

## **DEDICATORIA**

Dedico a Magdalena mi madre y a mi hija Paula por ser mi fuerza impulsadora, a mis hermanos Silvia, Carlos, Dario y a mi padre Carlos, por ser mi apoyo incondicional.

**Fernanda Paulina Tupiza Amores**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco al Dr. Angel Guevara por haber confiado en mi y darme la oportunidad del ser parte del proyecto "APLICACIONES BIOMEDICAS DE LA SERICULTURA", en convenio con el Instituto Italo Latino Americano. Al Ing. Marcelo Patiño como Coordinador del Proyecto de Sericultura en Ecuador, a la Dra. Giovanna Allara-Salice como coordinadora de IILA-Italia, y a la Ing. Sandra Soria como Referente del Ecuador para la Red Latinoamericana de la Seda por brindarme su apoyo.

Así como también al Dr. Manuel Baldeón M.D. Ph.D, jefe del Laboratorio de Inmunología del Colegio de Ciencias de la Salud de la Universidad San Francisco, por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme el apoyo suficiente para la realización de mi investigación.

A la Dra. Blanca Naranjo por haberme brindado todos sus conocimientos, paciencia y dedicación durante toda mi vida universitaria y ante todo en la elaboracion de mi tesis.

A Stephanie Santander, por brindarme sobre todo su amistad, sus conocimientos, paciencia y colaboración.

**Fernanda Paulina Tupiza Amores**

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

Evaluando las diferentes aplicaciones que se da a las dos proteínas formadoras del capullo del gusano de seda *Bombyx mori*, el presente estudio se enfoca en el aislamiento de sericina para preparación de cosméticos y de fibroína como soporte de crecimiento celular.

Basándose en los avances que se han producido en la última década con la aplicación de herramientas de biología molecular y celular, permitiendo el desarrollo de nuevos conceptos terapéuticos en biomedicina, los cuales abren nuevos campos como son: la Medicina Regenerativa y la Ingeniería de Tejidos (Cenis, 2009).

La aplicación de la seda como biomaterial, a través de su uso en suturas quirúrgicas, fue temprana y data del siglo XIII. Sin embargo, los nuevos conocimientos adquiridos sobre las propiedades y estructura de la seda, han permitido su uso a nuevas aplicaciones, ya sea en la industria cosmetológica o en la industria biomédica (Altman., 2003).

La industria Biomédica y la Medicina Regenerativa se basan en el conocimiento detallado de la biología y manejo de las células madres, basándose en la posibilidad real de aislar células troncales (stem cells), desarrollarlas en soportes (scaffolds) adecuados y favorecer su diferenciación a diversos tejidos mediante la acción de factores de crecimiento celular específicos (Cenis., 2009). La regeneración de tejidos se ha convertido en un gran desafío en muchas enfermedades como lesiones traumáticas o reconstructiva (Hench LL.,1998).

En lo que tiene que ver con la Industria Cosmetológica, los microorganismos que afectan la piel de las personas especialmente sus rostros han sufrido variaciones en cuanto a su resistencia, como es el ejemplo de *Propionibacterium acnes* que en la última década ha tenido un aumento significativo en la resistencia a antimicrobianos de primera línea para el tratamiento del acné (Gübelin W., 2006), así como también se ha observado notables variaciones de *Malassezia furfur*, agente etiológico de la pitiriasis versicolor, en la sensibilidad antifúngica (Giusiano G., 2004).

## 1.2 JUSTIFICACION DEL PROBLEMA:

Aprovechando las propiedades de la seda de *Bombyx mori*, esta investigación pretende aumentar el rendimiento de las células en soportes de crecimiento celular adicionados con fibroína, así como también determinar la actividad antibacterial y antifúngica de la proteína sericina, frente a *Propionibacterium acnes* y *Malassezia furfur* respectivamente, microorganismos responsables de enfermedades cutáneas en el hombre.

La seda, es segregada por las glándulas sericígenas del gusano de seda (*Bombyx mori*), que la utiliza para elaborar el capullo, una estructura cerrada de protección en la que realiza la metamorfosis de larva a adulto. Consta de dos proteínas, una de ellas es la fibroína, que es una proteína polimérica y lineal, que alterna dominios amorfos y otros de lamina  $\beta$ . La otra proteína es la sericina, hidrosoluble y de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína (Cenis.,2009)

Las fibras de seda de *B. mori* han sido los principales materiales utilizados en aplicaciones biomédicas fundamentalmente como suturas. Durante décadas de uso, las fibras de seda han demostrado ser eficaces en muchas aplicaciones clínicas, como en el campo de la regeneración de hueso, cartílago y ligamentos. En este sentido, una aplicación muy interesante es la reconstrucción de ligamento cruzado de la rodilla (Cenis., 2009 & Altman et al., 2003).

El capullo de seda de *B. mori* contiene dos proteínas fibroína, y sericina. La fibroína se usa en la elaboración de armazones para crecimiento y diferenciación celular, estas aplicaciones son relativamente recientes alrededor de una década, por lo que aun no se ha aprovechado todo su potencial. La fibroína de la seda ofrece una gran versatilidad en todas sus presentaciones, propiedades como, resistencia mecánica,

biocompatibilidad y reactividad química en su superficie que permite la adhesión de todo tipo de moléculas bioactivas. Todo ello lo convierte en un sustrato casi ideal para el crecimiento y diferenciación de células humanas (Cenis., 2009).

Por otro lado la sericina es una proteína que trabaja sobre la superficie de la piel humana, formando una capa protectora para mantener y promover la retención de la humedad en la epidermis por largas horas, provocando que la textura mejore y que las arrugas prematuras se suavicen haciéndose menos evidentes (Zhaorigetsu, 2009). Además tiene alta actividad antibacteriana, antioxidante y antimicótica, esto ayuda a inhibir el crecimiento de microorganismos productores de numerosas enfermedades que afectan hoy en día la piel de las personas (Sarovart et al., 2003).

## **1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.3.1 Objetivo General**

Utilizar las proteínas de la seda de *Bombyx mori* en la preparación de cosméticos y soportes para el crecimiento celular.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Aislar las proteínas Sericina y Fibroína del capullo del gusano de seda *B. mori*.
- Identificar las proteína obtenidas a partir del capullo del gusano de seda *B. mori*
- Preparar un soporte de crecimiento celular a partir de la proteína Fibroína.
- Evaluar el soporte de crecimiento celular desarrollado a partir de la proteína Fibroína.
- Extraer la cera y ácidos grasos del capullo del gusano de seda *B. mori*
- Determinar el tipo de ácidos grasos que se encuentran en el capullo del gusano de seda *B. mori*
- Establecer el proceso de fabricación de la crema cosmética en base a la proteína Sericina
- Evaluar el efecto tóxico, antibacterial, antimicótico y la capacidad antioxidante de la proteína Sericina, como sustancia pura y como constituyente de una crema.

## 1.4 MARCO TEÓRICO

### 1.4.1 Antecedentes

Durante siglos, tanto hombres como mujeres, tuvieron un gran aprecio por el traje de seda, principalmente por su calidad (Cenis., 2009). La Seda es una proteína fibrosa, producida por una variedad de especies, incluyendo gusanos de seda (*Bombyx mori.*) y araña (Vollrath.,1999). La seda tiene una amplia gama de funciones, incluyendo a los capullos que sirven para proteger los huevos o larvas, a las fibras como soporte de las redes de las arañas que permiten la captura de insectos, dichas fibras son capaces de soportar altos impactos (Wang et al.,2006 ).

Las sedas producidas por el gusano de seda y la araña son sedas que más se han investigado, debido a su disponibilidad ya sea en la industria textil y en el uso de la historia médica (Kearns et al.,2008)

La seda obtenida del Gusano de seda (*Bombyx mori.*), es segregada por las glándulas sericígenas, que la utiliza para elaborar su capullo, una estructura cerrada de protección en la que realiza la metamorfosis de larva a adulto (Cenis., 2009). Este consta de dos proteínas: la fibroína que se a propuesto como material de implante y como material de andamiaje capaz de promover los procesos de regeneración de los tejidos (Altman et al., 2003) y la sericina como material protector de la piel el mismo que mantiene y promueve la retención de la humedad en la epidermis (Zhaorigetsu., 2009). Teniendo además una alta actividad antibacteriana, antioxidante y antimicótica, esto significa que la sericina puede detener la reacción de oxidación de los radicales libres e inhibir el crecimiento de microorganismos productores de numerosas enfermedades (Sarovart et al., 2003).

#### **1.4.2 Historia y Beneficios del gusano de seda *Bombyx mori*:**

El gusano de seda *Bombyx mori* ha sido domesticado para la producción de seda hace 5.000 años a partir del gusano de seda salvaje *Bombyx mandarina*. Como es el único insecto verdaderamente doméstico, es completamente dependiente de los seres humanos para su sobrevivencia y reproducción. En la antigüedad, fue un producto muy apreciado, siendo considerada “la Fibra de los Dioses”. En la Edad Media, su producción se extendió a Europa y más tarde, al resto del mundo (Casadio & Pescio., 2004) .

En la actualidad, es uno de los insectos económicamente más importantes en muchos países en desarrollo, debido a su cultivo a gran escala para la producción de seda (Michihiko, 2009). El volumen mundial comercializado es de 70.000 ton, representando el 1% del total de fibras textiles. El principal país productor es China. En Latinoamérica Brasil posee la mayor producción, siendo el tercer productor mundial con 6.000 ton / año (Casadio & Pescio.,2004).

*Bombyx mori* es el organismo modelo para Lepidópteros, el segundo grupo más grande de insectos, que incluye las plagas agrícolas más destructivas. Con el desarrollo de la biotecnología, *B. Mori* ha llegado a utilizarse como un biorreactor de gran importancia para la producción de proteína recombinantes (Tamura., 2000).





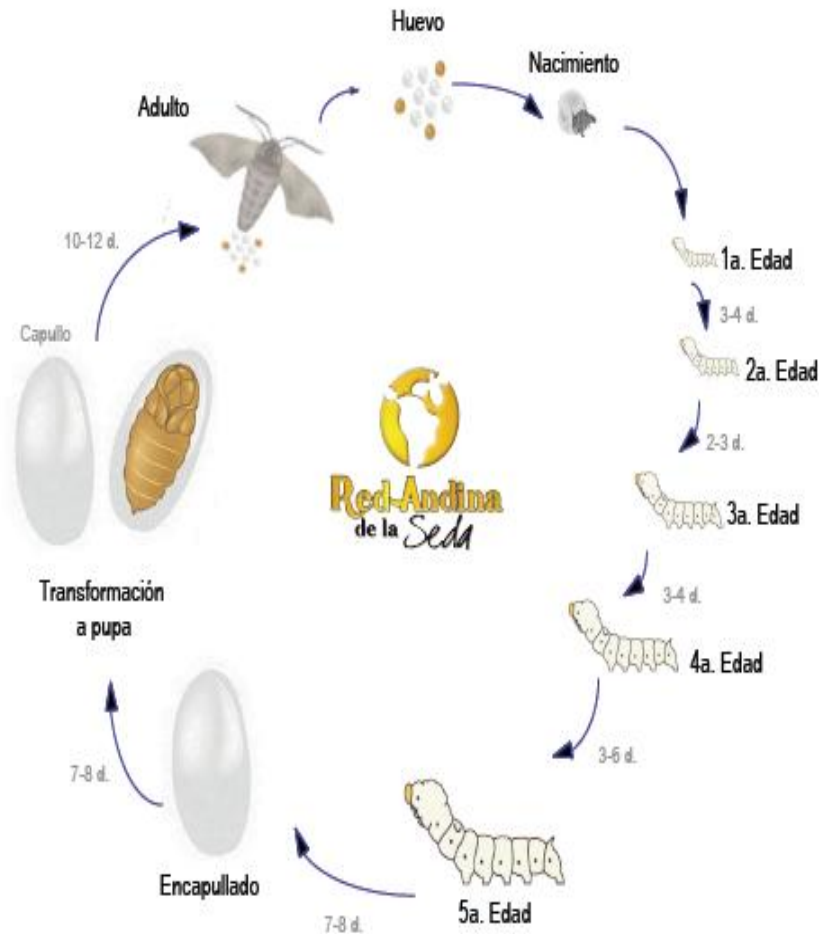
**Figura 1.1 Gusano de Seda *Bombyx mori***

La información sobre el gusano de seda no sólo tiene un fuerte impacto en la mejora de la sericultura, ya que también facilita el desarrollo de nuevos métodos de control contra plagas ( Michihiko, 2009).

### **1.4.3 Ciclo de vida de Gusano de Seda *Bombyx mori***

El Gusano de Seda *Bombyx mori*, se caracteriza por poseer el cuerpo cubierto por una cutícula no flexible, por esta razón, para poder aumentar su tamaño necesitan cambiar (mudar) la “piel”; este proceso, denominado muda, ocurre en esta especie 4 veces durante su vida juvenil interrumpiéndose al llegar al estado adulto (Casadio & Pescio.,2004).

Como todos los Lepidópteros, tienen su ciclo de vida dividido en las siguientes etapas principalmente:



**Figura 1.2** Ciclo de Vida Gusano de Seda *Bombyx mori* (Casadio & Pescio.,2004)

**Huevo:** Representa el período de descanso o latencia; pueden ser mantenidos a una temperatura entre 5 y 8 °C por 6 u 8 meses. Da origen a la larva que apenas nacida tiene un aspecto poco agradable: es peluda y de un color muy oscuro, característica que comúnmente pierde en los 2 primeros días de vida por efecto de la alimentación (Casadio & Pescio.,2004).

**Larva:** Después de 15 días a una temperatura de 24 o 25°C se produce la eclosión de los huevos. En el nacimiento, la larva o gusanito posee una longitud de 2 mm y al cabo de 4 ó 5 semanas y para completar su ciclo debe sufrir numerosas modificaciones de la que interesa es el peso, después de pasar por los 5 estadios, llega a medir 8 cm de longitud. Una vez

llegada la última fase de la quinto estadio larvario, busca un lugar seco y apropiado para tejer el capullo (Casadio & Pescio.,2004).

**Encapullado:** o crisálida, es una fase de aparente inactividad pero con una intensa actividad metabólica que ocurre dentro del capullo confeccionado por la larva durante 4 días. Lugar donde permanece durante 12 a 14 días, tiempo en el que se originarán los cambios metamórficos que llevarán a transformarle en mariposa (Casadio & Pescio.,2004).

**Adulto:** La crisálida da origen a la mariposa que representa la fase "perfecta". Poco después del nacimiento, machos y hembras se aparean durante varias horas, luego de lo cual las hembras depositan los huevos. Ambos sexos no se alimentan y mueren en pocos días. Luego del acoplamiento y con la deposición de los huevos, se da la continuidad del ciclo biológico del insecto (Casadio & Pescio.,2004).

#### 1.4.4 Cualidades y Estructura de la Seda:

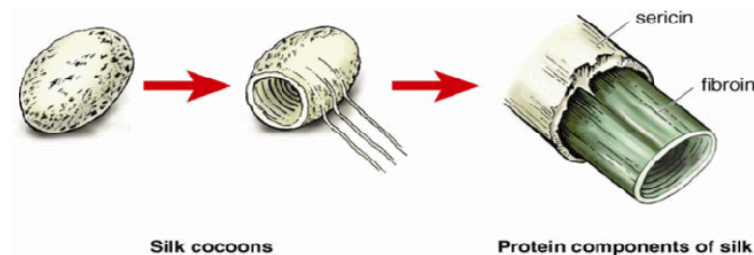
La seda, segregada por el gusano de seda (*Bombyx mori*), es utilizada para elaborar su capullo, ha demostrado ser eficaz como biomaterial. Dicho capullo produce un delicado hilo de seda de doble envolvente, que puede llegar a medir hasta 1.500 metros, constituida de 2 proteínas, fibroína que forma la capa interna y la sericina la cobertura externa del hilo (Rigono et al., 2005).



Figura 1.3 Capullo del Gusano de Seda *Bombyx mori*

Estas 2 proteínas contienen 18 aminoácidos como la glicina, alanina y la serina en diferentes cantidades (Altman et al., 2003).

La fibroína, es una proteína polimérica y lineal, que alterna dominios amorfos y otros de lamina beta. Constituye el 70% del peso del capullo. La sericina, es una proteína hidrosoluble de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína. La sericina es normalmente desechada en el proceso textil, aunque tiene diversas aplicaciones en medicina y cosmética (Cenis, 2009).



**Figura 1.4 Componentes estructurales de la Seda (Sobajo et al.,2008)**

## **1.4.5 Fibroína:**

### **1.4.5.1 Estructura de la fibroína**

La fibroína es una molécula gigante de 325 kDa, que comprende una porción cristalina alrededor de 2/3 y una región amorfa alrededor de 1/3. La porción cristalina contiene repetidos aminoácidos (-Gly-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-) a lo largo de su secuencia, formando un hoja- $\beta$  antiparalela que conduce a la estabilidad y propiedades mecánicas de la fibra (Kim et al., 2005).

Generalmente, las principales estructuras secundarias de la fibroína son ovillo aleatorio, el tipo amorfo y el tipo hoja- $\beta$  antiparalelas, que se forma a través de enlaces de hidrógeno entre las cadenas peptídicas adyacentes (Tsuboi et al., 2001). La fibroína se caracteriza como un bloque natural de copolímeros compuesto de bloques hidrófobos

con cadenas cortas de aminoácidos como la glicina y alanina y bloques hidrofílicos con cadenas largas de aminoácidos, así como aminoácidos cargados (Bini et al., 2004)

#### **1.4.5.2 Presentaciones y cualidades de la fibroína**

Mediante la combinación con otros polímeros naturales o sintéticos, como la celulosa (Freddi et al., 1995) o quitosano (Chen et al., 1997), la fibroína puede ser transformada en películas o fibras de seda para una serie de aplicaciones en la ingeniería de tejidos óseos, tejidos como los huesos y ligamentos y tejidos como la piel (Tie-lian et al., 2010)

De acuerdo a las cualidades que presenta la fibroína, esta puede elaborarse en diferentes configuraciones, según las necesidades: geles, películas, matrices porosas 3D, microfibras y microesferas. Su superficie presenta grupos carboxilo terminal a los que se pueden unir de forma covalente péptidos tales como, hormonas y factores de crecimiento, tales como la BMP-2 (proteína morfogenética del hueso 2). Estas proteínas favorecen de forma muy significativa tanto la adhesión como el desarrollo de los cultivos celulares implantados sobre la matriz (Sofia, 2001).



**Figura 1.5 Cilindro sólido de matriz porosa tridimensional de Fibroína (Cenis.,2009)**

El biomaterial andamio o matriz juega un papel clave en la transducción de señales ambientales a las células sembradas en él, en calidad, en esencia, como un

traductor entre el medio ambiente local y el tejido en desarrollo (Altman et al., 2003). El andamio debe ser esencialmente diseñado imitando la estructura y la función de los medios, que proporcionan soporte mecánico y regulan la actividad celular (Min et al., 2004). Además debe ayudar a la adhesión celular y la migración, así como la diferenciación celular (Jin et al., 2004).

La fibroína ofrece versatilidad como biomaterial (andamio o matriz) de diseño para su uso en la regeneración de tejido de hueso, cartílago, vasos sanguíneos, ligamentos y tendones, en el rendimiento mecánico y las interacciones biológicas son los principales factores para el éxito (Min et al., 2004)

### **1.4.5.3 Aplicaciones de la fibroína**

La fibroína, como proteína de naturaleza fibrosa tiene una amplia gama de estructuras moleculares, notables propiedades mecánicas, morfología controlable, capacidad de procesamiento versátil y opciones de modificación de superficie, se ha convertido en un prometedor biomaterial polimérico para ingeniería de tejidos (Altman et al., 2003; Wang et al., 2006).

#### **Aplicación en medicina como biomaterial**

La fibroína presenta características que la hacen muy interesante como biomaterial: es un material de naturaleza proteica, altamente biocompatible. No se verifica rechazo ni respuesta inflamatoria en los tejidos donde se injerta. El rechazo ocasional que se ha reportado con algunas suturas, se atribuye a la contaminación de la fibroína con sericina (Wang et al., 2006). Presenta una gran resistencia mecánica a tracción, junto a una gran flexibilidad. Es biodegradable, pero a un ritmo más lento que en otros biomateriales orgánicos, lo que permite una mejor consolidación de los tejidos. En 2 años se reabsorbe totalmente y no se encuentran rastros de la misma en los tejidos (Altman et al., 2003).

Por otra parte, las películas, fibras y geles de fibroína, han sido investigados con diferentes tipos de células incluyendo fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, células gliales, queratinocitos, hepatocitos, osteoblastos y células estromales de la médula, dando resultados prometedores al uso de fibroína como un implante como biomaterial (Unger et al., 2004).

## **1.4.6 Sericina**

### **1.4.6.1 Estructura y Función de la Sericina**

La sericina es un tipo de proteína globular soluble en agua que representa a una familia de proteínas cuya masa molecular oscila entre 10 y 310 kDa (Wei et al., 2005).

La sericina consta de 18 clases de aminoácidos, la mayoría de ellos con fuertes grupos laterales polares como el hidroxilo, carboxilo y al grupo amino (Wei et al., 2005). Los grupos hidroxilo fuertemente polares, posiblemente están relacionados con las propiedades físico-químicas de la sericina (Masahiro et al., 2000).

Además, la sericina contiene un 70 % de aminoácidos hidrofílicos de los 18 tipos de aminoácidos, lo que podría dar a la proteína una buena solubilidad y capacidad de absorber agua (Jin-Hong et al., 2006).

La sericina es especialmente rica en el ácido aspártico (~19%), así como la serina (~27%) (Jae et al., 2003). La composición de aminoácidos de la sericina se da en la siguiente tabla:

**Tabla 1.1 Composición de Aminoácidos de la sericina (Jin-Hong et al., 2006)**

Aminoácidos	g aminoácidos/100g proteína	Porcentaje de aminoácidos totales (%) <sup>a</sup>
Ser	20.21	27.3
Asp	13.93	18.8
Gly	7.91	10.7
Thr	5.57	7.5
Glu	5.29	7.2
Arg	3.64	4.9
Tyr	3.41	4.6
Ala	3.17	4.3
Val	2.82	3.8
Lys	1.54	2.1
His	1.27	1.7
Leu	1.25	1.7
Phe	1.17	1.6
Ile	0.94	1.3
Pro	0.90	1.2
Met	0.36	0.5
Cys	0.24	0.3
Trp	0.32	0.4
<b>Total</b>	<b>73.94</b>	
<b>Hidrofilico</b>	<b>51.69</b>	<b>70%</b>
<b>Hidrofóbico</b>	<b>21.93</b>	<b>30%</b>
<b>Aromáticos</b>	<b>4.90</b>	<b>6.6%</b>

La sericina contribuye cerca de 20 a 30% del peso total de capullo. Su principal función consiste en envolver a la fibroína. En presencia de sericina las fibras son duras, formando un ovillo aleatorio amorfo y en menor medida, organizado en una estructura hoja- $\beta$  (Voegeli et al., 1993).

#### 1.4.6.2 Formas de la sericina

La sericina se puede clasificar en 3 fracciones en función de su solubilidad, como sericina A, sericina B y sericina C. La sericina A es la capa más externa e insoluble en agua caliente. Contiene alrededor de 17,2% de nitrógeno y aminoácidos como; serina, treonina, glicina y ácido aspártico. La sericina B es la capa media y por hidrólisis ácida produce aminoácidos de sericina A, además de triptófano. Contiene 16,8% de nitrógeno. La sericina C es la capa más interna, que está adyacente a la fibroína y es insoluble en agua caliente y puede ser removido de la fibroína por el tratamiento de dilución con agua caliente con ácidos o bases. Por hidrólisis ácida, los



rendimientos de prolina, además de los aminoácidos de sericina B. También contiene azufre y un 16,6% de nitrógeno (Padamwar & Pawar., 2004; Sprange 1975). La sericina se ha dividido en varias especies basado en la solubilidad relativa, diversas fracciones de sericina también son designados en función de su comportamiento de disolución como una sericina A y B, o sericina I, II, III y IV, o S1, S2, S3, S4, S5 y como modificaciones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Voegeli et al., 1993). La principal conformación molecular de sericina es un ovillo aleatorio fácilmente soluble, mientras que la hoja- $\beta$  es una estructura más difícil de disolver. La absorción de humedad hace de la estructura molecular una agregación más densa y con formas cristalinas, con una solubilidad reducida (Padamwar & Pawar., 2004).

### **1.4.6.3 Propiedades de la sericina**

#### **Propiedad de Gelificación**

La sericina contiene una estructura de ovillo aleatorio y hoja- $\beta$ . La estructura de ovillo aleatorio es soluble en agua caliente y con la temperatura la estructura de ovillo aleatorio disminuye y se convierte en estructura de hoja- $\beta$ , lo que resulta en la formación de gel (Zhu et al., 1998).

#### **Transición Sólido-Gel**

La sericina tiene la propiedad de transición de sólido a gel, ya que se disuelve fácilmente en agua a 50-60 ° C y una vez más vuelve a gel en frío (Zhu et al., 1996).

#### **pH isoelectrico**

Como hay más ácido que residuos de aminoácidos básicos el punto isoelectrico de sericina es de aproximadamente 4,0 (Voegeli et al., 1993 ).

#### **La solubilidad de la sericina**

La solubilidad de la sericina en agua disminuye cuando las moléculas de sericina se transforman de ovillo aleatorio a la estructura de hoja- $\beta$ . La solubilidad de

sericina aumenta por la adición de poliacrilato de sodio y disminuye por la adición de poliacrilamida, formaldehído o agentes terminados con resina (Arai et al., 1995).

#### **1.4.6.4 Aplicaciones de la sericina**

La sericina debido a su naturaleza proteica es susceptible a la acción de las enzimas proteolíticas presente en el cuerpo y por lo tanto es digerible. Esta le da la propiedad de ser un material biocompatible y biodegradable. Debido a algunas propiedades adicionales como; capacidad gelificante, capacidad de retención de humedad y adherencia a la piel. Tiene amplias aplicaciones en medicina, farmacéuticos y cosméticos (Padamwar & Pawar.,2004). Los materiales modificados con sericina y compuestos de sericina son útiles como biomateriales degradables, materiales biomédicos y polímeros para la formación de artículos ya sea membranas orgánicas, fibras y tejidos (Zhang.,2002). La sericina se aplica como antioxidante en el ámbito de los medicamentos, cosméticos, alimentos y aditivos alimentarios (Kato et al., 2005).

#### **Aplicación en medicina y farmacéutica**

La sericina forma una emulsión muy estable cuando se agitan con agua en estado líquido inmiscible (Iida.,1999). La proteína sericina también se utiliza como película para la alineación horizontal de un líquido cristalino, para lograr una propiedad óptica uniforme y para aumentar la estabilidad de los productos (Yasushi N.,1994). Dándole la propiedad a la Sericina de biomaterial. Además la sericina sirve como biomaterial para la elaboración de lentes de contacto. Los polímeros del injerto se preparan con metacrilato de metilo o estireno materiales que también son biocompatibles (Kurioka., 1998).

La ingesta de alimentos que contengan sericina suprime el estreñimiento y el desarrollo de cáncer de intestino y acelera la absorción de minerales. En ratas, el consumo de sericina eleva la absorción aparente de zinc, hierro, magnesio y calcio por

41; 41; 21 y 17 % respectivamente. La suplementación dietética de 4% de sericina suprime el estreñimiento inducido en ratas debido a su baja digestibilidad, junto con la capacidad de retención de agua (Sasaki et al., 2000).

Cuando se administra la sericina por vía oral, provoca una disminución en la dosis dependiente en el desarrollo de focos crípticos aberrantes de colon. La incidencia y el número de tumores de colon son suprimidos por el consumo de sericina. Razón por la cual se le da a la Sericina la actividad anti tumoral (Tomotake et al., 2000)

### **Aplicaciones cosméticas:**

Además de los mencionados usos Farmacéuticos y Médicos a la Sericina se ha utilizado como componente de Cosméticos. La sericina es una sustancia protectora natural de la función barrera, de acción altamente hidratante, reparadora por estimulación de células precursoras de la síntesis de colágeno y elastina. También acondiciona y mejora el tacto y suavidad de la piel (Rigono et al., 2005). Adicionalmente, se utiliza como un material de revestimiento de fibras naturales y artificiales que pueden prevenir las lesiones abrasivas de la piel, el desarrollo de erupciones cutáneas y antibacteriana de los productos tales como pañales y apósitos (Yamada., 2002).



**Figura 1.6 Hidrogel de sericina (Hidetoshi et al.,2005)**

Kato et al. (1998) encontró que la Sericina puede reprimir la peroxidación lipídica, inhibir la actividad in vitro de la tirosinasa (oxidasa polifenol). Por lo cual la

Sericina es un valioso ingrediente para cosméticos, ya que puede inhibir la actividad de la enzima tirosinasa la misma que se encarga de la biosíntesis de melanina de la piel.

La solución de la sericina hidrolizada controla la dermatitis (Yasuda et al.,1998) Las cremas que contienen 0.001-30% w/w de sericina mejoran sus propiedades de limpieza y disminuyen la irritación de piel (Sakamoto & Yamakishi .,2000). La Sericina en polvo en forma de talco hidrolizado, mica, titanio, óxido de hierro, y nylon se han utilizado para elaborar crema y delineadores de ojos (Yamada & Yuri., 1998). Los cosméticos que contiene 0,02-20% de sericina previene el agrietamiento, fragilidad de las uñas. Los shampoo para cabello que contiene 0,02 al 2% de sericina y 0,01 % de aceite de oliva, ácidos grasos o sus sales muestran la reducción del daño de la superficie del cabello por la unión de sericina al cabello. Además el shampoo que contiene sericina y ácido pelarogénico de pH inferior a 6 es útil para el cuidado y limpieza del cabello (Zozaki et al.,2001).

#### **1.4.6.5 Inhibición de Microorganismos**

La sericina se la utiliza como un biomaterial debido a sus propiedades antibacterianas. Como menciona Sarovart et al., 2003, dicha proteína tiene un efecto inhibitorio ante bacterias de tipo *Micrococcus* y capacidad antifúngica ante hongos de tipo *Candida*.

##### ***1.4.6.5.1 Antecedentes de Propionibacterium acnes***

*Propionibacterium acnes* es un bacilo anaerobio, no móvil, no esporulado Gram-positivo, que se encuentra como parte de la flora saprofita cutánea (Bojar & Holland., 2004) cuyas lipasas hidrolizan los triglicéridos hasta ácidos grasos libres y glicerol, sustancias responsables de la reacción inflamatoria que caracteriza a las lesiones del acné (Leyden et al., 1998).



**Figura 1.7 Lesiones de la piel producida por *Propionibacterium acnes* (Jappe., 2003)**

El acné es una común enfermedad de la piel, que afecta principalmente a los adolescentes y jóvenes adultos, en todo el mundo. Las secuelas cutáneas desfigurantes que a veces acompañan a esta enfermedad pueden tener un importante impacto en la salud psicológica de los jóvenes (Jappe., 2003). El tratamiento del acné implica el uso empírico de antimicrobianos. Sin embargo, en los estudios de los últimos años han documentado el aumento en la prevalencia de resistencia a los antimicrobianos, sobre todo a los macrólidos, clindamicina y la tetraciclinas (Dreno et al., 2001).

#### ***1.4.6.5.2 Antecedentes de Malassezia furfur***

*Malassezia furfur* es una levadura lipófila parte de la biota cutánea normal humana y pueden ser aisladas desde diversas áreas del cuerpo, principalmente de aquellas ricas en glándulas sebáceas (Crespo & Delgado., 2002). Se conoce fundamentalmente como el agente etiológico de la Pitiriasis versicolor (PV), aunque se le ha asociado etiopatogénicamente en mayor o menor grado con otras afecciones dermatológicas, dermatitis seborreica, pitiriasis capitis, foliculitis, papilomatosis confluyente y reticulada (síndrome de Gougerot-Carteaud), dermatitis atópica y psoriasis (Gupta et al., 2004).



**Figura 1.8** Pityriasis versicolor producida por *Malassezia furfur* (Gupta et al., 2004)

Así mismo se le ha involucrado en cuadros extracutáneos severos como neumonías, sepsis asociadas a catéter en pacientes que reciben hiperalimentación parenteral con emulsiones lipídicas o peritonitis cuando han sido sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria continua (Sugita et al.,2002).

#### **1.4.7 Biomateriales en base a la Seda**

Los avances que se han producido en la última década con la aplicación de herramientas de biología molecular y celular han desarrollado nuevos conceptos terapéuticos en biomedicina que han abierto nuevos campos como son la Medicina Regenerativa y la Ingeniería de Tejidos. El componente principal de la Medicina Regenerativa es sin duda el conocimiento detallado de la biología y manejo de las células madres. Ello abre la posibilidad de producir tejidos humanos nuevos capaces de reemplazar a tejidos lesionados, evitando el riesgo de rechazo del sistema inmune. Por otro lado en la Ingeniería de tejidos su componente principal es conocido como biomaterial en los que esas células han de crecer, diferenciarse e integrarse en los lugares adecuados del organismo receptor. Dentro de estos biomateriales se encuentra la seda que es un monofilamento (fibra) de proteína producida por las glándulas salivales del gusano de seda *Bombyx mori* (Cenis, 2009).

La aplicación de la seda como biomaterial, a través de su uso en suturas quirúrgicas, fue temprana y data del siglo XIII. Sin embargo, los nuevos conocimientos adquiridos sobre las propiedades y estructura de la seda, han abierto su uso a nuevas aplicaciones, ya sea en la industria cosmetológica o en la industria biomédica (Altman, et al., 2003).

Varios de estos tipos de biomateriales se producen en el mundo animal. El capullo del gusano de seda, tela de araña, lana de oveja y muchos moluscos son conocidos ejemplos. En cada uno de estos casos se trata de hilar una estructura que está hecha de proteína, muy resistente a los agentes atmosféricos y mecánicamente perfectos. Tan complejos que son inimitables, en muchos casos, por materiales sintéticos. En el mundo de insectos, los lepidópteros son incansables fabricantes de fibras sedosas. En el caso de la seda, los tejidos de filamentos son un ejemplo vivo de co-extrusión, una maravilla de la ingeniería genética de la naturaleza (Inouye., 1998).

## **1.5 HIPOTESIS:**

La proteína fibroína extraída del capullo del gusano de seda (*Bombyx mori*) sirve como material de implante y como material de andamiaje capaz de promover los procesos de regeneración de macrófagos peritoneales obtenidos de murinos o a partir de líneas celulares 3T3.

La proteína sericina como material protector de la piel, no produce ningún efecto tóxico sobre *Artemia salina*.

La proteína sericina inhibe el crecimiento de la bacteria *Propionibacterium acnes* causante del acné y del hongo *Malassezia furfur*, agente etiológico de la pitiriasis versicolor.

## **CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 COLABORADORES:**

Este estudio de investigación se realizó bajo el proyecto "APLICACIONES BIOMEDICAS DE LA SERICULTURA" a cargo del Dr. Ángel Guevara MSc. PhD, en convenio con el Instituto Italo Latino Americano (IILA) cuyo financiamiento es otorgado por dicha institución.

Se contó con el apoyo del Ing. Marcelo Patiño como Coordinador del Proyecto de Sericultura en Ecuador. ESPE-IASAI, de la Dra. Giovanna Allara-Salice como coordinadora de IILA-Italia, y de la Ing. Sandra Soria como Referente del Ecuador para la Red Latinoamericana de la Seda.



Además se contó con el apoyo del Laboratorio de Inmunología del Colegio de Ciencia de la Salud de la Universidad San Francisco a cargo del Dr. Manuel Baldeón M.D. Ph.D. y con el apoyo técnico de Stephanie Santander.

Así como también con la colaboración de la Dssa. Antonella Motta de la Universidad de Trento- Italia, como colaboradora científica y de la Dra. Blanca Naranjo como coordinadora del estudio.

## **2.2 ZONA DE ESTUDIO:**

Esta investigación se realizó en el Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador en el laboratorio de Biología Molecular y en el Laboratorio de Inmunología del Colegio de Ciencia de la Salud de la Universidad San Francisco de Quito.

## **2.3 PERÍODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN:**

La investigación se realizó en un período de 10 meses, a partir de Noviembre del 2009 a Septiembre del 2010.

## **2.4 DISEÑO:**

El diseño establecido fue de bloques completamente al azar, con 3 ensayos de 4 a 6 repeticiones cada uno para cada prueba a realizar, tanto para la proteína Fibroína como para la proteína sericina, utilizando varias concentraciones de cada proteína.

## **2.5 PROCEDIMIENTOS:**

### **2.5.1 Aislamiento de Proteínas**

#### **2.5.1.1 Aislamiento de la proteína sericina**

Para la extracción de la proteína sericina se siguió la técnica propuesta por Fini et al., (2004) para esto se tomaron los capullos del Gusano de seda *Bombyx mori* que fueron otorgados por el Instituto Agropecuario Superior Andino Santo-Domingo de los Tsachilas (IASA II). Estos capullos fueron hervidos en Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (1g/L) (FLUKA) 1 hora por dos veces. La solución obtenida fue transferida a una membrana de celulosa con MWCO (Spectrumlabs) y sometida a diálisis por 24 horas. Después de la diálisis la solución fue concentrada, recubriendo toda la membrana con azúcar hasta que absorba todo el líquido, luego se lavó la membrana con agua estéril y posteriormente fue esterilizada bajo luz UV y alicuotada.

#### **2.5.1.2 Aislamiento de la proteína fibroína**

Para la extracción de la proteína se utilizó la técnica propuesta por Fini et al., (2004) para lo cual se tomaron los capullos del Gusano de seda *Bombyx mori*, los mismos que fueron otorgados por el Instituto Agropecuario Superior Andino Santo-Domingo de los Tsachilas (IASA II). Estos capullos fueron hervidos en Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (1g/L) (FLUKA) 1 hora por dos veces con el fin de eliminar la sericina. La seda desgomada fue lavada con agua destilada varias veces. La solución de Fibroína fue disuelta en 9.3 M de Bromuro de litio (LiBr) (SIGMA) a 65 °C por 3 horas y luego filtrada para eliminar impurezas. Para remover el Bromuro de litio (LiBr), la solución de fibroína fue transferida a una membrana de celulosa con MWCO (Spectrumlabs) y sometida a diálisis por 24 horas. Después de la diálisis la solución fue concentrada, recubriendo toda la membrana con carbohidratos hasta que absorba todo el líquido, luego se lavó la membrana con agua estéril y posteriormente fue esterilizada bajo luz UV y alicuotada.

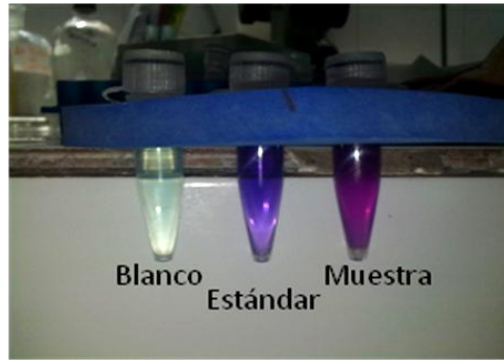


**Figura 2.1** Proceso de extracción de proteínas

### **2.5.2 Cuantificación de Proteínas Totales por el Método de Biuret**

El procedimiento de cuantificación de proteína totales fue efectuado siguiendo la metodología Reyes y Galván (2004), el cual se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ión cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) del reactivo de Biuret y los grupos amino ( $\text{NH}^+$ ) de los enlaces peptídicos en medio básico de las proteínas. La intensidad de coloración azul es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados.

Se añadió 1 mL del reactivo de Biuret Proti 2 (Wiener-Lab) a los tubos blanco, estándar y muestras de proteínas preparadas como se indica en la Tabla 2.1



**Figura 2.2 Cuantificación de Proteínas Totales por el Método de Biuret (Reacción Colorimétrica)**

Se dejó reposar a temperatura ambiente y luego se midió la absorbancia a una longitud de onda máxima de 546 nm frente al blanco. El color se estableció a los 10 minutos.

**Tabla 2.1 Protocolo para cuantificación de proteínas por Método Biuret**

TUBOS	REACTIVOS		
	H <sub>2</sub> O	Estándar (suero bovino)	R. Biuret Proti 2
<b>Blanco</b>	100 µl	0	1 mL
<b>Estándar</b>	0	100 µl	1 mL
	<b>Muestra</b>		
<b>Muestra fibroína</b>	100 µl	0	1 mL
<b>Muestra sericina</b>	100 µl	0	1 mL

Para la cuantificación total de la cantidad de proteína, una vez medida la absorbancia se usó a siguiente fórmula para determinar la concentración de las dos proteínas (sericina y fibroína) en g/mL.

$$\text{Concentración Proteica} = \frac{\text{Abs.estándar}}{\text{Abs.muestra}} \times 4.8$$

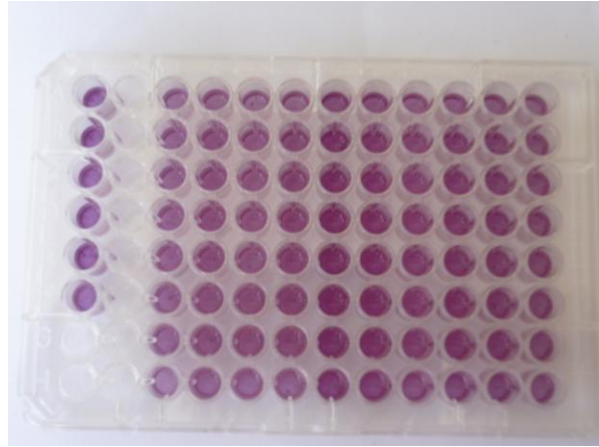
Donde: Abs.estándar = absorbancia del tubo estándar  
 Abs.muestra= absorbancia de las muestras  
 4.8 = factor en g/dL

### **2.5.3 Identificación de Proteínas por SDS-PAGE**

La identificación de las proteínas se realizó mediante geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% (Mejia.,et al.2004). Se analizaron las muestras de las dos proteínas (fibroína y sericina), la corrida se realizó a 20 mA para el gel de apilamiento y luego se aumentó a 40 mA hasta verificar que las muestras completaran el recorrido en el gel. Los geles se revelaron con azul de Coomassie. Se estableció la formulación de geles repitiendo varias veces la prueba (ANEXO 1)

### **2.5.4 Prueba de Viabilidad Celular MTT**

La prueba de viabilidad y crecimiento celular permite evaluar las respuestas del cultivo celular ante factores de crecimiento, antibióticos o compuestos contra el cáncer. Mediante la medición de la absorbancia a una longitud máxima de 570 nm en un lector de ELISA (Ledón et al.,2007). El Kit de ensayo de proliferación celular por MTT permite un contaje simple y preciso de las células metabólicamente activas, basándose en la reducción metabólica del Bromuro de [3-(4,5-dimetiltizol – 2 -yl) - 2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa convirtiéndose en un compuesto coloreado de color púrpura (formazán) permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de cristales de formazán producido (Bautista et al., 2000).



**Figura 2.3 Prueba de viabilidad MTT (reacción colorimétrica)**

#### **2.5.4.1 Cultivo de Células Endoteliales Humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC)**

Las HUVEC son células cosechadas a partir de cordones umbilicales humanos, donde forman un revestimiento monocapa en el interior de la vena umbilical. Sus características fisiológicas y morfológicas pueden ser fuertemente influenciadas por el tratamiento y condiciones de cultivo (Unterluggauer., et all.2007) Esta línea se mantiene en medio DMEM al 20% de suero fetal bovino con pases sucesivos.

Se sembraron células HUVEC (100 000 células/pocillo) (Laboratorio de Inmunología, Universidad San Francisco, Ecuador) en placas de 24 pocillos (CELL-STAR) en medio RPMI 1640 (GIBCO) y en presencia de varias concentraciones de Fibroína (0.03g/mL; 0.023 g/mL; 0.015 g/mL; 0.0075 g/mL), se incubó a 37°C y 5% Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) durante 24 horas. Para el ensayo MTT, a las células después del periodo de incubación se las añadió 100 µL del reactivo MTT (TCI-América) y se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Después de la incubación, las células fueron disueltas en una solución Stock (50% isopropanol-10%SDS) (Ching-Hu.2004), Para analizar lecturas de absorbancias a una longitud de onda máxima de 570 nm, se colocó 100 µL de las muestras en cada pocillo de una placa de 96, se tomó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro de Elisa (DYMEX MRx Revelation). Para el

control, se cultivaron células HUVEC en RPMI 1640 sin proteína durante 24 horas y procesadas para la prueba de viabilidad celular.

#### **2.5.4.2 Cultivo de la línea Celular Macrófagos RAW 264.7 murino**

Las células RAW 264,7 son una línea celular de macrófagos, obtenidas a partir de la infección a ratones Balb/c por el virus causante de la leucemia Abelson (Hsueh & Roach.,2003). Esta línea se mantiene en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% SFB y con pases sucesivos.

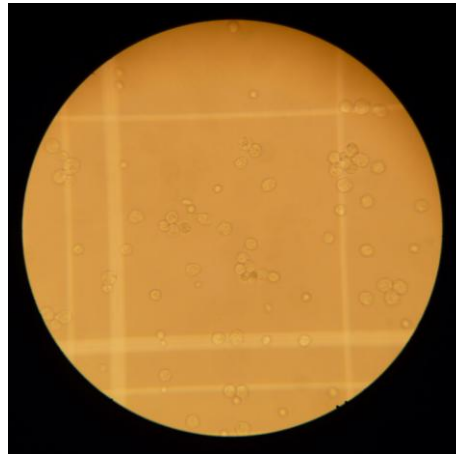
La línea celular RAW 264.7 fue sembrada (100 000 células/pocillo) (Laboratorio de Inmunología, Universidad San Francisco, Ecuador) en placas de 24 pocillos (CELL-STAR) en medio RPMI 1640 (GIBCO) y en presencia de varias concentraciones de Fibroína (0.03g/mL; 0.023 g/mL; 0.015 g/mL; 0.0075 g/mL), se incubó a 37°C y 5% Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) durante 24 horas. Para el ensayo MTT, a las células después del periodo de incubación se las añadió 100 µL del reactivo MTT (TCI-América) y se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Después de la incubación, las células fueron disueltas en una solución Stock (50% isopropanol-10%SDS) (Ching-Hu.2004), Para realizar las lecturas de absorbancias a una longitud de onda máxima de 570 nm se colocó 100 µL de las muestras en cada pocillo de una placa de 96, se realizó las lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro de Elisa (DYMEX MRx Revelation). Para el control, se cultivaron células RAW 264.7 en RPMI 1640 sin proteína durante 24 horas y procesadas para la prueba de viabilidad celular.

#### **2.5.4.3 Cultivo de Macrófagos Peritoneales de ratón**

Los macrófagos son células importantes en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa. Cuando son activados ya sea por efecto de citoquinas pro-inflamatorias o infecciones con microorganismos, liberan óxido nítrico (NO) y otros intermediarios reactivos del oxígeno, responsables de su actividad citotóxica y citostática contra microorganismos infecciosos y células tumorales (Tamez et al., 2001).

#### **2.5.4.3.1 Obtención de Macrófagos Peritoneales de ratón**

Los ratones Balb/C fueron inyectados con 3mL de una solución de tioglicolato al 3% intraperitonealmente. 72 horas después los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los macrófagos fueron recolectados por lavado peritoneal usando 7 mL de RPMI 1640 (GIBCO). Las células una vez aisladas fueron contadas en cámara Neubauer obteniéndose una concentración de  $2 \times 10^6$  macrófagos/mL (Lira., 1999)



**Figura 2.4 Macrófagos peritoneales de ratón en cámara Neubauer (lente 40X)**

#### **2.5.4.3.2 Prueba de Viabilidad de Macrófagos peritoneales**

Los macrófagos peritoneales de ratón una vez aislados fueron sembrados (100 000 células/pocillo) en placas de 24 pocillos (CELL-STAR) en medio RPMI 1640 (GIBCO) y en presencia de varias concentraciones de fibroína (0.03g/mL; 0.023 g/mL; 0.015 g/mL; 0.0075 g/mL), se incubó a 37°C y 5% Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) durante 24 horas. Para el ensayo MTT, a las células después del periodo de incubación se les añadió 100 µL del reactivo MTT (TCI-América) y se incubó a 37°C y 5% Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) durante 3 horas. Después de la incubación, las células fueron disueltas en una solución Stock (50% isopropanol-10%SDS) (Ching-Hu.2004), Para tomar lecturas de absorbancias a una longitud de onda máxima de 570 nm se colocó 100 µL de las muestras en cada pocillo de una placa de 96, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de Elisa (DYMEX/ MRx Revelation). Para el control, se cultivaron



células RAW 264.7 en RPMI 1640 sin proteína durante 24 horas y procesadas para la prueba de viabilidad celular.

### **2.5.5 Extracción en Soxhlet de Ácidos Grasos con Hexano del capullo del Gusano de Seda**

El método seleccionado para la extracción de grasas fue la extracción soxhlet, debido a su alto porcentaje de recuperación. Este método se basa en la solubilización de grasas en un equipo Soxhlet empleando hexano como disolvente. Se pesaron 20 g de capullos, previamente cortados. Se transfirió la muestra al cartucho de extracción y se colocó en la cámara de extracción del equipo Soxhlet. Se realizó extracciones a temperatura de ebullición por 3 horas, utilizando hexano como solvente. Culinado el tiempo de extracción, se concentró el hexano y se pesó el residuo que ha quedado en el recipiente (Romero & Vargas.2005).

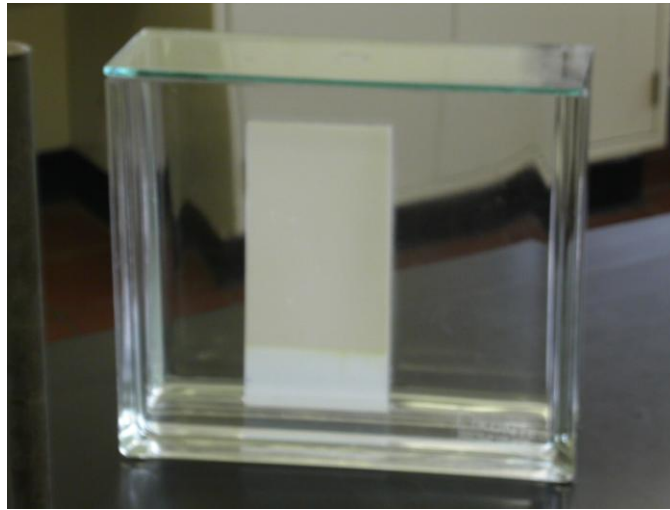


**Figura 2.5 Grasa en balón de equipo Soxhlet**

### **2.5.6 Identificación de Ácidos Grasos por Cromatografía en Capa fina**

La grasa extraída del capullo de *B.mori* fue analizada por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice de 0.25 mm de espesor (Merck). El desarrollo se realizó en cámara con atmósfera saturada, como eluyente se usó una mezcla de n-Butanol: ácido acético-glacial: agua (60:15:25). Para la aplicación de la muestra, la grasa obtenida se diluyó en Hexano y se aplicó en diferentes puntos sobre la placa cromatográfica, se

dejó correr el cromatograma por 1 hora y 40 minutos. Para el revelado de la placa se utilizó vapores de yodo. (Sciancalepore & Dorbessan., 2000)



**Figura 2.6 Cromatografía Capa Fina**

Los componentes presentes se identificaron mediante comparación de sus Rf "**Factor de Retención**" y se comparó con Rf de la bibliografía y representa la relación entre la distancia recorrida por la sustancia y la recorrida por el frente del eluyente o disolvente (Fernández, 2009) Para determinar el Rf se aplica la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto desde el origen}}{\text{Distancia desde el origen al frente del disolvente}}$$

#### **2.5.7 Evaluación de la Capacidad Antioxidante equivalente a vitamina C (CEAC) de la proteína sericina por el Método ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico)**

Para determinar la capacidad antioxidante de la proteína sericina se empleó el método espectrofotométrico ABTS<sup>•+</sup> (manual GIBEX) con algunas modificaciones en la metodología. El radical ABTS<sup>•+</sup> se formó tras la reacción de ABTS (7mg/mL) con persulfato potásico incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas.

Se utilizó una placa de 96 pocillos, se usó en la primera columna para la curva de calibración vitamina C (CEAC en un  $\mu\text{mol Vit. C/muestra}$ ) control positivo, en donde se colocó  $90\mu\text{L}$  del reactivo  $\text{ABTS}^{++}$  en cada pocillo desde el A1 hasta H1, en el pocillo A1 se añadió  $10\mu\text{L}$  de Vitamina C  $1\text{mM}$  y se realizó diluciones sucesivas hasta obtener una concentración de Vitamina C de  $8,6\mu\text{M}$ . El resto de pocillos desde la columna 3 hasta la 9, se colocó  $90\mu\text{L}$  del reactivo  $\text{ABTS}^{++}$  y se añadió  $10\mu\text{L}$  de proteína de diferentes concentraciones ( $0.03\text{g/mL}$ ;  $0.023\text{g/mL}$ ;  $0.015\text{g/mL}$ ;  $0.0075\text{g/mL}$ ;  $0.006\text{g/mL}$ ;  $0.0045\text{g/mL}$ ;  $0.003\text{g/mL}$ ) Luego de 30 minutos se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda máxima de  $630\text{nm}$  en espectrofotómetro de Elisa (DYMEX/ MRx Revelation) (González et al., 2001), como se indica en la figura 2.7



**Figura 2.7 Formato de distribución para actividad antioxidante**

Con los datos obtenidos se preparó la ecuación de CEAC por regresión lineal de la curva de calibración.

La ecuación de la regresión lineal utilizada fue:

$$y = ax + b$$

Donde:  $y = \text{Abs}_{630\text{nm}}$

X= concentración de Vitamina C

Despejando x:

$$CEAC = \frac{y - b}{a}$$

## **2.5.8 Ensayo de Toxicidad general de la proteína Sericina contra *Artemia salina***

### **2.5.8.1 Cultivo de *Artemia Salina***

A una cámara de crecimiento se la dividió en dos secciones por un tabique del mismo material con pequeños agujeros, la mitad del recipiente se oscurece con papel negro en su exterior. Se agregó, en la parte oscura del recipiente, 0,1g de huevos de *Artemia salina* por cada litro de solución salina, la solución salina se preparó disolviendo 38g de sal marina o sal en grano en 1L de agua potable comercial, el uso de agua comercial en lugar de agua destilada se debe al bajo nivel de DO en el agua destilada, este procedimiento el suministro de aire a través de bombas. A las 48 horas a temperatura ambiente e iluminación constante las larvas de *Artemia salina* son tomadas para someterlas a las diferentes concentraciones de la proteína. (Osorio & Martinez,2009)



**Figura 2.8** Cámara de incubación de *Artemia Salina*

### **2.5.8.2 Prueba de Toxicidad**

Luego de la incubación de *A. salina* se succionó con una pipeta pasteur las larvas que había eclosionado y se transfirieron a una placa de 24 pocillos, entre 10 a 15 larvas en aproximadamente 1 mL. Se prepararon diluciones de la proteína Sericina (0.03g/mL; 0.023 g/mL; 0.015 g/mL; 0.0075 g/mL) en agua de mar, luego se las distribuyó en cada pocillo que contenía *A. salina* en un volumen de 1 mL, tomando como control positivo Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ). La placa fue incubada a temperatura ambiente e iluminación constante por 24 horas. (González., et al., 2003)



**Figura 2.9** *Artemia salina* vista en microscopio invertido, lente 40X

### 2.5.9 Homogenización de Crema cosmética formulada con sericina al 10%

Se peso 5 g de crema base hipoalergénica (Botica Alemana) y se le añadió el 10% de Sericina, se le mantuvo en agitación constante por 3 horas para homogenizarla.



Figura 2.10 Homogenización de Crema formulada con sericina al 10%

### 2.5.10 Evaluación de la Actividad antibacteriana de la proteína sericina frente al *Propionibacterium acnes*

#### 2.5.10.1 Preparación del inóculo

Para obtener el inóculo de *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 (MediBac) en la fase de crecimiento adecuada se sembró la cepa bacteriana en placas TSA (Bacto™) y se incubó a 37°C durante 72 horas en anaerobiosis, debido a las características de crecimiento de *Propionibacterium acnes*. Se sacó alícuotas de esta población, trasladando la cepa bacteriana a tubos TSB (Bacto™), que incubados a 37°C durante 72 horas en anaerobiosis proporcionaron una suspensión aproximada de  $10^6$  UFC adecuada para el ensayo (Guillen et al.,2002).

#### 2.5.10.2 Determinación de poder inhibitorio de la proteína sericina pura

Mediante un hisopo estéril se sembró en crecimiento confluyente la suspensión de aproximadamente  $10^5$  UFC/ml de *Propionibacterium acnes* sobre placas de Muller-

Hinton (Acumedia). Seguidamente se colocó en el centro de las placas un disco de antibiograma tipo Whatman de 5 mm de diámetro embebido en la proteína sericina a diferentes diluciones (0.03g/mL; 0.023g/mL; 0.015 g/mL; 0.0075g/mL), se utilizó como control positivo Penicilina benzatínica (GEANAMERICA). La siembra se efectuó por duplicado. Una vez colocado el disco, se incubaron las placas a 37°C durante 72 horas en condiciones anaerobias (Guillen et al., 2002).

### **2.5.10.3 Determinación de poder inhibitorio de la crema formulada con sericina 10%**

Mediante un hisopo estéril se sembró en crecimiento confluyente la suspensión de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL de *Propionibacterium acnes* sobre placas de Muller-Hinton (Acumedia). Seguidamente se colocó en el centro de las placas un disco de antibiograma tipo Whatman de 5 mm de diámetro embebido en crema formulada con sericina al 10%, se utilizó como control positivo Penicilina benzatínica (GEANAMERICA). La siembra se efectuó por duplicado. Una vez colocado el disco, se incubaron las placas a 37°C durante 72 horas en condiciones anaerobias (Guillen et al.,2002).

### **2.5.11 Evaluación de la Actividad antifúngica de la proteína Sericina frente a *Malassezia furfur***

#### **2.5.11.1 Preparación del inóculo**

Para obtener el inóculo de *Malassezia furfur* ATCC 14521 (MediBac) en la fase de crecimiento adecuada se sembró el hongo en placas Sabouraud dextrosa (Bacto™) suplementado con el 2% de aceite de oliva, se incubó a 30°C durante 5 días (Zerpa et al.,2005)

#### **2.5.11.2 Determinación de Susceptibilidad de *Malassezia furfur* a Sericina pura, usando RPMI 1640, bajo el método de Microdilución en caldo (BMD)**

Para el Método de Microdilución en caldo (BMD), se preparó el medio RPMI 1640 (GIBCO) como diluyente complementado con 20 g de glucosa, 1 mL de aceite de

oliva y 0.4 mL de DMSO (GIBCO). El inóculo de *M. furfur* fue disuelto en 5 mL de DMSO y agitado en vortex durante 20 minutos, obteniéndose una suspensión de 1.120.000 UFC/mL (Velegaki et al.,2004) La proteína Sericina fue disuelta en medio RPMI 1640 complementado, obteniéndose varias concentraciones (0.03g/mL; 0.023g/mL; 0.016g/mL; 0.008g/mL; 0.0033g/mL),

Para aplicar el test de Susceptibilidad, se utilizó una placa de 96 pocillos, en la que se colocó 100  $\mu$ L de medio complementado, 50  $\mu$ L del inóculo disuelto y 50  $\mu$ L de proteína en diferentes concentraciones, el ensayo se realizó por triplicado con 8 repeticiones. Tomando como control al inóculo sembrado solo con medio RPMI 1640 complementado. La placa fue incubada a 30°C por 48 horas (Nakamura et al.,2000)



**Figura 2.11 Formato de distribución para test de Susceptibilidad**

Una vez incubada la placa se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda máxima de 530 nm en un espectrofotómetro de Elisa (DYMEX/ MRx Revelation) (Velegaki et al.,2004). Los datos obtenidos de absorbancia, permitieron determinar el IC<sub>50</sub> (Media de la Máxima Concentración Inhibitoria), de acuerdo a la ecuación que presente.



### **2.5.11.3 Determinación de poder inhibitorio de la crema formulada con Sericina 10%**

Mediante un hisopo estéril se sembró en crecimiento confluyente la suspensión de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL de *Malassezia furfur* sobre placas de Muller-Hinton 2% de aceite de oliva (Acumedia). Seguidamente se colocó en el centro de las placas un disco de antibiograma tipo Whatman de 5 mm de diámetro embebido en crema formulada con sericina al 10%, se utilizó como control positivo Penicilina benzatínica (GEANAMERICA). La siembra se efectuó por triplicado. Una vez colocado el disco, se incubaron las placas a 30°C durante 72 horas (Guillen et al.,2002) (Nakamura et al.,2000).

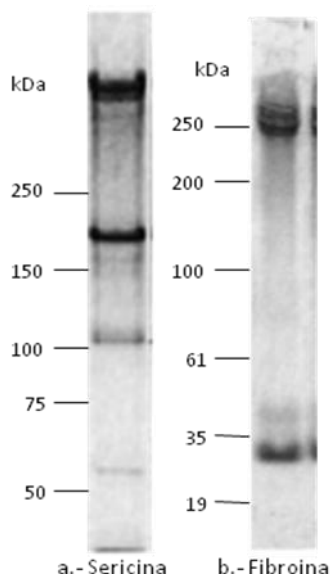
## 2.6 ANÁLISIS DE DATOS:

Los datos obtenidos fueron evaluados bajo un diseño factorial como un Modelo Lineal de un Factor Univariante, mediante el programa estadístico SPSS 15 para Windows. Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  desviación estándar y se utilizó la prueba de Tuckey, con un valor de  $p < 0.05$  de probabilidad, considerándolo estadísticamente significativo.

## CAPITULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Identificación de Proteínas por SDS-PAGE

Las soluciones de fibroína y sericina después de ser sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, la solución de Sericina presentó alrededor de tres bandas de las tres clases de sericina de  $>250$ ,  $180$  y  $100$  kDa, la solución de fibroína presentó dos bandas de  $325$  y  $>35$  kDa como se muestra en la Figura 3.1



**Figura 3.1 SDS-PAGE. Fragmentos de Proteína: a. Tres bandas de sericina y dos bandas de fibroína (Hidetoshi et al.,2005 & Kozo et al.,2003)**

### 3.2 Soportes de crecimiento celular con la proteína fibroína:

Los datos obtenidos de la prueba de viabilidad MTT, fueron analizados en el programa estadístico SPSS versión 1.6, se reportaron como número de células por pocillo, para efectuar el análisis de varianza, según los tratamientos establecidos, con 3 ensayos de 4 a 6 repeticiones cada uno. Estos corresponden a un diseño factorial como un Modelo Lineal de un Factor Univariante.

#### 3.2.1 Células Endoteliales Humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC)

Los datos obtenidos en cuando al comportamiento de la línea celular HUVEC ante la presencia de la proteína fibroína en el medio de cultivo RPMI 1640, después del análisis estadístico indican el límite máximo y mínimo de células por pocillo, aplicando las diferentes concentraciones de fibroína Tabla 3.1

**Tabla 3.1 ANOVA de un factor para análisis de número de células HUVEC por pocillo**

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Medio RPMI 1640 sin fibroína	6	98613,00	1417,306	578,613	97125,63	100100,37	96107	100000
Medio RPMI 1640 + 0.03g/mL de fibroína	6	62035,67	1180,589	481,974	60796,71	63274,62	60805	64295
Medio RPMI 1640 + 0.023g/mL de fibroína	6	62013,50	1382,198	564,280	60562,97	63464,03	59597	63356
Medio RPMI 1640 + 0.015g/mL de fibroína	6	60536,83	1306,913	533,545	59165,31	61908,35	58389	62013
Medio RPMI 1640 + 0.0075g/mL de fibroína	6	57650,83	1134,906	463,323	56459,82	58841,84	56510	59597
Total	30	68169,97	15612,668	2850,470	62340,10	73999,83	56510	100000

La tabla 3.2 indica que los resultados analizados fueron estadísticamente significativos, con un  $p < 0.05$  de acuerdo con la prueba de Tukey, analizando comparaciones múltiples de medias.

**Tabla 3.2 Prueba Tukey: Medias para los grupos en subconjuntos homogéneos, con tamaño muestral de media armónica = 6,000.**

Concentración de Fibroína en g/mL	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
Medio RPMI 1640 + 0.0075g/mL de fibroína	6	57650		
Medio RPMI 1640 + 0.015g/mL de fibroína	6		60536	
Medio RPMI 1640 + 0.023g/mL de fibroína	6		62013	
Medio RPMI 1640 + 0.03g/mL de fibroína	6		62035	
Medio RPMI 1640 sin fibroína	6			98613
Sig.		1,000	0,289	1,000

La Figura 3.2 indica que las de células HUVEC se mantuvieron en el medio RPMI 1640 sin fibroína (control) con un aproximado de 98613 células/pocillo, en cuanto a los medios que contenían fibroína en diferentes concentraciones, las células HUVEC disminuyeron en número desde 62035 a 57650 células/pocillo, debido a que estas se agruparon cambiando la morfología de su crecimiento normal en medio de cultivo, como se puede observar en la Figura 3.3

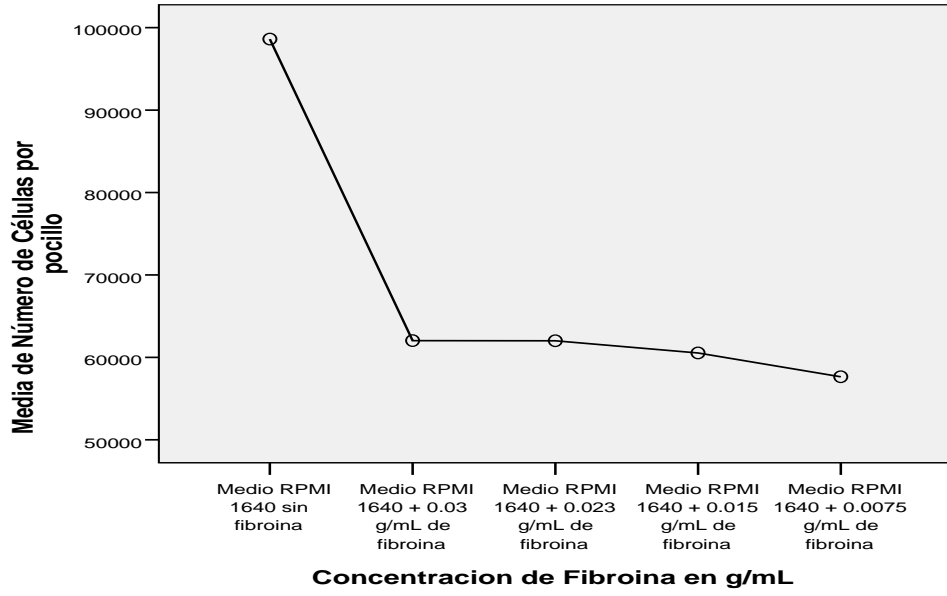
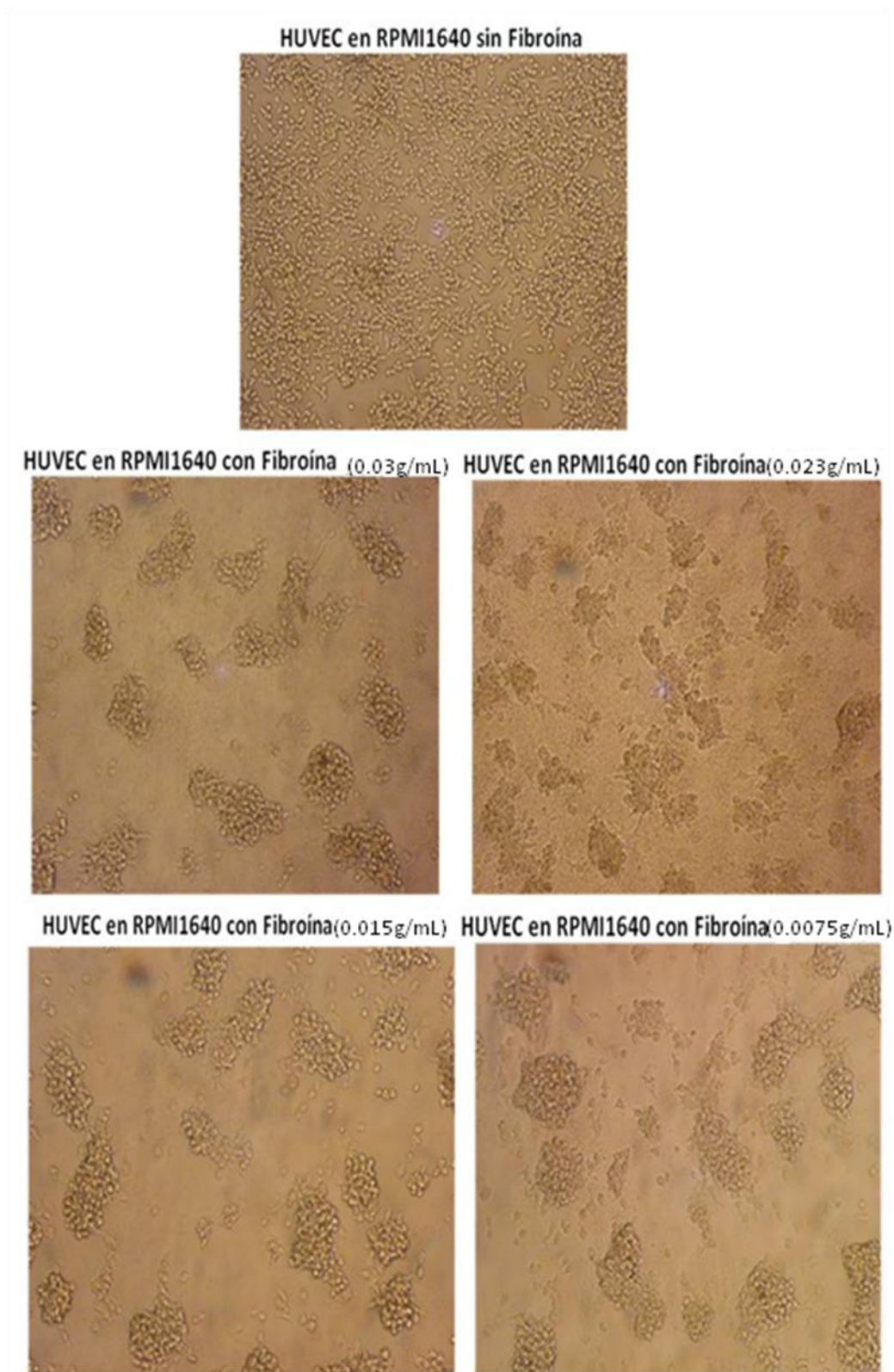


Figura 3.2 Crecimiento Línea Celular HUVEC con Fibroína



**Figura 3.3 Efecto de la proteína fibroína en cultivo de la línea celular HUVEC (microscopio invertido-lente 40X)**

### 3.2.2 Línea Celular Macrófagos RAW 264.7 murino

Los datos obtenidos sobre el comportamiento de la línea celular Macrófagos RAW 264.7 ante la presencia de la proteína fibroína a diferentes concentraciones en el medio de cultivo RPMI 1640, fueron analizados estadísticamente, indicando el límite máximo y mínimo de células por pocillo (medias), para cada tratamiento. Tabla 3.3

**Tabla 3.3 ANOVA de un factor para análisis de número de células Macrófagos RAW 264.7 por pocillo**

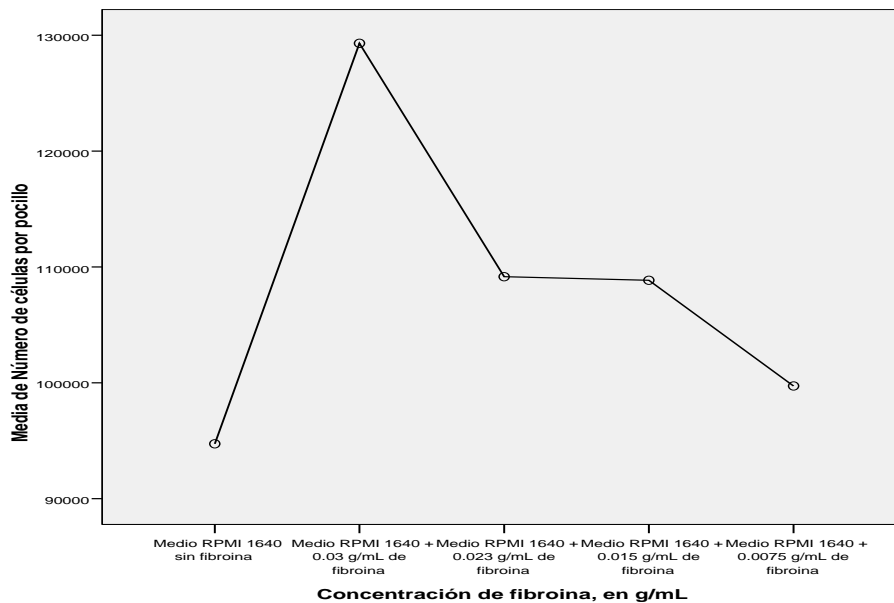
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Medio RPMI 1640 sin fibroína	6	94731,33	3546,864	1448,001	91009,13	98453,54	89876	100000
Medio RPMI 1640 + 0.03 g/mL de fibroína	6	129304,50	5708,624	2330,536	123313,67	135295,33	123554	140083
Medio RPMI 1640 + 0.023 g/mL de fibroína	6	109160,00	7077,706	2889,462	101732,40	116587,60	99587	117562
Medio RPMI 1640 + 0.015 g/mL de fibroína	6	108850,00	6561,572	2678,751	101964,05	115735,95	100413	117562
Medio RPMI 1640 + 0.0075 g/mL de fibroína	6	99724,50	2073,121	846,348	97548,89	101900,11	96901	102066
Total	30	108354,07	13014,925	2376,189	103494,21	113213,92	89876	140083

Los resultados analizados fueron estadísticamente significativos, con un  $p < 0.05$  de acuerdo con la prueba de Tukey, este programa analizó comparaciones múltiples de medias, de acuerdo al número de células que crecieron por pocillo. Tabla 3.4

**Tabla 3.4 Prueba Tukey para RAW 264.7: Medias para los grupos en subconjuntos homogéneos, con tamaño muestral de media armónica = 6,0**

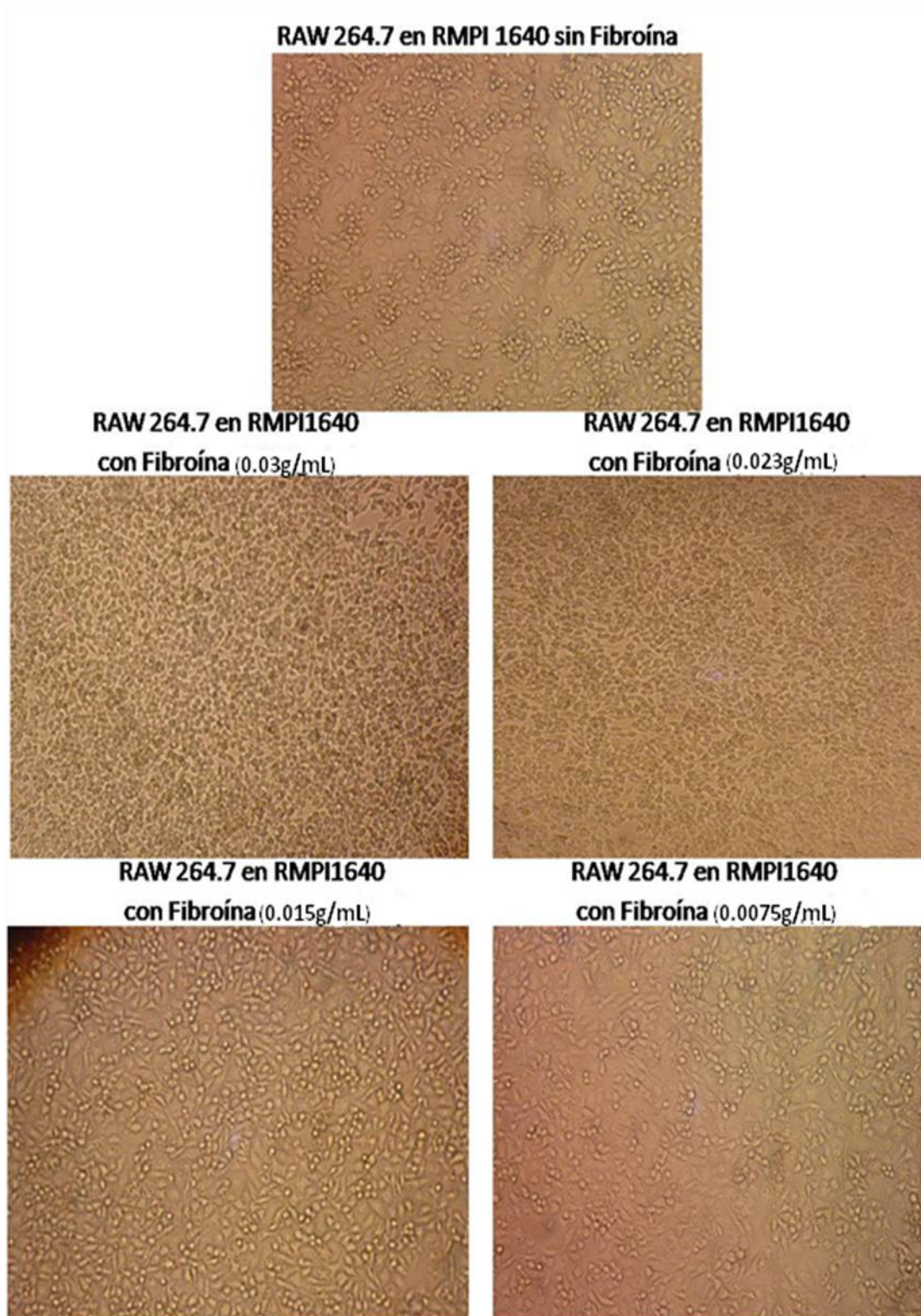
Concentración de fibroína, en g/mL	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
Medio RPMI 1640 sin fibroína	6	94731		
Medio RPMI 1640 + 0.0075 g/mL de fibroína	6	99724		
Medio RPMI 1640 + 0.015 g/mL de fibroína	6		108850	
Medio RPMI 1640 + 0.023 g/mL de fibroína	6		109160	
Medio RPMI 1640 + 0.03 g/mL de fibroína	6			129304
Sig.		0,499	1,000	1,000

La Figura 3.4 indica que las de células RAW 264.7 aumentaron su crecimiento en los medios de cultivo RPMI 1640 que contenían fibroína en diferentes concentraciones, desde 99724 a 129304 células/pocillo, tomando como referencia al crecimiento de células en medio RPMI 1640 que no contenía fibroína (control) cuyas células se mantuvieron en un promedio de 94731 células/pocillo. Dicho comportamiento se observó bajo microscopio invertido- lente de 40X Figura 3.5



**Figura 3.4 Crecimiento Línea Celular RAW 164.7 con diferentes concentraciones de fibroína**





**Figura 3.5 Efecto de la proteína Fibroína en cultivo de la línea celular RAW 264.7(microscopio invertido-lente 40X)**

### 3.2.3 Macrófagos Peritoneales de ratón

De acuerdo al análisis estadístico, los datos obtenidos sobre el comportamiento de Macrófagos Peritoneales de ratón ante la presencia de la proteína fibroína en el medio de cultivo RPMI 1640, a diferentes concentraciones, indica el límite máximo y mínimo de células por pocillo. Tabla 3.5

**Tabla 3.5 ANOVA de un factor para análisis de número de células Macrófagos Peritoneales de ratón por pocillo**

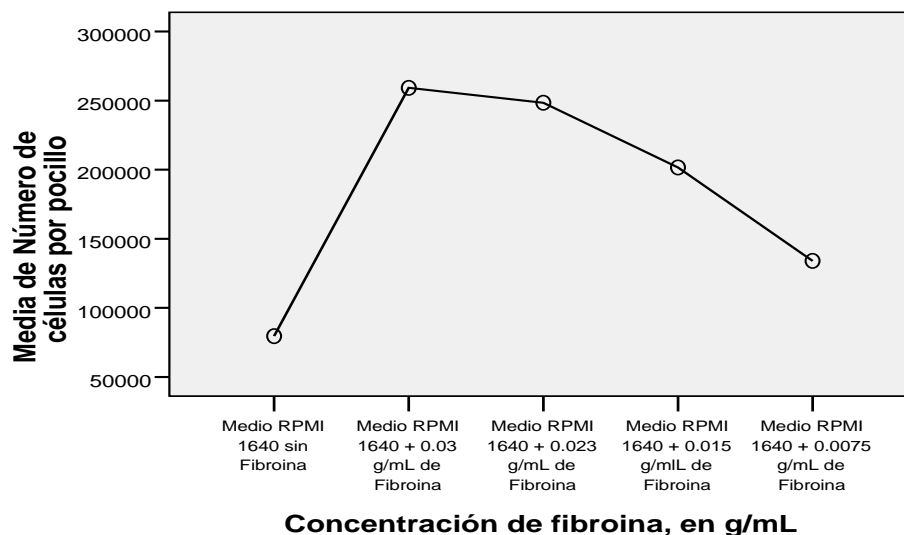
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Medio RPMI 1640 sin Fibroína	4	79541,25	13659,173	6829,587	57806,46	101276,04	71957	100000
Medio RPMI 1640 + 0.03 g/mL de Fibroína	4	259215,25	1322,500	661,250	257110,86	261319,64	258554	261199
Medio RPMI 1640 + 0.023 g/mL de Fibroína	4	248412,50	1554,053	777,027	245939,65	250885,35	246737	249735
Medio RPMI 1640 + 0.015 g/mL de Fibroína	4	201587,00	1746,049	873,024	198808,65	204365,35	199294	203527
Medio RPMI 1640 + 0.0075 g/mL de Fibroína	4	133994,75	18945,102	9472,551	103848,86	164140,64	114815	150970
Total	20	184550,15	70994,108	15874,765	151323,88	217776,42	71957	261199

De acuerdo a la prueba de Tukey, se realizó el análisis comparativo de medias, los resultados analizados fueron estadísticamente significativos, con un  $p < 0.05$ , de acuerdo al número de células que crecieron por pocillo. Tabla 3.6

**Tabla 3.6 Prueba Tukey para Macrófagos Peritoneales: Medias para los grupos en subconjuntos homogéneos, con tamaño muestral de media armónica = 4,0**

Concentración de fibroína, en g/ml	N	Subconjunto para alfa = .05			
		2	3	4	1
Medio RPMI 1640 sin Fibroína	4	79541			
Medio RPMI 1640 + 0.0075 g/mL de Fibroína	4		133994		
Medio RPMI 1640 + 0.015 g/mL de Fibroína	4			201587	
Medio RPMI 1640 + 0.023 g/mL de Fibroína	4				248412
Medio RPMI 1640 + 0.03 g/mL de Fibroína	4				259215
Sig.		1,000	1,000	1,000	0,605

La Figura 3.6 indica que los Macrófagos Peritoneales duplicaron su crecimiento en los medios de cultivo RPMI 1640 que contenían fibroína a la más alta concentración disminuyen su crecimiento conforme disminuye la concentración de Fibroína, dicho crecimiento va desde 259215 a 133994 células/pocillo desde la mayor a menor concentración. Los valores obtenidos fueron comparados con el crecimiento de células en medio RPMI 1640 que no contenía fibroína (control) cuyas células se mantuvieron en un promedio de 79541 células/pocillo. Dicho comportamiento se observó bajo microscopio invertido- lente de 40X Figura 3.7

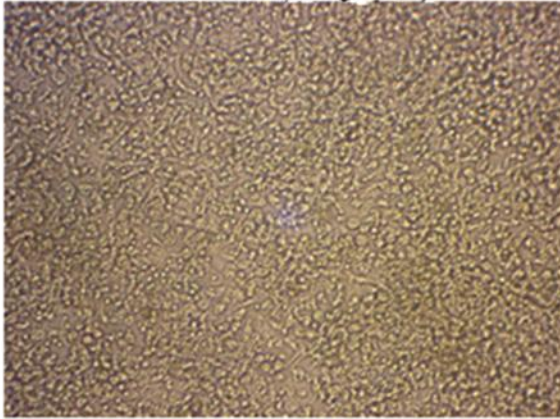


**Figura 3.6 Crecimiento de Macrófagos Peritoneales con diferentes concentraciones de fibroína**

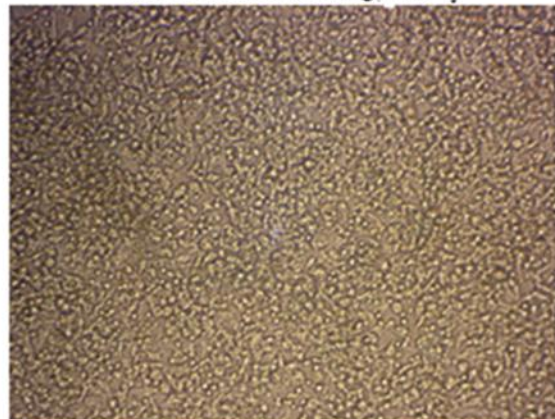
**Macrófagos Peritoneales en RPMI1640 sin Fibroína**



**Macrófagos Peritoneales en RPMI1640  
con Fibroína (0.03g/mL)**



**Macrófagos Peritoneales en RPMI1640  
con Fibroína (0.023g/mL)**



**Macrófagos Peritoneales en RPMI1640  
con Fibroína (0.015g/mL)**



**Macrófagos Peritoneales en RPMI1640  
con Fibroína (0.0075g/mL)**



**Figura 3.7 Efecto de la proteína Fibroína en cultivo de Macrófagos Peritoneales de ratón (microscopio invertido-lente 40X)**

### 3.3 Ácidos Grasos del capullo de Gusano de Seda *B. mori*

Cuando la grasa extraída del capullo de *B. mori* fue aplicada al cromatoplaaca de sílica gel, se observaron una mancha de color amarillo, con un Rf de 0.75, como se muestra en la figura 3.8, el mismo que fue identificado como lípidos polares los cuales pueden ser fosfolípidos y esfingolípidos.

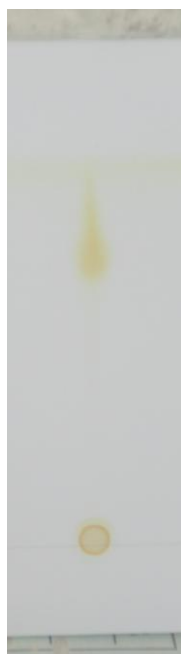
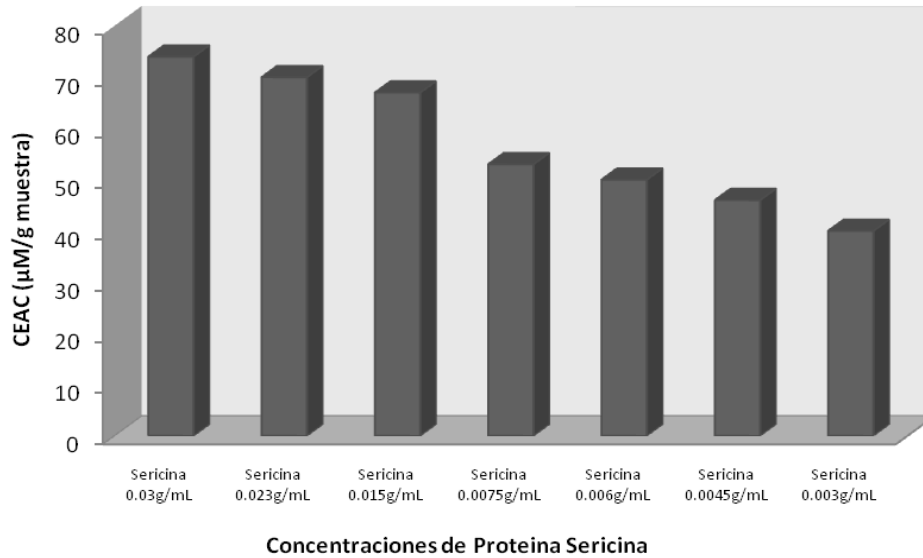


Figura 3.8 Cromatoplaaca de sílica gel, observado bajo vapores de yodo

### 3.4 Capacidad Antioxidante de la proteína sericina

Previamente se realizó una curva de calibración con Vitamina C como compuesto control. Los resultados de calibración se muestran en el ANEXO B. Dichos valores de calibración permitieron determinar la Capacidad Antioxidante equivalente a vitamina C (CEAC) de la proteína sericina.

La actividad antioxidante de la proteína sericina en diferentes diluciones analizadas oscila entre los valores de 40 y 74  $\mu\text{M/g}$  muestra CEAC. Figura 3.9



**Figura 3.9 CEAC para la proteína sericina**

### 3.5 Toxicidad general de la proteína sericina

En las diferentes diluciones de la proteína sericina (0.03g/mL; 0.023g/mL; 0.015 g/mL; 0.0075g/mL), que se probaron no se observó respuesta toxica ante *Artemia salina*, a pesar de que se usó a la proteína en su más alta concentración. Como se observa Figura 3.10. *Artemia salina* se mantiene viva a las 24 horas e incluso hasta los 5 días de incubación con sericina comparando con el control positivo Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en la que todas la *Artemias salinas* murieron.

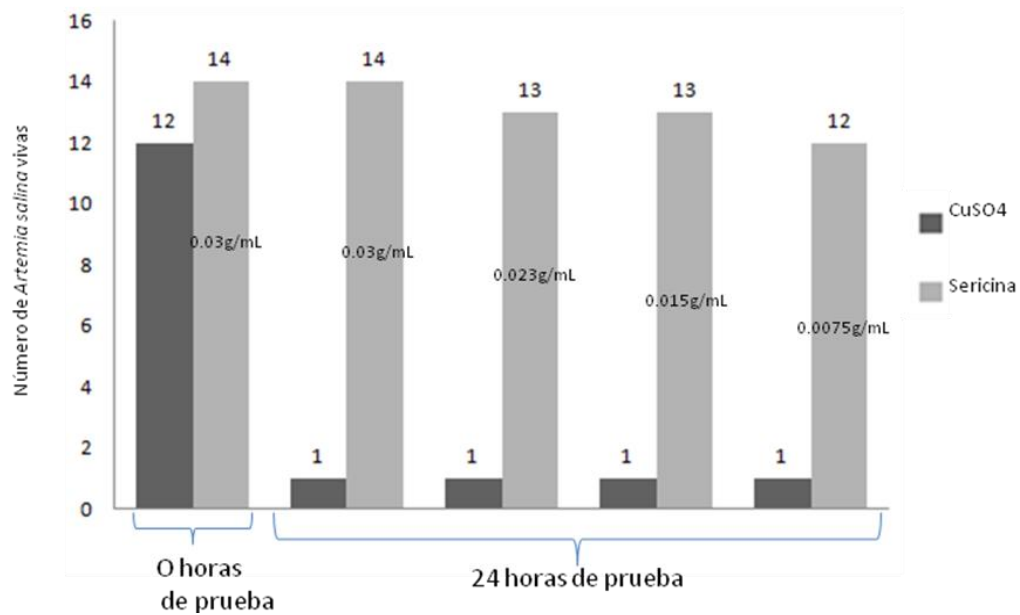


Figura 3.10 Actividad Tóxica en *Artemia salina* de la proteína sericina a las 0 y 24 horas de prueba.

### 3.6 Actividad antibacteriana de la proteína pura sericina frente a *Propionibacterium acnes*

Se realizó tres ensayos sobre actividad antibacteriana por duplicado, obteniendo que la sericina a una concentración de 0.03g/mL inhibe el crecimiento de *Propionibacterium acnes*, produciendo un halo de inhibición de 17 mm de diámetro con  $SD \pm 0.252$  Figura 3.11. El resto de diluciones de la proteína sericina no se observaron halos de inhibición.

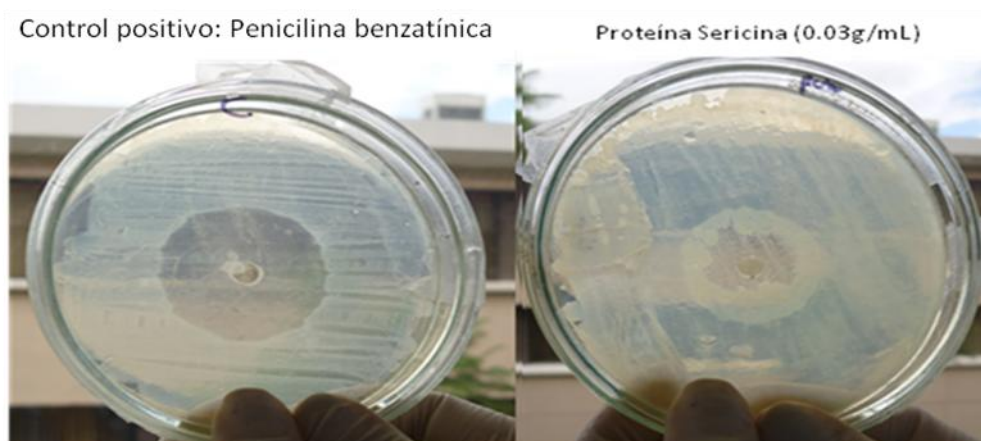


Figura 3.11 Halo de inhibición del crecimiento de *Propionibacterium acnes* en medio Muller-Hinton

### 3.7 Actividad antibacteriana de la crema formulada con sericina 10% frente al *Propionibacterium acnes*

Tras realizar tres ensayos con dos repeticiones cada uno se puede afirmar que la crema formulada con sericina 10%, inhibe el crecimiento de *Propionibacterium acnes*, produciendo un halo de inhibición de 17 mm de diámetro en medio Muller-Hinton, con  $SD \pm 0.351$ , el mismo que no se diferencia claramente en comparación con el control, como se puede observar en la Figura 3.12.

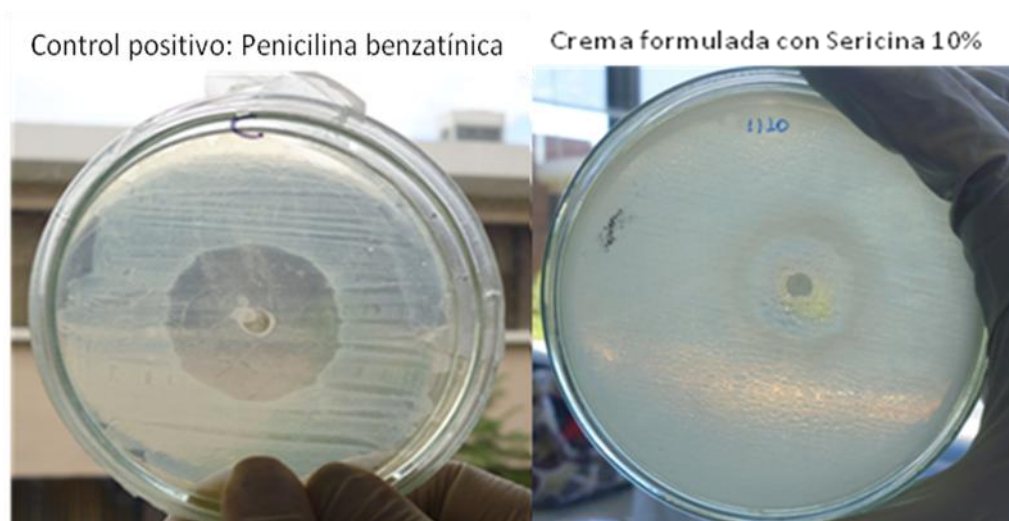


Figura 3.12 Halo de inhibición del crecimiento de *Propionibacterium acnes* en medio Muller-Hinton

### 3.8 Actividad antifúngica de la proteína Sericina pura frente a *Malassezia furfur*

Los datos obtenidos de absorbancia permitieron determinar que la Proteína Sericina tiene actividad frente a *M. furfur*, la misma que al ser graficada origina una ecuación polinómica de cuarto orden, que permitió obtener el valor del  $IC_{50}$  de 0.0157 g/mL (ANEXO C).



### 3.9 Actividad antibacteriana de la crema formulada con Sericina 10% frente al *Malassezia furfur*

Tras realizar tres ensayos con dos repeticiones cada uno se puede afirmar que la crema formulada con sericina 10%, inhibe el crecimiento de *M. furfur*, produciendo un halo de inhibición de 12 mm de diámetro en medio Muller-Hinton 2% aceite de oliva, con  $SD \pm 0.5$ , el mismo que no se diferencia claramente en comparación con el control, como se puede observar en la Figura 3.13

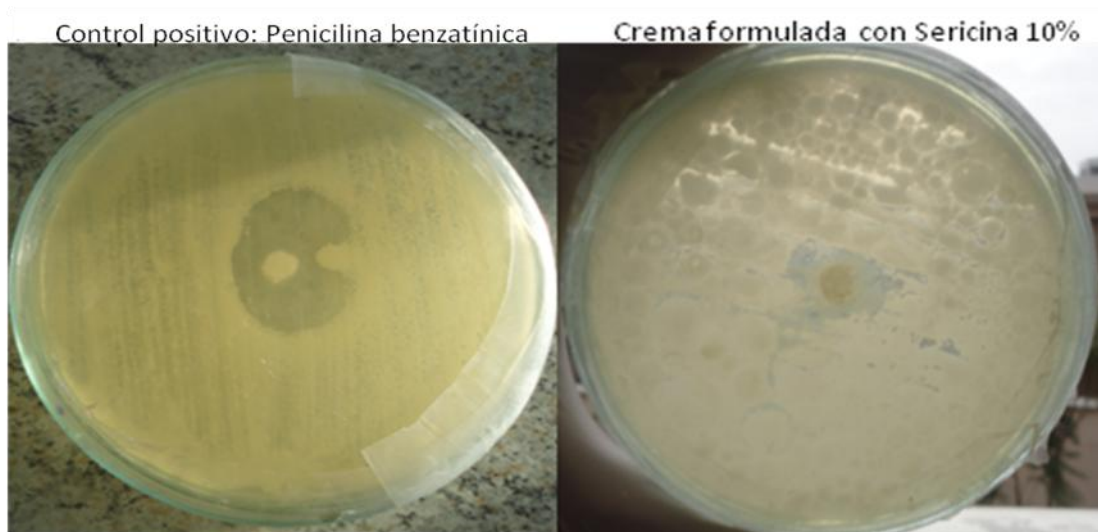


Figura 3.13 Halo de inhibición del crecimiento de *Malassezia furfur* en medio Muller-Hinton 2% aceite de oliva

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Las fibras de los capullos de gusanos de seda *Bombyx mori*, se compone de dos tipos de proteínas auto-ensambladas, fibroína y sericina. La fibroína es un componente importante de la fibra de seda que actúa como núcleo, mientras que la sericina es un componente menor que sirve como una proteína de revestimiento (Altman et al., 2003). El primero es usado como biomaterial, aplicándolo como estructuras porosas tridimensionales (matrices de andamiaje) en la ingeniería de tejidos (Yang & Bochu., 2009), mientras que la sericina tiene amplias aplicaciones en productos farmacéuticos y cosméticos, tales como, cicatrización de heridas

bioadhesivos hidratantes, cremas antiarrugas y antienvjecimiento (Padamwar & Pawar., 2004)

Evaluando las diferentes aplicaciones que se da a las dos proteínas formadoras del capullo del gusano de seda *Bombyx mori*, los resultados demostraron que la proteína fibroína al ser utilizada como soporte de crecimiento celular para la línea celular HUVEC, no es evidente el aumento en la proliferación de células, como se indica en la Figura 3.1, pero cabe mencionar que se da un cambio en la morfología de las células en medio de cultivo adicionado con fibroína, como se puede evidenciar en la Figura 3.2, en donde se observó la formación de masa celular aisladas. Unterluggauer y colaboradores (2007), mencionan que dicho cambio se debe a que las células HUVEC son fuertemente influenciadas por el tratamiento y condiciones de cultivo, lo cual originando un cambio en sus características fisiológicas y morfológicas.

Según Amaru y colaboradores (2005) señalan que las células HUVEC adoptan diferentes formas cuando están sueltas y en solución, como se da en caso del cultivo in vitro de células endoteliales en medio urémico, el mismo que altera su funcionalismo, originando un crecimiento más rápido y una morfología alterada (Serradell et al., 2002)

Se centra la atención sobre el comportamiento en la proliferación de células de la línea celular Macrófagos RAW 264.7 y Macrófagos Peritoneales de ratón, ya que en los dos casos los macrófagos cultivados en medio RPMI 1640 suplementado con diferentes concentraciones de fibroína, se dio un aumento significativo en el crecimiento de los mismos, como se puede evidenciar en la Figuras 3.3 y Figura 3.5.

En referencia a la línea celular Macrófagos RAW 264.7, los resultados demuestran un efecto mitogénico en la adición de Fibroína al medio de cultivo RPMI 1640, dándose un incremento del número de células. Nieves & Moreno 2006., mencionan que los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 reaccionan ante la

presencia de proteínas o ácidos grasos alterando su ciclo celular, como se da en el caso de la adición exógena de LTB<sub>4</sub> o LTD<sub>4</sub> al medio de cultivo en ausencia de suero fetal bovino (FBS), este altera el ciclo celular de los macrófagos, originando un incremento en el número de células y en la incorporación de timidina de los macrófagos RAW 264.7, dicho efecto proliferativo del LTB<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub> está mediado por la activación de la vía MAPK (Mitogéno activador de la proteína kinasa), estos resultados concuerdan con los de Paruchuri y Sjölander (2003) donde el LTD<sub>4</sub> aumentaba el número de células y la incorporación de timidina en células epiteliales intestinales.

Por otro lado, los resultados obtenidos sobre Macrófagos Peritoneales de ratón indican un aumento en la proliferación celular de los mismo, en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con diferentes concentraciones de fibroína, dicho efecto resulta como una señal de activación de macrófagos, como menciona Reyes y colaboradores (2001), que al añadir principios activos de plantas (extractos metanólicos de *P. major*) proteínas, lipopolisacáridos (LPS) entre otros, al medio de cultivo, estos activan la producción de óxido nítrico y TNF- $\alpha$  de los macrófagos. Como es el caso de las biomoléculas activas de los extractos de *Plantago major* tiene la capacidad de actuar *in vivo* en forma directa sobre los macrófagos e inducir su activación, o bien, interactúan como señales de preactivación de macrófagos, como la del interferón-gamma.

Con referencia a la proteína sericina, los resultados obtenidos sobre Capacidad Antioxidante equivalente a vitamina C (CEAC) mediante el Método ABTS <sup>++</sup>, indica que la actividad antioxidante de la Proteína Sericina es dosis-dependiente, es decir conforme aumenta su concentración aumenta su actividad como se puede observar en la figura 3.9, dichos resultados concuerdan con los mencionados por Jin-Hong Wu y colaboradores (2006) donde mencionan que la actividad antioxidante de sericina por el ensayo de DPPH es dosis-dependiente. Razón por la que puede ser utilizado como complemento alimenticio o en la industria farmacéutica y en el campo de la medicina.

Por otro lado, los resultados obtenidos sobre el ensayo de actividad tóxica de la proteína sericina frente a *Artemia salina*, indican que la proteína no es tóxica ante esta, como se puede evidenciar la figura 3.10. Aramwit y colaboradores (2010), confirman los resultados obtenidos, cabe mencionar que la prueba de toxicidad aplicada por ellos, se realizó en fibroblastos de ratón, aplicando una concentración de 40 µg/mL de proteína, en un periodo de 24 horas de incubación. Además Sangcakul & Aramwit (2007) mencionan que cremas base adiconas con el 8% de sericina no causan efecto tóxico en ratas. Se ha demostrado que la sericina no tiene un efecto tóxico en ningún modelo animal, debido a las características que presenta la proteína de ser susceptible a la acción de las enzimas proteolíticas. (Li et al.,2008).

De acuerdo a las pruebas de actividad antibacteriana frente a *Propionibacterium acnes*, tanto de la proteína sericina pura y como de la crema formulada con sericina 10%, los resultados indican según el criterio de difusión en disco, que la proteína Sericina a una concentración de 0.03g/mL tiene actividad intermedia ante dicho microorganismo como proteína pura y como complemento de la crema dicha actividad se confirma produciendo un halo de inhibición de 17 mm de diámetro. Dichos resultado concuerdan con los obtenidos por Savorat et al (2003) en donde la proteína sericina pura tiene actividad antibacteriana sobre bacterias tipo *Micrococcus*, adicionalmente Guldemet et al (2010) prepararon películas de sericina la misma que comprobó que tiene actividad frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis* mediante pruebas de difusión en disco, así como también Joshi et al (2009) preparó fibras sintéticas adicionadas con sericina obteniendo como resultado actividad antibacteriana del 51% frente a *P. vulgaris* y 38% de inhibición ante *S. aureus*.

En la Actividad antifúngica de la proteína sericina frente a *Malassezia furfur*, demostraron que la proteína sericina en estado puro inhibe el crecimiento del hongo con una IC<sub>50</sub> de 0.0157 g/mL y, como constituyente al 10% en crema de acuerdo al método de difusión en disco tiene actividad intermedia ante dicho microorganismo produciendo un halo de inhibición de 12 mm, concordando con los resultados

obtenidos sobre actividad antifúngica con Savorat et al (2003) el mismo que menciona dicha actividad, así como también Hong y colaboradores (2010), mencionan que la proteína sericina a altas concentraciones produce efecto fungicida sobre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*, bajo el método de Microdilución en Caldo.

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**

El medio RPMI adicionado con diferentes concentraciones de fibroína, altera la morfología de las células HUVEC, provocando un crecimiento celular en masa aislado.

La proteína fibroína como parte de un soporte de crecimiento celular es efectiva tanto para la línea Celular Macrófagos RAW264.7 y para Macrófagos Peritoneales de ratón.

La proteína fibroína como parte del medio de cultivo RPMI 1640 tiene un efecto mitogénico sobre macrófagos RAW 264.7.

El medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con fibroína estimula la proliferación de los Macrófagos peritoneales de ratón.

El capullo del gusano de seda *B. mori* está constituido por lípidos polares los cuales pueden ser fosfolípidos y esfingolípidos

La proteína sericina tiene actividad antioxidante de acuerdo al método ABTS, la misma que aumenta conforma aumenta la concentración de la proteína.

La proteína sericina como proteína pura y a diferentes concentraciones, no produce ningún efecto tóxico sobre *Artemia salina*.

La Proteína sericina a una concentración de 0.03g/mL presenta actividad intermedia ante *Propionibacterium acnes*. Así mismo, se puede afirmar que la crema formulada con Sericina 10%, inhibe el crecimiento de *Propionibacterium acnes*, produciendo un halo de inhibición de 17 mm de diámetro en medio Muller-Hinton.

La proteína sericina en estado puro, presenta actividad antifúngica frente *Malassezia furfur*, presentando un IC<sub>50</sub> de 0.0157 g/mL, y como constituyente de crema al 10%, presenta una actividad intermedia ante el hongo, produciendo un halo de inhibición de 12 mm de diámetro en medio Muller-Hinton 2% aceite de oliva.

La crema cosmética formulada con sericina al 10% no es un buen vehículo de acción para que la proteína actúe ante los microorganismos responsables de enfermedades cutáneas.

## **CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES**

No adicionar antibiótico a los medios de cultivo formulados con fibroína, debido a que el antibiótico inhibe la acción de la proteína ante las células.

Ampliar la investigación sobre los soportes de crecimiento celular formulados con fibroína, para determinar la vía y las señales de activación de los macrófagos ante la presencia de la proteína en el medio de cultivo.

Utilizar otro medio cosmético, como gel, para que la proteína sericina actúe de mejor manera, ante la presencia de microorganismos responsables de enfermedades cutáneas.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Altman G, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL.(2003)., *Silk-based biomaterials. Biomaterials.*, USA.

Amaru R., Silvestre J., Torres G., Miguez H., Peñaloza R., Araoz R., Cuevas H., (2005)., Primera experiencia en aislamiento de células endoteliales humanas en Bolivia., *Cuadernos del hospital de clínicas.*, Vol.50/Nº 2

Arai M., Zhu L., & Hirabayashi K., (1995)., Relationship between adhesive properties and structure of sericin in cocoon filament., *J Sericult Sci Jap.*, 64(5) 420-426.

Aramwit Pornanong., Kanokpanont Sorada., Nakpheng Titpawan., Srichana Teerapol., (2010)., The Effect of Sericin from Various Extraction Methods on Cell Viability and Collagen Production., *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 2200-2211

Bautista Carlos., Acosta Elizabeth., Toledo Icela.,(2000)., Evaluación del Ensayo de MTT para determinar la proliferación *in vitro* de linfocitos bovinos frescos y congelados., *Centro Nacional Disciplinarias en Parasitología Veterinaria.*, México.

Bini E., Knight D., Kaplan D., (2004)., Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly., *J. Mol. Biol.*, 35, 27-40.

Bojar R. & Holland K., (2004)., Acne and Propionibacterium acnes., *Clin Dermatol.*, 22:375-9.

Casadio Adriana & Pescio Francisco., (2004)., Introducción a la Sevicultura., Red Latinoamericana de la Seda., 2:13.

Chen, X., Li, W.J., Zhong, W., Lu, Y.H., Yu, T.Y., (1997)., pH sensitivity and ion sensitivity of hydrogels based on complex-forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network. J. Appl. Polym. Sci., 65(11):2257-2262.

Ching-Hu Chung, Wen-Bin Wu, and Tur-Fu Huang.,(2004)., Aggretin, a snake venom-derived endothelial integrin  $\alpha_2\beta_1$  agonist, induces angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor.,The American Society of Hematology., Vol.103;2105:2113

Crespo Erchiga V & Delgado Florencio V.,(2002)., Malassezia species in skin diseases. Curr Opinión Infect Dis.,15:133-142.

Dreno B., Reynaud D., Moyse H., Habert., Richet H., (2001)., Erytromycin-resistance of cutaneous bacterial flora in acne., Eur J Dermatol., 11:549-53

Fernández Calvo María Isabel.,(2009)., Cromatografía en capa fina de los componentes del *Cannabis.*, Sector de Enseñanza de CSI-F., p.113

Fini M., Motta A., Torricelli P., Giavaresi G.,Aldini N., Tschon M., Giardino R., Migliaresi C., (2006). The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silo fibroin hydrogel.,J. Mol. Biol., 3527-3536.

Freddi, G., Romano, M., Rosaria, M., Tsukada, M., (1995)., Silk fibroin/cellulose blend films: preparation, structure and physical properties., J. Appl. Polym. Sci., 56(12):1537-1545



Gili Joseph.,(2009).,Secreem to Nature Manual.,The Global Institute for Bioexploration (GIBEX)., version 1.2

Giusiano G.M.,(2004)., *Malassezia: Estado del conocimiento y perspectivas de estudio*.Chaco-Argentina.

González A., Presa M., Lurçà M.,(2003)., Ensayo de toxicidad a *Artemia salina*: Puesta a punto y aplicación a micotoxinas., Publicación FABICIB., Vol 7:117-122

González M., Muñoz P y Valls V., (2001).,Actividad antioxidante de la cerveza: Contribución de la fracción fenólica., Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos., Universidad de Valencia., p 1-57

Gübelin W., Martínez M., Molina T., Zapata S., Valenzuela M.,(2006). Antimicrobial susceptibility of strains of *Propionibacterium acnes* isolated from inflammatory acné. Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM., Vol. 48, No. 1

Guillen C., Guinea J., Ricart M., Borda M., Plaza M.,(2002).,Evaluación de la actividad antibacteriana de la ciclopiroxolamina frente al *Propionibacterium acnes*., Rev Intern Dermatol Dermocosm.,5:221-224

Guldemet Basal., Duygu Altıok., Oguz Bayraktar., (2010)., Antibacterial properties of silk fibroin/chitosan blend films loaded with plant extract., Fibers and Polymers., Volume 11, Number 1, 21-27

Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson T., (2004)., Skin diseases associated with Malassezia species. *Am Acad Dermatol*; 51:785-798.

Hench LL., (1998)\_Biomaterials: a forecast for the future.,*Biomaterials.* 9:1419–23.

Hidetoshi T., Ken-ichi N.,Chiyuki T., (2005).,Preparation of Elastic Silk Sericin Hydrogel.,*Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 69(4).,845-847

Hsueh Robert & Roach Tamara.,(2003)., Passage Procedure for RAW 264.7 ., *Cells AfCS Procedure Protocol.*,PP00000159., Version 1

Iida Hiroshi., (1999)., Softening method of raw silk by enzyme, *JpnKokai Tokyo Koho Jap.*, 11061547, Heisei,P 4; Chem Abstr, 130(16) 210758.

Inouye, K., Kurokawa, M., Nishikawa, S., Tsukada, M. (1998)., Use of Bombyx mori silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells., *Biochem Biophys Meth.*, 37:159–64.

Jae Y., Kwang, Y., Yong W., Kwang G., Joo, H., Hae, Y., et al. (2003). Preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 32,36–42.

Jappe U., Pahogical mechanics of ace with special emphasis on *Propionibacterium acnes* and related therapy., *Acta Derm Venereol.*, 83:241-8

Jin H., Chen J., Karageorgiou V., Altman GH., Kaplan DL.,(2004)., Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats., *Biomaterials.*,25(6):1039.

Jin-Hong Wu, Zhang Wang , & Shi-Ying Xu.,(2006)., Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater., Elsevier Ltd., 10.042

Joshia M., S Wazed Ali & Purwar R.,(2009)., Ecofriendly antimicrobial finishing of textiles using bioactive agents based on natural products., Indian Journal of Fibre & Textile Research., Vol. 34., pp. 295-304

Kato N., Sato S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N., & Nomura, M. (1998)., Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. Bioscience Biotechnology Biochemistr., 62(1), 145–147.

Kearns V., MacIntosh A., Crawford A., Hatton P.,(2008)., Silk-based Biomaterials for Tissue Engineerin., Topics in Tissue Engineering.. Eds. N Ashammakhi, R Reis, & F Chiellini., Vol. 4

Kim U., Park J., Kim H J., Wada M., Kaplan D.,(2005), Three dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. Biomaterials., 26, 2775-2785.

Kozo T.,Hiroshi N., Yumiko I., Yoko., Hiromi Y.,(2003)., *Bombyx mori* Fibroin Enhanced the Proliferation of Cultured Human Skin Fibroblast., Journal of Insect Biotechnology and Sericology., 72,65-69

Kurioka A.,(1998)., Application of silk proteins to new biomaterial., Silk Sci Res Inst Tokyo, Japon., Zairyo Gijutsu, 16(5) 195-201.

Ledón Naranjo N.,García Chaviano M., Portillo Vaquer A., Ruíz Castro E.,(2007)., Validación del ensayo de proliferación celular colorimétrico por mtt para la determinación de potencia del rhu-met-g-csf., Centro de Inmunología Molecular., La Habana., Vol. XIX, N° 1

Leyden J., McGinley K., Vowels B., (1998)., *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. Dermatology., 196(1): 55-8.

Li YG., Ji DF., Lin TB., Zhong S., Hu GY., Chen S.,(2008)., Protective effect of sericin peptide against alcohol-induced gastric injury in mice., Chin. Med. J.,121:2083–2087.

Lira R., Sundar S., Makharia A., Kenney R., Gam A., et all., (1999)., Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-Azar is due to the emergence of antimony resistant strains of *Leishmania donovani.*, Infect Dis., 180; 564-567

Martínez Pedro & Osorio Javier.,(2009)., Análisis del procedimiento para la determinación de la dl50., Universidad del Quindío., Colombia., Vol 4, N° 12

Masahiro, S., Hideyuki, Y., & Norihisa, K. (2000). Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. Nutrition Research, 20, 1505–1511.

Mejía P., Díaz E., Salas E., Tenorio V.,(2004)., Identificación de las proteínas de 35 a 38 kDa específicas de *Brucellas ovis.*,42(2);277-285

Michihiko, S., Hiroshi, M., Yoshitaka, S.,Hajime, O., Chikatada, S., Baltazar, A.,Yoshiaki, N., Keiko, K., Hideyuki, K.,Hideki, S., Javaregowda, N., Goldsmith, M., Qingyou, X.,

Kimiko, Y., Kazuei, M.(2009). KAIKObase: An integrated silkworm genome database and data mining tool. *BMC Genomics*. 1471-2164-10-486

Min B., Lee G., Kim S., Nam Y., Lee T., Park W.,(2004)., Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro., *Biomaterials*.,25(7/8):1289.

Nakamura Y.,Kano R., Murai T., Watanabe S., Hasegawa A.,(2000)., Susceptibility Testing of *Malassezia* Species Using the Urea Broth Microdilution Method., *Antimicrobial agents and chemotherapy*., Vol. 44, No. 8., 2185–2186

Nieves D., Moreno JJ., (2006)., Effect of Arachidonic and Eicosapentaenoic Acid Metabolism on RAW 264.7 Macrophage Proliferation., *Journal of Cellular Physiology*., 208:428-434

Padamwar M. & Pawar A.,(2004).,Silk sericin and its Applications: a review., *Journal of Scientific & Industrial Research*.,Vol.63.,323-329

Paruchuri S. & Sjölander A., (2003). Leukotriene D4 mediates survival and proliferation via separate but parallel pathways in the human intestinal epithelial cell line Int 407., *Biol Chem*., 278(46):45577-85.

Reyes S., Tamez G., Rodríguez C., Tamez P., Richard J., Weber., Gómez R., Calderón C., (2001)., Activación de macrófagos y linfocitos in vitro por extractos metanólicos de hojas de plantago mayor., *Ciencia UANL*., vol. IV, número 003., 304-313

Romero Carlos & Vargas Maritza., (2005)., Extracción del aceite de la semilla de neem (*Azadirachta indica*)., Maracaibo-Venezuela., Ciencia v.13 n.4

Sakamoto K & Yamakishi K., (2000)., Sericin containing cleaning composition., *Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap 2000073090 A2*., Japon., 2000073090., P 4; Chem Abstr,132 196164.

Sasaki M, Yamada H & Kato N., (2000)., Composition of silk protein,sericin elevates intestinal absorption of Zn, Fe, Mg, and Ca in rats., *Nutr Res.*, 20(10) 1505-1511.

Sciancalepore V. & Dorbessan W,(2000)., Influencia de los acidos grasos de monogliceridos y trigliceridos en la resistencia de la autoxidacion en el aceite de girasol. Nota 2., *Agronomía Tropical*., 32(1-6): 7-11

Serradell M., Díaz-Ricart M, Zurbano M, López-Pedret J., Ordinas A., Escolar G., Cases A., (2002)., El medio urémico altera las propiedades hemostáticas de células endoteliales humanas en cultivo y aumenta la producción de factor von Willebrand., *Nefrología*. Vol. XXII. Número 1.

Sobajo C., Behzad F. Xue-Feng Yuan., Bayat A.,(2008)., Silk: A Potential Medium for Tissue Engineering., *Open Science Company*., LLC.,Vol 8; 1937-5719

Sprange K.,(1975)., The Bombyx mori, silk proteins: characterization of large polypeptides., *Biochemistry*., 14(5).,925-931

Sugita T., Takashima M., Shinoda T., Suto H., Unno T., Tsuboi R., et al.(2002)., New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis., *Clin Microbiol.*,40:1363-7.

Tamez R., Rodríguez C., Tamez P., Weber R., Gómez R. y Calderón C., (2001)., Activación de macrófagos y linfocitos in vitro por extractos metanólicos de hojas de *Plantago major*., Ciencia UANL. Vol. IV, N° 3.

Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J.C., Couble, P.,(2000). Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector., Nat Biotechnol., 18:81-84.

Tie-lian L., Jing-cheng M., Wei-hua S., Yu-feng X., Quan H., Yun-bo S., Ji-cheng.,(2010)., Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing., Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)., 11(1):10-16

Tomotake H., Kato N & Sasaki M.,(2000)., Nutritional function of resistant protein (Fac Appl Biol Sci, Hiroshima Univ, Japan)., Rinsho Eiyō, 97(7) 789-796.

Tsuboi, Y., Ikejiri, T., Shiga, S., Yamada, K., Itaya, A.,(2001)., Light can transform the secondary structure of silk protein., Appl. Phys. A., 73, 637-640.

Unger, R.E., Wolf, M., Peters, K., Motta, A., Migliaresi, C., Kirkpatrick, C.J., (2004)., Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering., Biomaterials, 25(6):1069-1075.

Unterluggauer, H., Hütter, E., Voglauer, R., Grillari, J., Vöth, M., Bereiter-Hahn, J., Jansen-Dürr, P., Endrath, M., (2007)., Identification of cultivation-independent markers of human endothelial cell senescence invitro., Biogerontology, 8 (4), pp. 383-397. doi: 10.1007/s10522-007-9082-x

Velegraki A., Alexopoulos E., Stavroula Kritikou., Gaitanis G.,(2004)., Use of Fatty Acid RPMI 1640 Media for Testing Susceptibilities of Eight *Malassezia* Species to the New Triazole Posaconazole and to Six Established Antifungal Agents by a Modified NCCLS M27-A2 Microdilution Method and Etest., *Journal of clinical microbiology.* Vol. 42, No. 8., p. 3589–3593

Voegeli R.,Meier J. & Blust R., (1993)., Sericin Silk protein: unique structure and properties., *Cosmet toilet.*, 108., 101-108.

Vollrath, F.(1999)., Biology of spider silk., *International Journal of Biological Macromolecules.*, 24(2-3):81-88.

Wei T., Li M., & Xie, R., (2005). Preparation and structure of porous silk sericin materials. *Macromolecular Materials and Engineering.*, 290, 188–194.

Wong, Y., Kim, H.J., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., (2006)., Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials., *Biomaterials.*,27(36):6064-82.

Yamada H & Yuri O., (1998)., Sericin coated powders for cosmetics., *Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap 10226626 A2.*, Heisei, P 9; Chem Abstr, 129(16) 207009.

Yang Cao & Bochu Wang.,(2009).,Biodegradation of Silk Biomaterials., *International Journal of Molecular Sciences.*, ISSN 1422-0067., 1514-1524

Yasuda N, Yamada H & Nomura M., (1998)., Sericin from silk as dermatitis inhibitor., *Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap10245345 A2.*,Chem Abst, 129(16) 207197.



Yasushi N.,(1994)., Liquid crystal device using sericin as alignment film, *Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap.*,\_06018892.,Heisei, P 3; Chem Abstr, 121(12) 145577.

Zerpa R., Rojas R., Quisphe M.,(2005)., *Malssezia furfur*: una nueva visión.,*Redalyc.*, Vol. 66., S28

Zhang Y., (2002)., Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnol. Adv.* 20, 91-100

Zhu L J, Arai M & Hirabayashi K., (1996)., Sol-gel transition of sericin, (Fac Technol, Tokyo Univ Agirc, Japan)., *Nippon Sanshigaku Zasshi.*, 65(4) 270-274.

Zhu L., Yao J. & Youlu L.,(1998)., Structural transformation of sericina dissolved from cocoon layer in hot water.,*Zhejiang Nongye Daxue Xuebao.*, 24(3)., 268-272.

Zozaki K ., Yamada H., & Yamasaki K., (2001)., Nail cosmetics containing sericina., *PCT Int Appl WO 2001015660 A1*, P 15; Chem Abstr, 134(14) 197888.

Arch Personal Care Products L.P.(2009). Solu Silk.\_extraído el 6 de enero,2009, de: [http://www.archchemicals.com/Fed/PC/Docs/Solu\\_Silk\\_SPAN.pdf2009](http://www.archchemicals.com/Fed/PC/Docs/Solu_Silk_SPAN.pdf2009).

Cenis, José.(2009).La Seda Como Biomaterial En Medicina Regenerativa. Extraído el 26 de enero, 2009, de [http://www.um.es/eubacteria/seda\\_medicina.pdf](http://www.um.es/eubacteria/seda_medicina.pdf)

Kato S., Sato H. Yamada N. Fuwa, Nombra M., Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture; Japón; (2005); extraído el 15 de abril, 2009 de: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6VSD-4J7JD6H-G&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=0ab57481a416b4a2081dd6931dcccdf0](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VSD-4J7JD6H-G&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=0ab57481a416b4a2081dd6931dcccdf0)

Reyes Fernández Emilio y Galván Cejudo Aurora.,(2004)., Métodos para la cuantificación de proteínas., Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales., Cordoba., extraído el 07 de Julio del 2010 de; <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>

Sarovart, S., Sudatis, B., Meesilpa, P., Grady, B., Magaraphan R. (2003). The Use Of Sericin As An Antioxidant And Antimicrobial For Polluted Air Treatment. Oklahoma-Estados Unidos;; extraído el 15 de abril, 2009 de; [http://www.ipme.ru/e-journals/RAMS/no\\_3503/sarovart/sarovart.pdf](http://www.ipme.ru/e-journals/RAMS/no_3503/sarovart/sarovart.pdf).

Zhaorigetsu Siqin., (2003), Study on anti-tumor effect of sericin; Higashi-hiroshima; Japón; extraído el 3 de marzo, 2009 de <http://ir.lib.hiroshima-u.ac.jp/metadb/up/kiyo/AA11768091/KJ00000705034.pdf>.