF (2011) Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. *Biochem Res Internat Article ID250349*, 9 pages.
- Cao H, Ke T, Liu R, Dong C, Cheng M, Huang J, Liu S (2015) Identification of a novel proline-rich antimicrobial peptide from *Brassica napus*. *Plos One*. DOI:10.1371/journal.pone.0137414
- Cho J, Hwang I, Choi H, Hwang J, Hwang J-S, Lee DG (2012) The novel biological activity of antimicrobial peptides *via* apoptosis induction. *J Microbiol Biotechnol*, 22: 1457-1466.
- De Beer A, Viver MA (2011) Four plant defensins from an indigenous South African *Brassicaceae* species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Res Notes* 4:459–476
- De la Fuente-Salcido NM, Casados-Vázquez LE, Barboza-Corona JE (2013) Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potencial of this bacterium to other areas rather than limits its use only as microbial insecticide. *Can J Microbiol*, 59(8):515-522.