

Uso de la melanina del pulpo (*Octopus maya*) de Yucatán como agente antibacteriano

Use of the melanin of the octopus (*Octopus maya*) of Yucatan as antibacterial agent

Jorge Tello Cetina, Aldrin Chan Pat, Gerardo Rivera Muñoz, Jorge Tamayo Cortes,
Nidia Jiménez Suaste y Herbert Loria Sunsa

Instituto Tecnológico de Mérida. Dpto. Química-Bioquímica, Laboratorio de Enzimología Marina.
Av. Tecnológico km 4,5 s/n, CP 97118, Mérida, Yucatán, E-mail: jorgegigas1@gmail.com

RESUMEN

Estudios de diversa índole han usado los metabolitos contenidos en organismos marinos como material para la bioprospección, tal es el caso de la tinta en algunos moluscos en la cual se encuentran sustratos de diferente naturaleza, a los cuales se le han atribuido diversas funciones farmacéuticas que se están estudiando para establecer su uso y posterior aplicación en el combate contra infecciones bacterianas que atacan al ser humano. En el caso del pulpo *Octopus maya*, se propuso establecer si la melanina del cefalópodo es susceptible de ser utilizada como agente antimicrobiano contra alguna bacteria común en el medio. Se obtuvo como resultado un rendimiento de 8,85 % de melanina seca de la tinta de 30 pulpos adultos, al caracterizar la muestra por espectrometría UV-Vis se obtuvieron picos de adsorción entre 250-320 nm y un espectro con comportamiento similar a la melanina estándar (sepia) de Sigma-Aldrich. En este estudio los resultados indican que la melanina del *O. maya* a una concentración de 4 mg mL⁻¹ y 2 mg mL⁻¹ no tiene actividad antimicrobiana contra la bacteria *S. typhi* y esto puede deberse a diversos factores, entre ellos el tratamiento aplicado, el tiempo de recolecta de la tinta hasta su uso o la concentración de melanina utilizada.

Palabras clave: molusco, tinta, actividad antimicrobiana, salmonella, Yucatán.

ABSTRACT

Studies of various kinds have used the metabolites contained in marine organisms as material for bioprospecting, such is the case of the ink in some mollusks in which diverse substrates are found nature which have been attributed to various chemical functions and which are being studied for their use and subsequent application against bacterial infections that attack humans. In the case of the octopus, *Octopus maya*, it was proposed to establish if the melanin of the cephalopod is susceptible to be used as an antimicrobial agent against the common bacteria in the environment. As a result, a yield of 8,85 % of dry melanin was obtained from the ink of 30 adult octopus, the sample was characterized by UV-Vis spectrometry, adsorption peaks between 250-320 nm were obtained and a spectrum with behavior similar to standard melanin (Sepia) by Sigma-Aldrich. In this study, the results indicate that *O. maya* melanin at a concentration of 4 mg mL⁻¹ and 2 mg mL⁻¹ has not antimicrobial activity against *S. typhi* bacteria and this may be due to several factors, including treatment applied, the time of collection of the ink until its use or the concentration of melanin used.

Keywords: mollusk, ink, antimicrobial activity, salmonella, Yucatán.

Recibido: 5/4/18

Revisado: 12/7/18

Aceptado: 30/7/18

INTRODUCCIÓN

En la península de Yucatán habitan organismos marinos de alto nivel económico como son el pulpo, el camarón, el mero y la langosta, entre otros. El pulpo y su captura son una actividad económica controlada y sustentable, esta pesquería ha logrado consolidarse como la principal en Yucatán, ocupando el primer

lugar nacional en captura y venta, especialmente en dos especies: el *Octopus maya* (pulpo rojo) y el *Octopus vulgaris* (pulpo patón) (SAGARPA, 2016).

El organismo que aporta mayor derrama económica es la especie endémica, el pulpo rojo, este molusco produce un compuesto llamado tinta que utiliza como defensa en contra de los ataques de sus agresores, la tinta contiene una gran diversidad de metabolitos, la principal es la melanina considerado un pigmento

natural debido a que le da la coloración marrón oscuro o negro a la tinta, la eumelanina es la forma concentrada de los cefalópodos (Derby, 2014). Nosanchuk & Casadevall (2006) afirman que las melaninas están cargadas negativamente, son hidrofóbicas, insolubles en agua o solventes orgánicos, están compuestas de polímeros fenólicos y/o compuestos indólicos, resistentes a la degradación con ácidos, pero susceptibles a la degradación con bases fuertes. Diversos trabajos en diferentes laboratorios se han enfocado en establecer los metabolitos de la tinta y los posibles usos de ella; ya que se le han atribuido propiedades y aplicaciones para los humanos, entre ellos está la actividad antimicrobiana que posee (Smiline *et al.*, 2012; Peruru *et al.*, 2012; Petkovic, 2013; Derby, 2014; Díaz & Thilaga, 2016). Basado en investigaciones desarrolladas en organismos similares, la tinta es un elemento susceptible de rentabilidad, aprovechada en un contexto y desaprovechada en otro, que podría utilizarse para la generación de nuevas alternativas de productos genéricos de origen natural derivados de organismos marinos, teniendo en cuenta que actualmente los medicamentos están en función de la evolución de las enfermedades y la necesidad cada día mayor de encontrar remedios naturales que no tengan efectos secundarios para la salud.

La dirección, identificación y uso de metabolitos derivados de los residuos de diversos organismos marinos de la península de Yucatán, nos brinda la oportu-

nidad de contar con diversos sustratos para trabajar en la investigación y descubrimientos de productos farmacéuticos que ayuden a la población a mitigar las enfermedades causadas por bacterias comunes del medio. El mar es inmenso y aún nos quedan muchos recursos por descubrir y conocer.

En este trabajo, el objetivo del mismo residió en establecer la alternativa de utilizar la melanina del pulpo *O. maya* para ser probado como un agente antibacteriano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción, purificación y caracterización de la melanina del pulpo rojo

La colecta de los organismos se realizó en el puerto de Sisal, Yucatán (Fig. 1). Se capturaron 30 organismos el mismo día, con tallas entre de 110-150 mm de longitud de manto, con ayuda de pescadores de la zona empleando la tradicional técnica de "jimba". Se siguió el procedimiento de extracción y purificación de melanina de los autores (Magarelli *et al.*, 2010), pero con la modificación del secado que se realizó a 70 °C por 24 h. Se determinó el peso seco y húmedo del metabolito. Así como el rendimiento de la tinta. La melanina se guardó a -80 °C hasta su uso.



Fig. 1. Ubicación del sitio de muestreo en el estado de Yucatán.

Para la caracterización de la melanina se utilizó el método espectrofotométrico UV-Vis comparando con la melanina de sepia de Sigma-Aldrich a una longitud de onda de 250-900 nm en un intervalo de 1 nm, se preparó una muestra de 4 mg mL⁻¹ diluyendo con el buffer carbonato de sodio 0,1 M, pH 10,3 (Magarelli *et al.*, 2010).

Actividad antimicrobiana de la melanina del pulpo *O. maya*

La bacteria *Salmonella typhi* ATCC 14028 utilizada fue donada por el Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Para la actividad antimicrobiana se

utilizó el método de difusión en disco, la bacteria se resembró en placas con agar Luria Broth y se incubó 24 h a 37 °C, se tomó de cuatro a cinco colonias bien aisladas y se inocularon en tubos de ensayo con 5 mL de solución salina estéril, se midió la turbidez a 625 nm hasta alcanzar una densidad óptica de 0,08-0,1. Después de 15 min con un hisopo por estrádo y girando la placa 60 °C, se inoculó en las placas con medio Müeller-Hinton. Se esperaron 3 min y con una pinza estéril se impregnaron los discos de papel con 4 mg mL⁻¹ y 2 mg mL⁻¹ de melanina, el antibiótico ciprofloxacino 20 µg mL⁻¹ se utilizó como control positivo y el buffer como control negativo. Después de 15 min de aplicados los discos se incubaron las cajas invertidas por 16-18 h a 37 °C, al término de este se analizaron los resultados obtenidos. La prueba se realizó por duplicado.

RESULTADOS

Rendimiento de la tinta-melanina

De las 30 muestras del pulpo *O. maya* se obtuvo un total de 49,119 g de tinta, con un rendimiento de 11,224 g de melanina húmeda que corresponde al 22,85 % de la tinta inicial y 4,346 g de melanina seca obteniéndose 8,85 % en la tinta del pulpo (TABLA 1).

TABLA 1. Total de melanina obtenida en peso húmedo y seco

| | Tinta | Melanina húmeda | Melanina seca |
|--|----------|-----------------|---------------|
| Total | 49,119 g | 11,224 g | 4,346 g |
| Porcentaje total de melanina en la tinta | | 22,851 % | 8,848 % |

Después del secado se obtuvo un sólido negro con semejanza a marrón oscuro y que es una característica física común de la melanina de moluscos (Fig. 2).

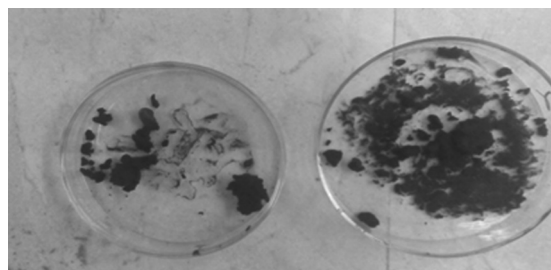


Fig. 2. Melanina seca de la muestra de tinta de pulpo.

Caracterización de la melanina

Con el análisis espectrofotométrico UV-Vis efectuado a la melanina de la tinta del pulpo *O. maya*, se obtuvieron picos de adsorción en 257 nm, 262 nm, 318 nm y 319 nm, que son característicos en este tipo de análisis. Comparando el espectro obtenido de la caracterización de la melanina de la sepia de Sigma-Aldrich el comportamiento del espectro fue similar a la melanina del pulpo rojo (Fig. 3).

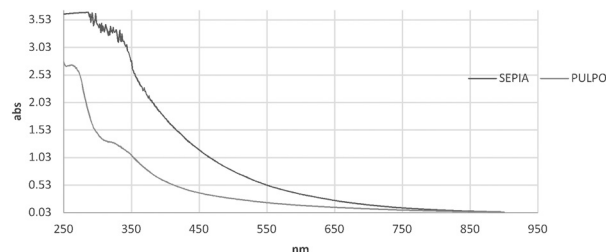


Fig. 3. Comparación del comportamiento de las gráficas de adsorción de melanina de sepia y pulpo.

Actividad antimicrobiana

El resultado por duplicado de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de la melanina indica que no hubo respuesta antimicrobiana, ya que la bacteria no presentó sensibilidad. El control positivo dio un halo de inhibición y el control negativo sin actividad antibacteriana, resultados congruentes con este tipo de experimentos. (Figs. 4 y 5).

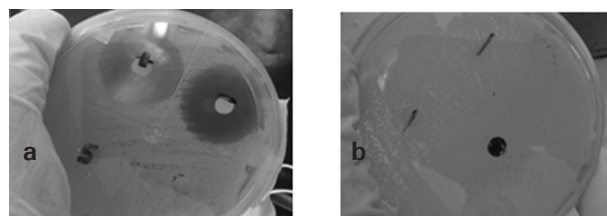


Fig. 4. Control positivo (a) y negativo (b) de la actividad antibacteriana.

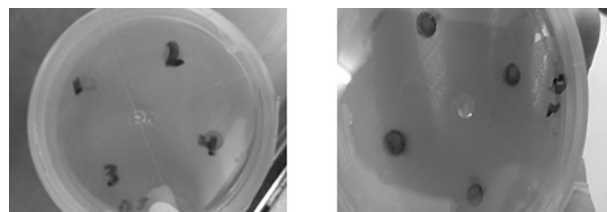


Fig. 5. Resultados de la actividad antibacteriana de la tinta del pulpo *O. maya* de Yucatán.

DISCUSIÓN

Existe variación en cuanto al rendimiento de tinta de otros cefalópodos con respecto a los pulpos analizados en la costa de Yucatán, ya que el pulpo rojo tiene un porcentaje de 22,851 % de melanina húmeda del total de tinta, el cual es una alta cantidad en comparación con el 15,5 % del peso húmedo de melanina que reportan Wang *et al.* (2014).

El sólido marrón oscuro obtenido después del secado y en el cual se empleó un método diferente, tiene las características físicas semejantes en color y consistencia que describen Magarelli *et al.* (2010) & Derby (2014); y esto es indicio de que la técnica para extraer melanina es útil para este tipo de experimentos.

El espectro de melanina del pulpo rojo comparado con la melanina estándar de sepia de Sigma-Aldrich mostró una pequeña variación en el comportamiento, el cual es lógico dado que la pureza varía por el tratamiento aplicado, sin embargo, este estudio proporciona resultados que indican que se tiene melanina casi pura, ya que los diferentes picos que dieron las gráficas son resultados congruentes, debido a que la melanina muestra el perfil de alta adsorción en la región 200-300 nm que se le puede atribuir al grupo indol de los polímeros que forman la melanina. (Wang *et al.*, 2006; Magarelli *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2013; Mbonyiryivuze *et al.*, 2014).

La melanina del pulpo *O. maya* no presentó actividad antimicrobiana como la tinta y melanina de otros cefalópodos, se puede inferir que una posible causa es el tratamiento dado diferente a otros autores aunado a que se secó la melanina a 70 °C por 24 h y no se liofilizó, así como la concentración de muestra utilizada en comparación con los calamares, las sepias y pulpos que según la literatura corresponde a muestras de melanina cruda o tinta libre de melanina, (Nirmale *et al.*, 2002; Nithya *et al.*, 2011; Vennila *et al.*, 2011; Smiline *et al.*, 2012; Peruru *et al.*, 2012; Petkovic, 2013), es menester considerar que en futuros proyectos se debe adecuar el procedimiento a lo realizado por otros autores, nos daría la factibilidad de obtener resultados positivos, ya que se ha probado plenamente la actividad de los metabolitos de la tinta de los cefalópodos. En este experimento solo se probó un tratamiento y pudiendo ser que algún detalle en el procedimiento no resultó en la debida expresión de los metabolitos. Otros factores a ser considerados en los nulos resultados positivos, es la esterilización de la muestra en el que se utilizó un filtro de 0,022 μm y pudo haber retenido parte del sustrato, puesto que la melanina está en aglomerados de partículas con tamaño de 10 μm a 200 nm pero mayormente con gránulos grandes de 2 μm (Glass *et al.*, 2012; Glass, 2014;

Mbonyiryivuze *et al.*, 2015), lo cual podría haber retenido todas o la mayoría de las partículas grandes con la propiedad de interaccionar con los microorganismos; así también se debe considerar el tiempo de manipulación de la tinta hasta la determinación de actividad antimicrobiana o inclusive la concentración de melanina utilizada en las pruebas.

CONCLUSIONES

Los resultados determinados en este trabajo indican que la especie *O. maya* de Yucatán contiene alta cantidad de tinta por ejemplar adulto, se tiene 1,63 g de tinta por pulpo y 0,13 g de melanina por individuo; es pertinente mencionar que solo es una aproximación ya que las tallas de los pulpos no fueron homogéneas. Al caracterizar la melanina los cuatro picos de adsorción que se obtuvieron mostraron congruencia ya que están en el rango de adsorción 200-300 nm y se tuvieron resultados similares al de otros autores, dando a entender que se puede utilizar la metodología empleada con la modificación de secar a 70 °C, 24 h para realizar este tipo de experimentos, pero también esto pudo causar que la exposición por mucho tiempo a una temperatura alta modificara la estructura química del compuesto y por lo tanto diera menos picos que la melanina estándar, y se sugiere realizar otro tipo de caracterización para afirmar la presencia pura del compuesto.

El tratamiento previo para la obtención de la melanina es un factor determinante para establecer la actividad antimicrobiana de la melanina, en trabajos similares y utilizando otros procedimientos los resultados fueron diferentes y positivos, aunque las concentraciones de melanina-tinta utilizadas son distintas y varían en el contexto, se debe de considerar la adecuación a estos procesos. La concentración utilizada en otros trabajos nos da la pauta para pensar que por especie varía la concentración a utilizar y que la tinta de este pulpo necesita una concentración más grande que los 4 mg mL⁻¹ que se utilizaron en esta prueba.

No se puede concluir definitivamente que la melanina del pulpo *O. maya* no tiene actividad antibacteriana, ya que influyen muchos factores para determinarlo y se sugiere utilizar distintos tratamientos a la tinta para extraer y purificar la melanina, así como otras concentraciones del sustrato.

REFERENCIAS

- Derby, C. D. (2014). Cephalopod Ink: Production, Chemistry, Functions. *Marine drugs*, 12, 2700-2730. DOI:10.3390/md12052700.

- Díaz, J. & Thilaga, R. (2016). Screening of antimicrobial activities in the ink of cephalopods against human pathogens. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 2359-2367.
- Glass, K. (2014). Chemical and Physical Analysis of Melanin in Complex Biological Matrices. Tesis para obtener Doctorado. Graduate School of Duke University.
- Glass, K., Ito, S., Wilby, P. *et al.* (2012). Direct chemical evidence for eumelanin pigment from the Jurassic period. *PNAS*, 109 (26), 10218-10223.
- Guo, X., Chen, S., Hu, Y., Li, G., Liao, N., Ye, X. & Xue, C. (2013). Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity. *Journal Food Science Technology*, 1-7.
- Magarelli, M., Passamonti, P. & Renieri, C. (2010). Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia Officinalis*). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 5 (2), 18-28.
- Mbonyiryvuzze, A. (2014). Indigenous Natural Dyes for Grätzel Solar Cells: Sepia Melanin. Tesis para obtener el grado de Maestría. University of South Africa.
- Mbonyiryvuzze, A., Nuru, Z., Ngom, B., Mwakikunga, B., Dhlamini, S., Park, E. & Maaza, M. (2015). Morphological and chemical composition characterization of commercial *Sepia* melanin. *American Journal of Nanomaterials*, 3 (1), 22-27.
- Nirmale, V., Nayak, B., Kannappan, S. & Basu, S. (2002). Antibacterial effect of the Indian squid, *Loligo duvauceli* (d'Orbigny) ink. *J. Indian Fish. Assoc.*, 29, 65-69.
- Nithya, M., Ambikapathy, V. & Panneerselvam, A. (2011). Effect of pharaoh's cuttlefish ink against bacterial pathogens. *Asian J. Plant Sci. Res.*, 1, 49-55.
- Nosanchuk, J., & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (11), 3519-3528.
- Peruru, D., S., R., VH, N., Sandeep, Priya, S., Raju, S. & Begun, S. (2012). Isolation of eumelanin from *Sepia officinalis* and investigation of its antimicrobial activity by ointment formulation. *International Journal of Pharmacy*, 2 (2), 67-72.
- Petkovic, M. V. (2013). Determinación de la actividad antimicrobiana de la melanina purificada, a partir de la tinta de *Octopus mimus Gould*, 1852 (Cephalopoda: Octopodidae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41, 584-587. Doi:103856/vol41-issue3-fulltext-20.
- SAGARPA (2016). Inicia captura del pulpo en la Península de Yucatán. P. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/Boletines/Paginas/201607B098.aspx>. Fecha de consulta 25 de abril de 2017.
- Smiline, G., Priyadharshini, V., Suba, P., P., H. & R, R. (2012). Antibacterial effect of squid ink on ESBL producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 41, 338-343.
- Vennila, R., Rajesh, R., Kanchana, S., Arumugam, M. & Balasubramanian, T. (2011). Investigation of antimicrobial and plasma coagulation property of some molluscan ink extracts: Gastropods and Cephalopods. *African Journal of Biochemistry Research*, 5 (1), 14-21.
- Wang, H., Pan, Y., Tang, X. & Huang, Z. (2006). Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans* seeds. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 39 (1), 496-502.
- Wang, F., Xie, Z., Ye, X., Deng, S., Hu, Y., Guo, X. & Chen, S. (2014). Effectiveness of treatment of iron deficiency anemia in rats with squid ink melanin-Fe. *Food Funct*, 5, 23-128.