

INSET – INSTITUTO SUPERIOR DE ENSEÑANZA TÉCNICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE MELANINA
OBTENIDA DE FIBRA DE GUANACOS (*Lama guanicoe*)**

Gobernador Gregores, Santa Cruz, Argentina.

2023



Marta García

Stefanía Ortiz

Juan Bautista Beltramino

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE MELANINA
OBTENIDA DE FIBRA DE GUANACOS (*Lama guanicoe*)**

Relatório apresentado à 7ª FEMIC - Feira
Mineira de Iniciação Científica.

Orientação do Prof. Juan Bautista Beltramino



Gobernador Gregores, Santa Cruz, Argentina.

2023

RESUMO

La utilización de antimicrobianos para el control de gérmenes es una práctica habitual, que debido a su uso masivo e indiscriminado trae consigo algunas consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes. El objetivo de este ensayo es comprobar la eficacia antibacteriana de la melanina obtenida a partir de fibras de guanaco (*Lama guanicoe*). Las melaninas son un grupo de pigmentos presentes en todos los grupos biológicos y poseen una variedad de funciones relacionadas con la protección, resistencia y sobrevivencia de múltiples organismos ante factores ambientales. En este trabajo las fibras fueron recolectadas de animales esquilados en estancias de la zona. La separación y obtención de melanina comprendió las siguientes etapas: Disolución de un homogeneizado de la fibra en medio alcalino, NaOH al 10% en agua, en un baño, a 60⁰C, durante 40 minutos. Separación de la fracción feomelánica soluble de la fracción eumelánica que precipita, mediante centrifugación a altas RPM. Se obtuvieron concentrados de eumelanina, mediante neutralización, con HCl, hasta obtener un pH neutro y posterior centrifugación a altas RPM. Con la eumelanina así obtenida se embebieron discos de papel de filtro que se colocaron sobre cajas de petri con medio de cultivo ARP sembradas con muestras de la superficie interna de las manos de algunos alumnos participantes del ensayo. Las cajas sembradas y con el papel de filtro embebido en eumelanina presentaron un halo de inhibición en cercanías del papel, de 0,5 a 0,8 cm. Se concluye en esta primer aproximación a la acción antibacteriana de la melanina que según el resultado obtenido, hubo respuesta antimicrobiana, ya que se pudo visualizar un halo de inhibición en las cajas de petri con el papel de filtro embebido en eumelanina.

Palavras-chave: Melanina, antimicrobiana, fibra de guanaco.



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 JUSTIFICATIVA	6
3 OBJETIVO GERAL	7
4 METODOLOGIA	8
5 RESULTADOS OBTIDOS	9
6 CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS	10
REFERÊNCIAS	11



1 INTRODUÇÃO

La utilización de antisépticos o antimicrobianos para el control de gérmenes es una práctica habitual, que debido a su uso masivo e indiscriminado trae consigo algunas consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes. Por ello es de interes realizar ensayos con recursos locales con el objeto de detectar nuevas fuentes de agentes microbianos. Se utilizó en este ensayo fibra de guanacos (*Lama guanicoe*) que fueron esquilados en silvestría, es una actividad novedosa en nuestro país y en el mundo, es un sistema apto para campos con grandes poblaciones de guanacos, que equilibra su alto riesgo con volúmenes muy importantes de fibra obtenidos, en poco tiempo.

El vellón de guanacos contiene dos tipos de fibras: las valiosas, finas y cortas (down) y las gruesas y largas (cerda). La proporción de fibras finas suele ser de 35 a 50%. Algunos productores separan manualmente parte de las fibras gruesas antes de ofrecer el vellón para venta. En ese caso el rendimiento de fibras finas asciende a 65–95% según el trabajo de separación realizado. (LAMAS, 2021) De este trabajo siempre queda un resto de fibras que se denominan al barrer, esta fibra constituye el material utilizado en este ensayo.

Las fibras de guanacos poseen, según las determinaciones realizadas y la bibliografía consultada, principios activos de importancia farmacológica. Las fibras de guanacos poseen un pigmento que se ha descrito como melanina, Por medio de diferentes estudios se ha comprobado que la melanina tiene efectos antimicrobianos ante un amplio espectro de bacterias gram positivas y gram negativas. También se demostró que muchos artrópodos generan melanina de forma acelerada cuando se da una infección fuerte causada por una bacteria u hongo.

En este trabajo se describe, un procedimiento para la obtención, a partir de esta fibra, extractos de melanina purificados mediante un procedimiento sencillo y poco costoso y La utilización de la melanina obtenida como un producto bacteriostático



2 JUSTIFICATIVA

Las fibras del guanaco, en muchas ocasiones en los frigoríficos donde se faenan, o luego de las esquilas en silvestría, las fibras que quedan como restos posteriores a la esquila, no le dan el valor comercial que tienen. Por lo tanto, resulta ser una materia prima de gran abundancia, la cual todavía no ha sido valorada ni explorada con totalidad, por lo que, en algunas zonas del país tendría un valor casi nulo en cuanto a su adquisición. En la actualidad, estudios e investigaciones han permitido determinar la composición química de las fibras, encontrando un porcentaje importante de melanina extraíble de las mismas, lo cual representa un gran potencial en la industria farmacéutica veterinaria. De esta forma, existe gran interés en la obtención de melanina a partir de las fibras de guanaco. Se ha demostrado la factibilidad de obtención por medio de experimentación a escala de laboratorio, mientras que la extracción de los componentes a escala industrial es un tema todavía no explorado ni propuesto. Por lo que, se considera un tema de gran importancia e interés el diseñar un proceso que sea aplicado a nivel industrial para el diseño de una planta con el objetivo de obtener mayor producción de las materias primas a través del aprovechamiento total de los residuos y desechos orgánicos. Por otra parte, el presente proyecto también busca solucionar problemas de sectores rurales, al generar un valor agregado mediante la compra de fibras de guanaco. Además de generar concientización por la reutilización de los mismos y también el interés por el manejo correcto de los mismos.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comprobar la eficacia antibacteriana de la melanina obtenida a partir de fibras de guanacos.

Contribuir al objetivo 3 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible al realizar actividades de investigación y desarrollo de medicamentos para las enfermedades transmisibles y no transmisibles que afectan primordialmente a los países en desarrollo.

3.2 Objetivos específicos

- Objetivo específico 1 - Localizar el pigmento melanina en las estructuras de fibras del guanaco utilizando técnicas químicas.
- Objetivo específico 2 - Caracterizar las melaninas de aislamientos seleccionados mediante técnicas físicas y químicas.
- Objetivo específico 3 - Sentar las bases para un futuro proceso de obtención de melanina partir de otras fuentes microbiológicas.



4 METODOLOGIA

Las fibras de guanacos fueron recolectadas de encierres de guanacos en silvestria.

Al estar algo sucias fueron lavadas con agua y luego secadas a temperatura ambiente sobre las mesadas del laboratorio escolar.

Separación y obtención de melanina en estado sólido a partir de la fibra. Comprendió las siguientes etapas:

- Disolución de un homogeneizado de la fibra en medio alcalino, NaOH al 10% em agua, en un baño, a 60°C, durante 40 minutos.
- Separación de la fracción feomelánica soluble, mediante centrifugación a altas RPM, de la fracción eumelánica precipitada.
- Obtención de un precipitado de eumelanina libre de feomelaninas, mediante lavado, con una solución acuosa de NaOH al 20% y agitación constante, y posterior centrifugación, en varias oportunidades.
- Obtención de concentrados sólidos de eumelanina, mediante neutralización, con HCl, hasta obtener un pH próximo a neutro y posterior centrifugación a altas RPM.

ENSAYOS IN-VITRO

Se seleccionó como medio de cultivo estándar, el agar nutritivo de recuento en placa (ARP) de Laboratorios Britania.

- Toma de muestras previa
- Obtención de muestras microbiológicas relacionada con la higiene de manos de alumnos.
- Se utilizaron hisopos estériles humedecidos con una solución fisiológica estéril para obtener las muestras de las manos de los participantes del ensayo.
- Para la siembra se procedió a rozar delicadamente con el hisopo sobre el medio de cultivo.
- Quedaron dos cajas de petri sin sembrar solo con el medio.

Susceptibilidad de los gérmenes a la melanina

- Preparación de la melanina: 1 gramo de la eumelanina obtenida se suspendió en 4 ml de agua destilada.
- Se colocó esa preparación en una caja de petri.
- Utilizando papel de filtro se cortó el perímetro de aproximadamente 0,5 cm de un círculo de diámetro menor al de la caja de petri emulando las preparaciones de antibiogramas. Se prepararon varios papeles de filtro con este formato.
- Los papel de filtro así cortados se embebieron en el líquido preparado del La eumelanina.
- Se colocaron estos discos de papel de filtro sobre 4 cajas de petri sembradas anteriormente.



- La totalidad de las cajas se llevó a Estufa de cultivo durante de 48 horas a 37°C.
 - Luego de esta incubación se observó el desarrollo de colonias en todas las cajas. En las cajas con el papel de filtro embebido con eumelanina se observaron zonas sin desarrollo de gérmenes en cercanías del papel.
 - Se hicieron varias repeticiones, (más de tres).
- Se observaron los halos de inhibición por efecto de la eumelanina.

5 RESULTADOS OBTIDOS

Rendimiento de la melanina.

Si bien la disponibilidad es amplia, a fin de tener una idea de la melanina que se puede obtener, de 5 g de fibra luego de ser atacadas con el hidróxido de sodio y neutralizadas con el ácido clorhídrico, centrifugadas y secadas a temperatura ambiente en el laboratorio, se obtuvo 1 g de eumelanina.

Caracterización de la melanina

Luego del procedimiento de centrifugación se obtuvieron una fracción líquida que es La feomelanina y otra fracción que sedimentó a la que es la Eumelanina. En este ensayo se utilizó solo la eumelanina. De todas formas en ensayos posteriores se puede intentar utilizar ambas fracciones a fin de no desperdiciar buena parte de la totalidad de la melanina obtenida.

Actividad antibacteriana:

Las dos cajas sin sembrar permanecieron las 48hs. sin desarrollo de colonias.

Las cuatro cajas sembradas pero sin los discos de papel de filtro impregnadas con melanina desarrollaron numerosas colonias blanquecinas brillantes y de superficie lisa.

Las cuatro cajas sembradas y con el papel de filtro embebido en eumelanina presentaron un halo de inhibición en cercanías del papel, de 0,5 a 0,8 cm.(Figura 1.)

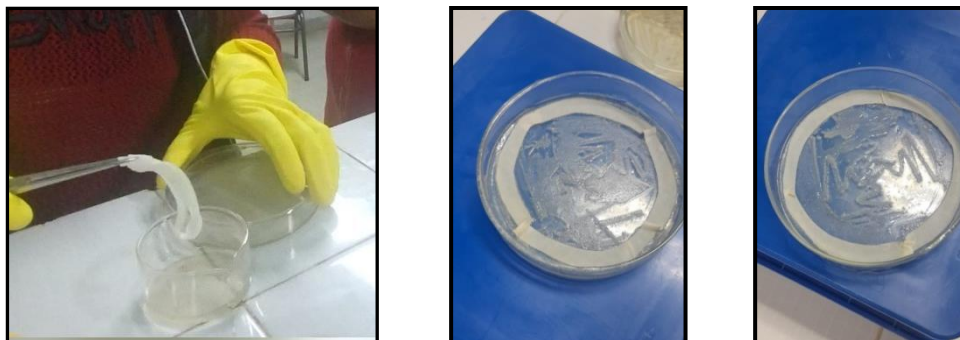


Figura 1. Halos de inhibición.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE MELANINA OBTENIDA DE FIBRA DE GUANACOS



6 CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Se concluye en esta primera aproximación a la acción antibacteriana de la melanina que según el resultado obtenido, hubo respuesta antimicrobiana, ya que se pudo visualizar um halo de inibição en las cajas de petri con el papel de filtro embebido en eumelanina.



REFERÊNCIAS

- Cordero, R.J.B., Cassadevall, A. (2020) Quick guide Melanin. *Current Biology Magazine* 30,R142-R143. Recuperado el 24 de marzo de 2022 de la base de datos Cell Press.
- Daverio, M. S. (2014). Caracterización de genes vinculados al crecimiento y al color de capa en la Llama (*Lama glama*) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata). Recuperado el 20 de marzo de 2023.
- Gosset Lagarda, G. (2022) La melanina en sitios web. *Hypatia .Revista Científico – Tecnológica de Gobierno del estado de Morelos*. Recuperado el 24 de abril de 2023, de <https://www.revistahypatia.org/317>
- Guo, W., Guo, X., Yang, L., Wang, T., Zhang, M., Duan, G., Liu, X., Li, Y., (2021). Synthetic melanin facilitates MnO supercapacitors with high specific capacitance and wide operation potential window. *Polymer*, 235-124276. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124276>
- Martínez, L. M., Martínez, A., Gosset, G. (2021). El enorme potencial de las melaninas como biomateriales, en salud y ambiente [versión electrónica]. *Biotecnología en movimiento*, núm. 26. 3-7. Recuperado el 14 de abril de 2023
- Martinez,L.M., Martinez,A., Gosset,G. (2021). El enorme potencial de las melaninas como biomateriales, en salud y ambiente. *Biotecnología en Movimiento. Revista de divulgación del Instituto de Biotecnología de la UNAM*, 26, 3-7. Recuperado el 10 de abril de 2023.
- Mueller, J. P., Rigalt, F., Cancino, A. K., & Lamas, H. (2021). Calidad de las fibras de camélidos sudamericanos en Argentina [Quality of the fiber from South American camelids in Argentina]. *Revista Argentina de Producción Animal*, 41(3), 123-130. Recuperado el 2 de febrero de 2023.
- Tello Cetina, J., Chan Pat, A., Rivera Muñoz, G., Tamayo Cortez, J., Jiménez Suaste, N., Loria Sunsa, H. (2018). Uso de la melanina del pulpo (*Octopus maya*) de Yucatán como agente antibacteriano. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, vol. 35(1), 13-17. Recuperado el 4 de junio de 2022 de la base de datos Aqua Docs.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO
DE MELANINA OBTENIDA DE FIBRA DE GUANACOS**



APÊNDICE 1