

Short Communication

Determinación de la actividad antimicrobiana de la melanina purificada, a partir de la tinta de *Octopus mimus* Gould, 1852 (Cephalopoda: Octopodidae)

Marco Vega Petkovic¹

¹Departamento Ciencias Básicas, Universidad Santo Tomás
Héroes de la Concepción 2885, Iquique, Chile

RESUMEN. Los cefalópodos, constituyen importantes modelos biomédicos orientados a vertebrados, con potencial farmacológico. Estos animales poseen una glándula de tinta, que produce un líquido marrón o negro (tinta), con una elevada concentración de melanina, a la cual se le han atribuido propiedades antibacterianas. Con esta información, se busca determinar el efecto protector de la melanina de *Octopus mimus*, mediante la extracción y purificación de la tinta y posterior evaluación de su actividad antimicrobiana frente a dos cepas (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*). Los resultados indican una actividad antimicrobiana moderada, en comparación con el antibiótico comercial (ampicilina 0,05 mg mL⁻¹), y una concentración inhibitoria mínima diferencial entre ambas cepas bacterianas.

Palabras clave: pulpo, *Octopus mimus*, melanina, actividad antibacteriana.

Determination of the antimicrobial activity of purified melanin from the ink of *Octopus mimus* Gould, 1852 (Cephalopoda: Octopodidae)

ABSTRACT. Cephalopods are important biomedical models oriented to vertebrates, with pharmacological potential. These animals possess a gland of ink, which produces a black or brown liquid (ink), with high concentration of melanin, which have been ascribed antibacterial properties. Based on this information, we sought to determinate the protective effect of *Octopus mimus* melanin through the extraction and purification of the ink, and further evaluation of its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Our results indicate a moderate antimicrobial activity, compared with commercial antibiotic (ampicillin 0.05 mg mL⁻¹), and a minimum inhibitory concentration differential between the two bacterial strains.

Keywords: *Octopus mimus*, melanin, antibacterial activity.

Corresponding author: Marco Vega Petkovic (mvegap@santotomas.cl)

Debido a sus características biológicas, hoy en día, además de un interés económico, los cefalópodos constituyen importantes modelos biológicos para estudios biomédicos orientados a vertebrados, en aspectos neurofisiológicos, toxicológicos, conductuales, moleculares, endocrinos y bromatológicos, entre otros, los cuales están en continua investigación en el National Resource Center for Cephalopods (NRCC).

Los cefalópodos son animales nadadores dioicos, carnívoros y de concha interna reducida (Vega, 2009). En la cavidad del manto poseen un sistema digestivo dispuesto en forma de U y, a excepción de algunas especies de profundidad, todos poseen un órgano especial provisto de una glándula y una bolsa de la tinta, junto al intestino, que desemboca en el ano

(Vega, 2009). La glándula produce un líquido marrón o negro, con una elevada concentración de melanina, que se almacena en la bolsa de la tinta. Cuando el cefalópodo se encuentra en peligro, expulsa la tinta a través del ano. La tinta, que es de naturaleza alcaloide, disminuye o bloquea los órganos quimiorreceptores de sus depredadores, formando una cortina de humo que confunde al enemigo (Hanlon & Messenger, 1996).

La melanina es uno de los pigmentos más comunes y de mayor distribución en la naturaleza (Urán & Cano, 2008). Es responsable de la coloración de plantas y animales, se encuentra en los ojos, cabello, piel, plumaje, cáscara de los huevos, cutícula de los insectos, en la pared y el citoplasma de muchos microorganismos, en las neuronas de la sustancia nigra, en los hepatocitos en los humanos, y también en

la tinta de los cefalópodos (Urán & Cano, 2008). La melanina de la tinta de los cefalópodos es, principalmente, del tipo eumelanina, que es sintetizada desde el indol-5,6-quinone, que es producido vía 5,6-dihydroxyindol, y 3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA) a partir de la tirosina (Sugiyama *et al.*, 1989). Se le han atribuido varias propiedades, tales como, camuflaje y defensa ante depredadores (Derby, 2007), conservación de alimento (Sugiyama *et al.*, 1989), elevación de la competencia inmunológica, efectos contra la radiación (Lei *et al.*, 2007), efectos antitumorales y antioxidantes (Zhong *et al.*, 2009), efectos antibacterianos (Sugiyama *et al.*, 1989; Funatsu *et al.*, 2005) y actividad antiviral, contra el virus de la inmunodeficiencia humana (Urán & Cano, 2008), entre otras. Debido al amplio desarrollo en los últimos años de los medicamentos de origen marino, la búsqueda de fármacos eficaces de protección celular procedentes del mar se ha convertido en una importante actividad (Zhong *et al.*, 2009).

En el caso de los cefalópodos de aguas chilenas, su alta biodiversidad, importancia pesquera (Rocha & Vega, 2003; Vega, 2009), ciclos biológicos, estrategias de vida, estructuras duras y blandas, comercialización y alimentación del ser humano, resultan idóneas y pueden asegurar un enorme potencial subutilizado para la producción de compuestos con propiedades farmacológicas (Sundaram, 2009; Rajasekharan *et al.*, 2011). No obstante, con excepción de *Dosidicus gigas*, protagonista en el crecimiento de la neurofisiología (Schmiede & Acuña, 1992), ninguna de las restantes especies ha despertado un verdadero interés en Chile para su uso en investigaciones biomédicas.

Con base en la información anterior, se buscó medir el efecto protector de la melanina de *Octopus mimus*, a través de la extracción y purificación de la tinta y posterior evaluación de su actividad antimicrobiana, mediante la concentración inhibitoria mínima (CIM), frente a dos cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*).

A partir de los desembarques de la flota artesanal de Iquique, en octubre de 2011, se colectaron diez ejemplares en buen estado de pulpo del norte, *Octopus mimus*. Los pulpos de los que se extrajo tinta (10 ejemplares), medían entre 110 y 150 mm de longitud dorsal de manto, y pesaron entre 880 y 1600 g. Sobre la base de mediciones estandarizadas para cefalópodos (Vega, 2009), cada uno fue identificado a nivel específico. De cada ejemplar se extrajo la bolsa de tinta, se pesó y almacenó en bolsas plásticas etiquetadas a -15°C, hasta su análisis en el laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás de Iquique. A continuación, con la tinta descongelada, se procedió a extraer y purificar la melanina mediante

tratamiento con 0,5 M de HCl, bajo agitación magnética (Magarelli *et al.*, 2010), añadiendo a cada muestra el doble de solución de HCl 0,5 M, 30 min de agitación magnética, reposo por 24 h a 10°C, separación del sólido por centrifugado a 10.000 rpm y 5°C por 15 min, lavado del sólido tres veces con HCl 0,5 M, agua y acetona, y secado por 24 h. La melanina obtenida fue pesada y preparada disolviendo cada muestra en 0,1 M de buffer de carbonato de sodio (pH 10,3), hasta obtener una concentración de trabajo 4 mg mL⁻¹. De cada muestra de tinta se obtuvo el rendimiento de melanina sobre la cantidad de tinta de la bolsa. Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la melanina de *O. mimus*, se utilizó el método de macrodilución, mediante el cual, fueron reconstituidas a temperatura ambiente dos especies bacterianas que se mantenían congeladas y, posteriormente, cultivadas en medio sólido (agar sangre y Mc Conkey BBL), a 37°C por 24 h en condiciones de aerobiosis en estufa de cultivo (Memert). Las dos cepas bacterianas correspondieron al tipo *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Luego, se preparó el inóculo de trabajo tomando 4 a 5 colonias bacterianas, bien aisladas del cultivo ya crecido, en medio sólido nutritivo y su posterior inoculación en 5 mL de caldo Müller Hinton BBL, incubando por 2 h a 37°C en estufa. Enseguida, se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina 0,9% estéril hasta 0,5 de la escala de McFarland, quedando cada suspensión de 1 a 2x10⁸ UFC mL⁻¹ aproximadamente. Posteriormente, se usó el método de diluciones seriadas dobles (1:2) en medio líquido (Vanden & Vlietinck 1991), por medio del cual se depositó en tubo Kant 0,2 mL de melanina extraída del pulpo en 0,2 mL de solución salina 0,9% estéril. Se obtuvo 5 diluciones dobles (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) y se inocularon los tubos Kant, que contenían las distintas diluciones, con 0,1 mL de cultivo bacteriano líquido ajustado a 0,5 McFarland correspondiente a *E. coli* y *S. aureus* por separado. Luego se incubaron los tubos a 37°C por 24 h, y se examinó la turbidez observada en cada tubo y posterior siembra en agar nutritivo (Müller Hinton BBL), para comprobar la mortalidad bacteriana. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de la melanina de cefalópodo frente a cada bacteria, se determinó a través de la inhibición del crecimiento bacteriano en 90%. Finalmente, se elaboró y corrió en paralelo un control positivo hecho a partir de una solución de ampicilina 0,05 mg mL⁻¹, el cual se trató con la misma técnica de las diluciones seriadas dobles hasta determinar la CIM, y a su vez, se elaboró y corrió un control negativo hecho a partir del buffer de extracción usado para diluir la melanina presente en la tinta del pulpo, el cual fue tratado bajo las mismas condiciones.

Tabla 1. Actividad antibacteriana de melanina 4 mg mL⁻¹ de *O. mimus*. Control positivo (ampicilina 0,05 mg mL⁻¹).

Cepa bacteriana	Melanina mg mL ⁻¹					Ampicilina mg mL ⁻¹				
	0.05	0.15	0.4	1.3	4	0.002	0.001	0.002	0.01	0.02
<i>Staphylococcus aureus</i>	---	---	--	+	+	---	---	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	---	---	--	-	+	---	---	-	+	+

No hay actividad. (-) 90.000 ufc mL⁻¹, (--) 100.000 ufc mL⁻¹, (---) > 100.000 ufc mL⁻¹; Hay actividad (+).

presente en la tinta del pulpo, el cual fue tratado bajo las mismas condiciones.

La melanina del pulpo mostró actividad antimicrobiana contra ambas cepas bacterianas, ya que a concentraciones menores a 0,4 mg mL⁻¹ de melanina y 0,002 mg mL⁻¹ de ampicilina (diluciones iguales y menores a 1:27), hubo resistencia o desarrollo bacteriano en ambas cepas a partir de 100.000 y 90.000 ufc mL⁻¹, respectivamente (Tabla 1). La concentración inhibitoria mínima (CIM) de la melanina contra *E. coli*, fue de 1,3 mg mL⁻¹, mientras que contra *S. aureus*, fue de 4 mg mL⁻¹. El control positivo, que correspondía a una solución de ampicilina 0,05 mg mL⁻¹ (antibiótico), presentó una CIM de 0,01 mg mL⁻¹ para ambas cepas bacterianas. El control negativo, en cambio, correspondiente al buffer de extracción, no presentó ninguna actividad antimicrobiana.

Para esta especie, los resultados indican que la melanina posee actividad antimicrobiana, más baja que la de un potente antibiótico comercial (ampicilina 0,05 mg mL⁻¹). La actividad antimicrobiana ha sido estudiada en varios moluscos. En el caso de los cefalópodos, se ha reportado actividad en distintas estructuras, tales como masas de huevo, extracto metanólico del tejido corporal y tinta (Takai *et al.*, 1983; Sugiyama *et al.*, 1989; Funatsu *et al.*, 2005; Sundaram, 2009; Rajasekharan *et al.*, 2011; Ramasamy *et al.*, 2011). En el caso de esta última estructura, se ha estudiado la actividad antibacteriana de *Photololigo duvacei*, *Sepia pharaonis* y *Sepioteuthis lessoniana* contra especies de patógenos humanos (Mochizuki, 1979; Nirmale *et al.*, 2002; Chakco & Patterson, 2005), y de *Octopus vulgaris* (Mochizuki, 1979) contra secreciones de jugos gástricos de rata (Mimura *et al.*, 1982), entre otras. Hasta ahora, no había información respecto de la actividad antimicrobiana de la melanina del pulpo del norte de Chile (*Octopus mimus*).

En cuanto a la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la melanina, el método de macrodilución resulta idóneo y estándar en este

tipo de estudio, sin embargo, también es usual complementarla con el método de difusión en agar (Koneman *et al.*, 1987), situación que se pretende realizar en un estudio posterior.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Fondo de Investigación de la Dirección y Postgrado de Universidad Santo Tomás (Proyecto Investigación D.N.I.P. UST).

REFERENCIAS

- Chakco, D. & J. Patterson. 2005. Effect of pharaoh's cuttlefish, *Sepia pharaonis* ink against bacterial pathogens. *Indian J. Microbiol.*, 45(3): 223-226.
- Derby, C.D. 2007. Escape by inking and secreting: marine molluscs avoid predators through a rich array of chemicals and mechanisms. *Biol. Bull.*, 213: 274-289.
- Funatsu, Y., K. Fukami, H. Kondo & S. Watabe. 2005. Improvement of "Kurozukuri Ika-Shiokara" (Fermented squid meat with ink) odor with *Staphylococcus nepalensis* isolated from the fish sauce mush of frigate mackerel *Auxis Rochei*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 71: 611-617.
- Hanlon, R.T. & J.B. Messenger. 1996. Cephalopod behaviour. Cambridge University Press, Cambridge, 220 pp.
- Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell & H.M. Sommers. 1987. Diagnóstico microbiológico. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 386 pp.
- Lei, M., J.F. Wang, L. Pang, Y.M. Wang, S.G. Chen & C.H. Xue. 2007. Effects of sepia on the metabolism of blood lipid and antioxidant ability in hyperlipidemia rats. *Chin. J. Mar. Drugs.*, 3: 30-33.
- Magarelli, M., P. Passamonti & C. Renieri. 2010. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia officinalis*). *Rev. CES Med. Vet. Zootec.*, 5(2): 18-28.

- Mimura, T., K. Maeda, H. Tsujibo, M. Satake & T. Fujita. 1982. Studies on biological activities of melanin from marine animals. II. Purification of melanin from *Octopus vulgaris* Cuvier and its inhibitory activity on gastric juice secretion in rats. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(4): 1508-1512.
- Mochizuki, A. 1979. An antiseptic effect of cuttle fish ink. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45(11): 1401-1403.
- National Resource Center for Cephalopods (NRCC). 2012. <http://www.gulfbase.org/organization/-view.php?oid=nrcc>. Reviewed: 3 July 2012.
- Nirmale, V., B. Nayak, S. Kannappan & S. Basu. 2002. Antibacterial effect of the Indian squid *Loligo duvauceli* (d'Orbigny) ink. *J. Indian. Fish. Assoc.*, 29: 65-69.
- Rajasekharan, N., J.D. Pillai, S.M. Joseph, P. Gomathi, P.V. Senan & P.M. Sherief. 2011. Cephalopod research and bioactive substances. *Indian J. Geo-Mar. Sci.*, 40(1): 13-27.
- Ramasamy, P., N. Subhpradha, A. Srinivasan, V. Shanmugam, J. Krishnamoorthy & A. Shanmugam. 2011. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of methanolic extract from selected species of cephalopods on clinical isolates. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5(23): 3884-3889.
- Rocha, F. & M.A. Vega. 2003. Overview of cephalopod fisheries in Chilean waters. *Fish. Res.*, 60: 151-159.
- Schmiede, P. & E. Acuña. 1992. Regreso de las jibias (*Dosidicus gigas*) a Coquimbo. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 65: 389-390.
- Sugiyama, M., S. Kousu, M. Hanabe & Y. Okuda. 1989. Utilization of squid. Koseisha Koseikaku, Tokyo, 250 pp.
- Sundaram, S. 2009. The various uses of cephalopods. *Fishing Chimes*, 29(8): 23-25.
- Takai, M., K. Yamazaki, Y. Kawai, N. Inove & H. Shinano. 1983. Effect of squid liver skin and ink on microbiological characteristics of 'Ika-Shiokara' during ripening process. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 59: 1617-1623.
- Urán, M.E. & L.E. Cano. 2008. Melanin: implications in some disease pathogenesis and its capacity to evade the host immune response. *Infectio*, 12(2): 357-377.
- Vanden B., D.A. & A.J. Vlietinck. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: P.M. Dey, J.B. Harborne & K. Hostettmann (eds.). *Assays for bioactivity*. *Method. Plant Biochem.*, 6: 47-69.
- Vega, M.A. 2009. Sistemática y biogeografía de cefalópodos de aguas chilenas. Rill Editores, Santiago, 288 pp.
- Zhong, J.P., G. Wang, J.H. Shang, J.Q. Pan, K. Li, Y. Huang & H.Z. Liu. 2009. Protective effects of squid ink extract towards hemopoietic injuries induced by cyclophosphamide. *Mar. Drugs.*, 7: 9-18.

Received: 9 July 2012; Accepted: 6 June 2013