

***EXTRACCIÓN DE LA SERICINA PROVENIENTE DEL PROCESO DE DESENGOMADO DE
LA SEDA, PARA SU APROVECHAMIENTO COMO INGREDIENTE PARA EL
DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES***

Gabriela Andrea Miguel

Universidad Pontificia Bolivariana

Escuela de Ingeniería

Especialización en Biotecnología

Medellín

2014

***EXTRACCIÓN DE LA SERICINA PROVENIENTE DEL PROCESO DE DESENGOMADO DE
LA SEDA, PARA SU APROVECHAMIENTO COMO INGREDIENTE PARA EL
DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES***

Gabriela Andrea Miguel

Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Biotecnología

Asesor

Catalina Álvarez López

Ingeniera Agroindustrial, Doctora en Ingeniería

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

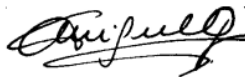
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

MEDELLÍN

2014

“Declaro que esta tesis (o trabajo de grado) no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad”. Art. 82 Régimen Discente de Formación Avanzada, Universidad Pontificia Bolivariana.

Gabriela Andrea Miguel

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. Miguel', with a stylized flourish at the end.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. LA SERICULTURA	2
1.1. Breve historia de la sericultura	2
1.2. La sericultura en Colombia	3
1.3. Red Latinoamericana de la seda	4
2. LA SEDA	5
2.1. Características	5
2.2. Procesamiento	6
3. LA SERICINA	8
3.1. Características	8
3.1.1. Composición proteica y aminoacídica	8
3.1.2. Estructura secundaria proteica	8
3.1.3. Solubilidad	8
3.1.4. Peso molecular	9
3.2. Métodos de obtención	9
3.3. Aplicaciones	11
4. LA SERICINA EN EL ÁREA DE ALIMENTOS	12
4.1. Alimentos funcionales	12
4.1.1. La sericina como ingrediente para alimentos funcionales	15
4.2. Antioxidantes	16
4.2.1. Mecanismos de las sustancias antioxidantes	18
4.2.2. Métodos para medir la actividad antioxidante	18
4.2.3. Acción antioxidante de la sericina	20

4.2.3.1.	Inhibición de la peroxidación lipídica por acción de la sericina	20
4.2.3.2.	Inhibición de la enzima tirosinasa por acción de la sericina	21
4.2.3.3.	Neutralización de especies reactivas del oxígeno (ROS) por acción de sericina	25
4.2.4.	Actividad antioxidante de la sericina en sistemas biológicos <i>in vitro</i> .	26
4.2.4.1.	Efecto en cáncer de colon y estrés oxidativo	26
4.2.4.2.	Efecto de la sericina en el estrés oxidativo en tejidos con daño	27
4.3.	Biopéptidos a partir de sericina	30
4.3.1.	Los biopéptidos	30
4.3.2.	Actividad antioxidante de biopéptidos de sericina	31
4.4.	Otras aplicaciones de la sericina en el área de alimentos	33
4.4.1.	Efectos en la constipación	34
4.4.2.	Función prebiótica	34
4.4.3.	Aumento en la absorción de minerales en el intestino	35
4.4.4.	La sericina como conservante de alimentos	36
5.	LA SERICINA Y LA REGULACIÓN ALIMENTARIA	37
5.1.	Regulación de alimentos funcionales según Codex	38
5.1.1.	Regulación a nivel mundial	38
5.1.2.	Regulación en Colombia	39
5.2.	Regulación de antioxidantes en alimentos	40
	CONCLUSIONES	42
	RECOMENDACIONES	44
	BIBLIOGRAFÍA	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Dispersión mundial de la seda desde China, y posteriormente desde Europa.....	2
Figura 2.	Corte transversal de un filamento de seda.....	5
Figura 3.	Desarrollo de alimentos funcionales en el mundo entre 2001-2009.....	13
Figura 4.	Actividad antioxidante de la sericina mediante la inhibición de la peroxidación de lípidos medida con el método TBARS. A) Absorbancia según el tiempo de incubación. B) Absorbancia según concentraciones crecientes de sericina o BSA (control).....	21
Figura 5.	Capullos correspondientes a tres cepas distintas de <i>Bombix Mori</i>	22
Figura 6.	Efecto de la sericina en la actividad tirosinasa de distintas cepas de <i>Bombix Mori</i> extraída mediante tres tratamientos: álcalis, ácidos, urea y calor.....	23
Figura 7.	Capullos utilizados de 20 cepas distintas (izquierda). Alimentación natural o artificial, indicada como FL.....	24
Figura 8.	Medida de la actividad anti-tirosinasa en cepas alimentadas con hojas de morera (alimentación natural) y otras con alimentación artificial.....	25
Figura 9.	Medición de la actividad de neutralización de especies reactivas de oxígenos (ROS).....	26
Figura 10.	Figura 10. A) Porcentaje de ratones que desarrollaron tumores luego de administrarles dosis de 2,5 y 5 mg/kg de sericina y ser expuestos a agentes promotores de cáncer de piel. B) Multiplicidad tumoral al cabo de las 20 semanas de observación.....	27
Figura 11.	Efecto de la sericina en el porcentaje de células viables de fibroblastos dérmicos felinos luego de exponerlas a 0,5mM de peróxido de hidrógeno durante 24 horas, con excepción del grupo control.....	29
Figura 12.	Efecto de la sericina extraída de <i>Antheraea mylitta</i> en líneas celulares de fibroblastos sometidas a daño oxidativo mediante la exposición a 0,5 mM de peróxido de hidrógeno durante 24 horas.....	30
Figura 13.	A) Actividad quelante del ión hierro según distintas concentraciones de SH, se utiliza EDTA como control positivo. B) Actividad anti-tirosinasa frente a diferentes concentraciones SH con proteasa P.....	33
Figura 14.	Cantidad de grupos amino libres frente a la incubación con enzimas como medida indirecta de la digestión de la sericina por parte de estas enzimas. A) Pepsina, B) Pancreatinina.....	34
Figura 15.	Efecto antibacteriano de la sericina A: sericina Dok Bua, B: Nang Noi, C: Jul.....	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Composición del filamento de seda.....	6
Tabla 2.	Ingredientes aprobados por el sistema de regulación japonés, FOSHU, para la elaboración de alimentos funcionales.....	14
Tabla 3.	Consideraciones que debe garantizar la selección del alimento.....	16
Tabla 4.	Tipos de antioxidantes y sus mecanismos.....	17
Tabla 5.	Efecto de la sericina en la actividad tirosinasa.....	23
Tabla 6.	Efecto del consumo de sericina en la absorción de minerales.....	26
Tabla 7.	Efecto positivo de la sericina en la protección contra el cáncer de colon y el potencial antioxidante en las células del colon.....	31
Tabla 8.	Biopéptidos y su efecto positivo en el organismo.....	33
Tabla 9.	Actividad quelante del ión hierro según las distintas proteasas utilizadas	36
Tabla 10.	Antioxidantes para uso en alimentos aprobados por la FAO.....	41

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó una revisión del estado del arte de las propiedades de la proteína de sericina para su posible incorporación como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales. Se detallaron las formas de extracción existentes a partir de las aguas del desgomado, hallando que la extracción en agua caliente es la técnica más efectiva para su posterior aprovechamiento en el área de alimentos. Se investigó sobre sus efectos positivos en el organismo humano, haciendo hincapié en su actividad antioxidante. Se encontró que la sericina posee actividad anti-tirosinasa, inhibe la peroxidación lipídica y neutraliza los radicales libres dañinos para el cuerpo humano. También se evidenció que es posible obtener una mayor actividad antioxidante de los biopéptidos obtenidos a partir de ella. Adicionalmente, se investigaron otras aplicaciones como su función prebiótica, su efecto en la absorción de minerales en el tracto digestivo y sus efectos positivos para el tratamiento de la constipación y como conservante en alimentos. Se abordaron aspectos importantes sobre los alimentos funcionales y sus regulaciones a nivel nacional y mundial, y se encontró que esta proteína no se incluye en la lista de alimentos funcionales avalados por el sistema de regulación japonés FOSHU, debido a la falta de respaldo de estudios clínicos.

PALABRAS CLAVE

Sericina; seda; desgomado; antioxidante; alimentos funcionales.

INTRODUCCIÓN

La seda es producida en más de 20 países a nivel mundial. Su proceso de producción, conocido como sericultura, consiste en la cría del gusano de seda (*Bómbyx mori*) y la posterior obtención del hilo. China es el principal productor, con más 70% de las 100 mil toneladas anuales producidas mundialmente, seguida por Brasil, Japón, India, Tailandia y Vietnam, y con una producción menor, Italia y Francia, en Europa. En Colombia, La Corporación para el Desarrollo de la Sericultura del Cauca, CORSEDA, es la principal productora de seda, con un total de 20,5 toneladas anuales de capullo de seda (Vieites & Basso, 2010).

Las etapas principales para la obtención de hilos de seda son: la clasificación de los capullos, el devanado, la torsión y empalme, el desgomado, procesos tintóreos y finalmente el acabado. En la etapa del desgomado se elimina la sericina, una proteína globular que recubre los filamentos de seda. Actualmente este subproducto, que abarca entre un 20-30% de los filamentos, se desecha por la mayoría de las industrias procesadoras de seda (Pescio et al., 2008). Sin embargo, en los países asiáticos han implementado sistemas para su recuperación, debido entre otras razones, a las diversas propiedades y aplicaciones en el campo cosmético, alimenticio y biomédico que se le adjudican a esta proteína. Entre sus principales características se destaca la actividad antioxidante (Capar, Aygun, & Gecit, 2009).

Debido a la presencia de sericina en las aguas del desengomado, las descargas de este residuo en efluentes acuosos incrementan los valores de DBO y DQO (demanda química y bioquímica de oxígeno). Diversos autores han reportado valores de DBO y DQO hasta de 4840 mg/L y 8870 mg /L respectivamente; siendo ambos demasiado elevados con respecto a las normativas ambientales. Por lo tanto, el tratamiento de las aguas residuales en cuestión, implica grandes costos para esta industria, ya que se requieren plantas de tratamiento sofisticadas, debido al alto contenido de materia orgánica de las aguas (Vaithanomsat & Kitpreechavanich, 2008).

Por lo anterior, en el presente trabajo se estudiará acerca de la recuperación de la sericina a partir del desengomado de la seda y su aplicación en el área alimenticia como ingrediente para el posible desarrollo de alimentos funcionales.

1. LA SERICULTURA

1.1. Breve historia de la sericultura

La sericultura es una actividad agroindustrial que consiste en la cría del gusano de seda (*Bómbyx mori*) y la obtención del hilo a partir de los capullos de éstos. Fue una actividad prestigiosa que tuvo su origen en la sociedad oriental. El registro escrito más antiguo existente, es el libro de gusanos de seda *Can-jing*, en China, en éste data que la reina del imperio *Huang-Di*, en el año 2650 AC, comenzó la cría de gusanos de seda. Con los siglos, desde China, la sericultura se ha extendido a otros continentes a través de "La ruta de la seda" (Takeda, 1999) (ver Figura 1). El comienzo de esta ruta comercial tuvo lugar bajo la dinastía Han (206 A.C- 220 D.C) y sobrevivió hasta finales del siglo XV, 150 años después de los viajes del veneciano Marco Polo, cuando fueron abiertas las rutas comerciales marítimas (Hongbo, 2012).

El gusano de seda no llegó a Occidente sino hacia el año 582 D.C., gracias a dos monjes que donaron la semilla al emperador Justiniano. Desde Bizancio, una colonia griega que luego fue renombrada como Constantinopla, los árabes lo llevaron a España y, alrededor del año 1000, llegó a Italia, más concretamente a Sicilia. Aquí, la sericultura se asentó sólidamente y se difundió por toda la península (Niglio, 2012).

Con el transcurrir del tiempo y la revolución industrial se conformaron nuevos centros de expansión en otros países europeos como Francia y Portugal. La industrialización de la seda pasó entonces por un nuevo período con la aparición de las factorías textiles, que estuvieron a cargo de grandes industrias que retribuían el trabajo con salarios bajos (Vieites & Basso, 2010).



Figura 1. Dispersión mundial de la seda desde China, y posteriormente desde Europa. Fuente: Cifuentes, 1998.

En la década de los 70, China intervino con un ritmo sostenido de industrialización y penetración en el mercado de la seda, convirtiéndose en el primer productor mundial de esta fibra, rompiendo el mercado oligopólico preexistente con una enorme fuerza competitiva y poniendo nuevos productos de seda a menores precios. Este nuevo escenario cambió el esquema comercial mundial de la seda logrando dos aspectos importantes; por un lado, quebró a numerosas empresas europeas por la brusca caída de los precios de los productos terminados y, por otro lado, sus bajos costos de producción hicieron desaparecer, en gran medida, a las producciones europeas de capullos de seda. Esto originó un desabastecimiento creciente de las grandes hilanderías que demandaban incesantemente mayores cantidades de esta materia prima.

Esta situación obligó a la industria mundial de la seda a interesarse en el continente americano como la nueva alternativa para la producción de capullos, ya que cuenta con muchas ventajas comparativas y competitivas frente a otras regiones. Por un lado, las condiciones agroecológicas de América permiten cuatro y hasta nueve crías al año frente a una o máximo dos posibles en Europa. Por otro lado, la región mantiene bajos costos de mano de obra y, adicionalmente, no existe competencia industrial, lo que facilitaba los fines buscados por esas organizaciones extranjeras. En las últimas décadas la sericultura tomó importancia, sobre todo, por la participación de capitalistas italianos y japoneses en Brasil, Paraguay y Argentina (Vieites & Basso, 2010).

1.2 La sericultura en Colombia

En Antioquia, la industria sericícola se remonta aproximadamente al año de 1868, y sus primeros impulsores fueron Manuel Vicente de la Roche y José María Giraldo. Para esa época, de la Roche ya era exportador de seda a Europa. Giraldo mientras tanto, se ocupaba de esa industria en la ciudad de Salamina, en Caldas, y aunque allí era un pionero, era seguidor de los adelantos efectuados por de la Roche (Castro Duque, 1999).

A principios de la década de los 80, la Federación Nacional de Cafeteros introdujo la sericultura a zonas subtropicales como alternativa productiva frente a la crisis mundial del café. En 1982, se creó la planta de transformación de capullo en hilo de seda industrial: HILOSEDAS, establecida como centro de investigación y planta piloto. A principios de la década de 1990, la situación sericícola en Colombia declinó debido a que China bajó el precio de la seda, ya que se sentía amenazado por la creciente producción en países occidentales. Adicionalmente, las nuevas larvas importadas no se adaptaron al clima tropical, lo que trajo consigo grandes pérdidas a los sericultores (Vieites & Basso, 2010).

En 1993 se firmó un convenio bilateral entre Colombia y la Unión Europea, con el fin de cultivar cerca de 1.500 hectáreas de morera para abastecer una nueva planta procesadora al norte del Cauca, en el municipio de Santander de Quilichao, que permitiera reactivar la sericultura en el

departamento y a la vez producir hilo industrial (Vieites & Basso, 2010). En 1994, y debido a la necesidad de contar con una raza de gusano que se adaptará al clima colombiano y que permitiera seguir desarrollando el proceso sericícola, se constituyó en Pereira el Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura, C.D.T.S, con sede en la Granja El Pilamo, dando inicio a la investigación y producción de híbridos del gusano de seda (Cifuentes & Sohn Wook, 1998).

En 1998, la Unión Europea decidió no seguir apoyando la sericultura en el departamento del Cauca, debido a los continuos incumplimientos del gobierno nacional en términos de contrapartida. Por esta razón, los productores y artesanos comenzaron a hablar de la necesidad de organizarse, y teniendo en cuenta las experiencias anteriores decidieron no esperar a que los tiempos difíciles llegaran para hacerlo. Así, en el año 2000 nació la Corporación para el Desarrollo de la Sericultura del Cauca, CORSEDA. La misma integra tanto a productores como artesanos de la seda en la región (las diez organizaciones locales), y busca llegar a ser autosostenible para poder afrontar cualquier momento de crisis que pueda venir en el futuro, entendiendo que debe buscarse el beneficio colectivo por encima del individual (Cifuentes & Sohn Wook, 1998).

1.3 Red Andina de la seda

El inicio de sus actividades fue en el año 2004. Actualmente la Red está conformada por Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Italia fue el país promotor de esta iniciativa. Las actividades contempladas están enfocadas en tres frentes: 1) Difundir la cultura y formación en el campo sericícola a través de la Cooperación entre las Universidades, Escuelas Politécnicas e Instituciones de Investigación locales; 2) Desarrollar proyectos conjuntos con Universidades e Institutos de Investigación Europeos, prioritariamente Italianos; e 3) Incentivar la producción de capullos de calidad y ayudar al sector artesanal (Red Andina de la Seda, 2009).

En la el 2009, la Red contaba con un total de 510 pequeñas familias vinculadas a la actividad en Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. La producción de capullo fresco fue en el 2008 de 8.186 kg, de los cuales 69% lo produjo Colombia, mientras que la participación de Perú, Ecuador y Bolivia fue de 21, 9 y 1% respectivamente. Según la FAO (2009), la producción de los países latinoamericanos mencionados constituye alrededor del 0,002% del total mundial.

2. LA SEDA

2.1 Características

La seda proviene del procesamiento de los capullos producidos por los gusanos *Bombix Mori*. Éste es un insecto lepidóptero, originario de China (Cifuentes & Sohn Wook, 1998). Es una especie con metamorfosis completa, lo que significa que durante su vida atraviesa por los estados de huevo, larva o gusano, crisálida o pupa y mariposa. El proceso de cría consiste en alimentar con hojas de morera a los gusanos, los cuales al entrar en estado de crisálida construirán un capullo, con un único filamento de seda (ver Figura 2), que es la unidad productiva (Pescio, *et al.*, 2008) (Takasu *et al.* 2010).

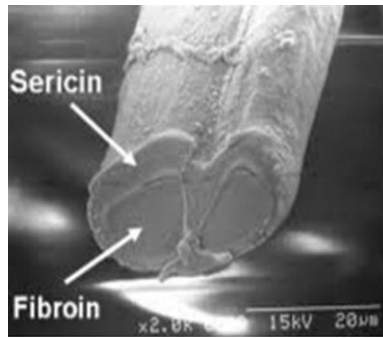


Figura 2. Corte transversal de un filamento de seda. Fuente: Mondal, 2007.

Los gusanos de seda poseen dos glándulas sericígenas, ubicadas a ambos lados del cuerpo, en las cuales se sintetizan los componentes que constituyen el filamento de seda, con el cual se forma el capullo. La longitud de esta fibra puede variar de 500 a 1200 metros y aún más, según la raza, la alimentación del gusano y las condiciones de cría (Pescio *et al.*, 2008). El color del capullo es debido a la presencia de pigmentos, en su mayoría, flavonoides y carotenos, variando según la cepa del gusano (Aramwit, *et al.*, 2010). Además, contiene en menor proporción, materia inorgánica, carbohidratos y ceras (ver Tabla 1).

La fibra de seda es de naturaleza proteica y está constituida por dos filamentos de fibroína, envueltos por sericina, una proteína globular que los protege (ver Figura 2) (Mondal *et al.*, 2007). Ésta última será estudiada con profundidad en el siguiente capítulo. La fibroína es una glicoproteína hidrofóbica. Posee dominios amorfos y otros cristalinos, con cortas cadenas aminoacídicas en su interior que le posibilitan mantener su estructura empaquetada característica (Padamwar & Pawar, 2004). Sus propiedades distintivas como suavidad, longitud, fino calibre, afinidad a colorantes, capacidad de brillo y tolerancia térmica, la convierten en una materia prima

ideal para la producción de telas preciosas, paracaídas, materiales de revestimiento de neumáticos, vasos sanguíneos artificiales y suturas quirúrgicas, entre otras (Mondal *et al.*, 2007).

Tabla 1. Composición del filamento de seda.

Componente	%
Fibroína	70-80
Sericina	20-30
Materia grasa	0,4-0,8
Carbohidratos	1,2-1,6
Materia inorgánica	0,7
Pigmentos	0,2
Total	100

Fuente: Mondal, 2007

2.1 Procesamiento

La seda puede procesarse como filamento continuo o bien como fibra cortada. Para ésta última se utilizan los capullos defectuosos. Las etapas principales del procesamiento del filamento continuo son: el desborre y el secado de los capullos, el devanado de los filamentos, torsión y empalme, desengomado, procesos tintóreos y acabado. El procesamiento de la fibra cortada incluye la preparación de la misma, la mezcla con otro tipo de fibras, cardado (técnica para aumentar el volumen de la fibra), preparación de hilatura e hilatura propiamente dicha (Pescio *et al.*, 2008), (Cifuentes & Sohn Wook, 1998).

- *Desborre:* La borra es una fibra de seda laxa que emiten las larvas con el objetivo de mantenerse amarradas a la estructura de sostén cuando comienzan a formar el capullo. El primer paso del procesado de la seda es la eliminación de la borra, ya que la misma no es devanable. Esta tarea, denominada desborre, se lleva a cabo en el mismo lugar de la cosecha o en la planta de transformación. Puede realizarse de manera manual, o mediante medios mecánicos para acortar el tiempo de trabajo.
- *Secado de los capullos:* Los capullos recién cosechados poseen un alto contenido de humedad (60% aproximadamente). La mayoría del agua se encuentra en el cuerpo de la pupa (Cifuentes & Sohn Wook, 1998). La técnica más común para secar los capullos consiste en someterlos a una corriente de aire muy caliente durante algunas horas. La temperatura inicial es de 110° a 115°C y va descendiendo hasta llegar en la etapa final a 55° - 60°C. Esta tarea se llama *sofocado*. La temperatura *de secado* es sumamente importante, una temperatura muy alta podría causar menor devanabilidad en los capullos, y por el contrario, si la temperatura es baja, los capullos quedarán húmedos, provocando la aparición de hongos durante el almacenamiento.

- *Devanado del capullo:* Los capullos se devanan con el fin de obtener madejas de seda cruda. Se denomina seda cruda a la fibra de seda que aún tiene sericina. Cuando se realiza el devanado, se está haciendo el proceso inverso que hizo la larva para construir su capullo. La manera más simple de lograrlo es sumergiendo los capullos en agua caliente, donde la sericina se ablanda y permite tomar el filamento para devanar. El devanado se puede realizar en forma manual o mecánica, de acuerdo a la cantidad de capullos a utilizar, a la inversión que ello signifique y el efecto de ésta sobre el costo total de producción.
- *Acoplado y retorcido:* Se llama acoplado a la unión de varios filamentos para formar un único hilo. El grosor o título dependerá de la cantidad de filamentos acoplados, es decir, de la suma de los filamentos que lo componen. Estas acciones se realizan con una máquina retorcedora, o bien en una rueca.
- *Descruce o desengomado:* En esta etapa se elimina la sericina y demás contaminantes naturales o adquiridos durante el proceso de obtención de la seda. El desengomado es clave para tratamientos posteriores de tinción y acabados de la seda. La remoción de la sericina le proporciona a los hilos o telas de seda un aspecto suave y brillante. Existen varias maneras de realizar el desengomado. La forma tradicional consiste en calentar los capullos, hilos o telas durante una hora aproximadamente en agua con bicarbonato y jabón.

Se han investigado diversos métodos de desengomado con el fin recuperar la sericina extraída para distintas aplicaciones, y además causar un menor impacto en el medio ambiente, debido a los desechos con alta carga orgánica, generados en esta etapa. En el capítulo 3, numeral 3.2 se ampliará sobre las distintas metodologías desarrolladas para extraer la sericina de la fibra de seda, según el producto final que se desea obtener.

- *Procesos tintóreos y acabado:* Según el destino del producto final, la seda puede blanquearse, para luego colorear, ya sea con tinturas químicas o de origen natural.

3. LA SERICINA

3.1 Características

3.1.1 Composición proteica y aminoacídica

La sericina constituye aproximadamente el 20-30% del capullo de los gusanos de seda. Está compuesta por diferentes polipéptidos, de entre 24 a 400 kDa. Posee 18 aminoácidos distintos, incluyendo aminoácidos esenciales (Padamwar & Pawar, 2004), de los cuales, alrededor del 40% corresponde a serina y cantidades menores de glicina y ácido aspártico.

La sericina es de naturaleza glicoproteica. En ella se pueden encontrar grupos de N-acetilgalactosamina, residuos de manosa y dos residuos de N-acetilglucosamina cuando ha sido aislada del gusano *Bombix mori* (Kundu, *et al.*, 2008).

3.1.2 Estructura secundaria proteica

Con respecto a la estructura secundaria, la sericina se encuentra en un estado parcialmente desplegado, con 35% de láminas β , debido a los puentes de hidrógeno entre los aminoácidos polares como la sericina; y 63% de estructuras de espiral al azar (Kundu *et al.*, 2008). Las temperaturas de procesamiento menores, entre los 50° y 60° C, favorecen la formación de láminas β , las cuales son más difíciles de disolver, en comparación a los espirales al azar (Padamwar & Pawar, 2004).

3.1.3 Solubilidad

Según su solubilidad, la sericina puede clasificarse en A, B y C. La **sericina A** corresponde a la capa más externa y es la más soluble en agua caliente; está formada por filamentos direccionales. La **sericina B** representa la capa intermedia y está constituida por filamentos cruzados. La **sericina C** es la capa más adyacente a la fibroína, solo se remueve con tratamientos calientes a altas presiones o con álcalis, y se forma por filamentos longitudinales (Padamwar & Pawar, 2004). Las altas temperaturas degradan las láminas β , aumentando la solubilidad de la sericina en agua caliente (Kundu *et al.*, 2008).

3.1.4 Peso molecular

El peso molecular de la sericina varía según el método de extracción que se lleve a cabo. En muestras de sericina obtenidas mediante tratamientos con agua caliente se han reportado pesos moleculares de 17 a 250 kDa, analizados mediante cromatografía en columna (Oh, Lee, Kim, Um, & Lee, 2011) y electroforesis *SDS page* (Sothornvit *et al.*, 2010). En extracciones utilizando 1% de deoxicolato de sodio, seguido por precipitación, se han obtenido pesos moleculares de 17 a 18 kDa. Mediante el uso de enzimas para la extracción de sericina, se han hallado pesos moleculares de 0,3 a 10 kDa. Por último, en extracciones con soluciones acuosas de urea y temperaturas de 100°C se han obtenido pesos moleculares de alrededor de 50 kDa (Padamwar & Pawar, 2004).

3.2 Métodos de obtención

La extracción de la sericina de la seda se conoce como *desengomado o descruce*. Este proceso se basa principalmente en su solubilidad en agua caliente. Se han desarrollado gran cantidad de métodos de extracción, los cuales varían en la técnica empleada y en las características del producto final obtenido, principalmente en el peso molecular y pureza de la sericina. Algunos de éstos se describen a continuación.

Extracción con detergente y álcali. El desgomado de la seda puede llevarse a cabo mediante el uso de detergentes y jabones, los cuales producen la desnaturalización de algunas proteínas y la hidrólisis parcial de las cadenas del filamento. En este caso, para la recuperación de la sericina de las aguas residuales, se requiere hacer un proceso de aislamiento de los ácidos grasos presentes, los cuales provienen de los jabones. Para esto, se centrifuga el agua residual con el fin de precipitar las impurezas. Luego se acidifica el sobrenadante con ácido clorhídrico, y se enfría desde temperatura ambiente hasta 4°C con el fin de lograr la cristalización de los ácidos grasos. Por último se realiza una ultrafiltración, obteniendo en este último paso las proteínas aisladas. El peso molecular que se obtiene es aproximadamente de 20 kDa y está determinado por la membrana de la última filtración (Capar *et al.*, 2009).

Extracción con enzimas. Otro método estudiado consiste en desgomar la seda mediante enzimas proteolíticas alcalinas. Aunque la técnica posee la desventaja de ser costosa, genera menos impacto ambiental debido a la ausencia de agentes químicos y al bajo requerimiento energético. La sericina se remueve completamente y se recupera mediante secado. Se obtienen péptidos de 5-20 kDa libres de álcalis (Freddi *et al.*, 2003).

Extracción con agua caliente y precipitación alcohólica. Un método económico y eficiente consiste en realizar el desengomado de la seda en agua, mediante el uso de autoclave a una temperatura de 120°C y durante una hora. Luego se liofiliza la sericina y se mezcla con etanol. Posteriormente, se centrifuga la mezcla y se recupera la sericina precipitada. La muestra que se obtiene es

sumamente viscosa y de pesos moleculares de aproximadamente 200 kDa. Con estas características su aplicación se limita a sistemas de liberación de drogas o para inmovilización de enzimas (Oh et al., 2011).

Otras técnicas. Hay métodos que implementan tecnologías más sofisticadas. Uno de ellos consiste en extraer la sericina mediante un sistema de calentamiento por infrarrojo (IR). La técnica posee ventajas frente al calentamiento convencional como es el corto tiempo del proceso y una mayor eficiencia. La recuperación se lleva a cabo mediante un equipo de secado por atomización. La cantidad de sericina obtenida es considerablemente alta. La desventaja es que no es factible para procesos a gran escala debido a que no se disponen equipos para extraer grandes cantidades (Gupta, et al. 2013). También se ha extraído sericina utilizando tecnologías de sonicación. En este caso se aplica ultrasonido a los filamentos de seda junto con enzimas proteolíticas. La ventaja es que se evita el uso de detergentes y jabones disminuyendo la carga contaminante de los residuos (Mahmoodi et al., 2010).

Hay técnicas un poco más complejas que consisten en recuperar la sericina de aguas residuales utilizando membranas especializadas, previo a un desgomado con agua caliente. Las membranas se sintetizan poliméricamente obteniendo un tamaño de poro específico. La capa superior actúa como una barrera selectiva densa y la capa inferior está formada por microporos. Aunque la eficiencia de recuperación es muy alta, la elaboración de las membranas es complicada (Sonjui et al., 2009).

La técnica más simple y quizás la más antigua, consiste en el desgomado de la seda en agua caliente. Luego de ensayar distintas condiciones se dedujo que al autoclavar la seda durante 30 minutos, a una temperatura de 105°C, se obtiene un producto de aspecto gelificado, mientras que al autoclavar con temperaturas mayores, esta característica desaparece y aumenta el rendimiento de la sericina extraída (Padamwar & Pawar, 2004). Sothornvit et al. (2010) evaluaron la extracción de sericina con agua caliente, variando la temperatura y el tiempo de tratamiento. El rango de temperaturas trabajado fue de 82-120°C utilizando autoclave, y variando el tiempo de 10 a 60 minutos. La extracción se llevó a cabo utilizando una relación 1:30 (p/p) de residuos del desgomado de la seda en agua caliente. Luego la sericina se separa mediante presión hidráulica a 2,5 MPa durante un minuto. Posteriormente, se determina el peso seco, mediante el secado en horno a 105°C. Los resultados indicaron que a mayor temperatura, la extracción de sericina aumenta, alcanzando cantidades máximas a los 115° C, durante 43 minutos de tratamiento. En este ensayo la sericina obtenida presenta un peso molecular de 132 a 216 kDa (Sothornvit et al., 2010).

Aramwit et al. (2010) también evaluaron la extracción de sericina mediante el uso de autoclave. Los autores aislaron la proteína de una muestra de capullos troceados. En este procedimiento se filtra la solución obtenida para deshacerse del material insoluble, como la fibroína. Luego se

almacena en frío y se liofiliza para obtener sericina en polvo. El peso molecular registrado por los autores mediante electroforesis SDS-page, es de 25-150 kDa (Aramwit *et al.*, 2010).

3.3 Aplicaciones de la sericina

Actualmente, una de las principales aplicaciones de la sericina es en el área biomédica, donde se utiliza como anticoagulante, en sistemas de liberación de droga, y para ingeniería de tejidos. También se han desarrollado apósitos a base de sericina y fibroína, los cuales aceleran el proceso de cicatrización y permiten retirarse sin dañar la piel recién formada (Zhang, 2002). Por otro lado, la presencia de gran cantidad de aminoácidos hidrofílicos, y por lo tanto, su capacidad para retener humedad y formar geles, hace posible su uso en el área cosmética como humectante de piel, uñas y cabello (Mase *et al.*, 2010). Generalmente, el peso molecular que posibilita estas aplicaciones es menor a 20 kDa (Zhang, 2002).

Se ha investigado el uso de sericina para desarrollar películas de biopolímeros para el área biomédica y con otras aplicaciones en el área de alimentos. Debido a su característica orgánica, estas podrían usarse para revestir alimentos y evitar que la humedad y el oxígeno los dañen, trabajando con pesos moleculares de alrededor de 200 kDa (Sothornvit *et al.*, 2010).

El color amarillento de los capullos está asociado a la presencia de carotenoides, los cuales poseen actividades antioxidantes debido a la presencia de compuestos fenólicos. Otras funciones como la inhibición de la enzima tirosinasa, su capacidad para retener humedad y su característica de ser indigerible por las enzimas intestinales del organismo humano, hacen posible la aplicación de la sericina en el área alimenticia (Mahmoodi *et al.*, 2010).

4. LA SERICINA EN EL ÁREA DE ALIMENTOS

Las aplicaciones de la sericina en el área alimenticia se atribuyen principalmente a sus características antioxidantes y a otras funciones con efectos positivos en el organismo, como el tratamiento de la constipación, el aumento de la absorción intestinal de minerales y su función prebiótica. Todas estas, las cuales se ampliarán en la sección 4.2 y 4.3, convierten a la sericina en un posible ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales.

4.1 Alimentos funcionales

Según la institución FUFOSE, Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa, los alimentos funcionales son aquellos alimentos en su forma natural o procesados, que además de sus componentes nutricionales, contienen componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona, desempeñando una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano (Alvídrez Morales *et al.*, 2002).

Operativamente, un alimento funcional puede ser (Olagnero *et al.*, 2007):

- Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado.
- Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios.
- Un alimento del cual se ha eliminado un componente y producirá menos efectos adversos sobre la salud.
- Un alimento en el cual alguno de sus componentes ha sido modificado químicamente para mejorar la salud.
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más componentes ha sido aumentada.
- Combinaciones de las anteriores.

Hoy en día, Europa domina el mercado de los alimentos funcionales, siendo África y Latinoamérica, los continentes en los cuales el desarrollo de este tipo de alimentos aún es bajo (ver Figura 3).

En Estados Unidos, en 1994, la Academia Nacional de Ciencias de los Alimentos (*Nacional Academy of Sciences Food*) y el Comité de Nutrición (*Nutrition Board*), definieron a los alimentos funcionales como “alimentos modificados o ingredientes que pueden proveer un beneficio para la salud, más allá de los nutrientes que poseen”. En el año 2004, la *American Dietetic Association* (ADA) emitió un documento institucional sobre los alimentos funcionales, donde los definen como

aquellos que tienen potenciales efectos beneficiosos sobre la salud cuando son consumidos como parte de una dieta variada, a niveles efectivos (Olagnero *et al.*, 2007).

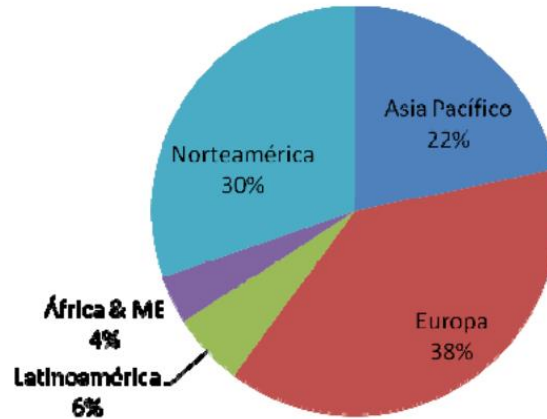


Figura 3. Desarrollo de alimentos funcionales en el mundo entre 2001-2009. Fuente: Morán, España 2009.

Entre los alimentos funcionales se destacan aquellos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos o antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos para el organismo (Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación, EUFIC, 2006).

La necesidad de contar con alimentos que sean más beneficiosos para la salud, también se ve apoyada por los cambios socioeconómicos y demográficos que se están dando en la población. El aumento de la esperanza de vida, que tiene como consecuencia el incremento de la población anciana y el deseo de gozar de una mejor calidad de vida, así como el aumento de los costes sanitarios, han potenciado que los gobiernos, los investigadores, los profesionales de la salud y la industria alimenticia busquen la manera de controlar estos cambios de forma más eficaz (EUFIC, 2006).

Los conceptos planteados, con excepción de ADA que incluye alimentos naturales, fortificados y enriquecidos, coinciden en definir a los alimentos funcionales como aquellos que han experimentado un cambio a través del procesamiento que conlleva a un aumento de sus propiedades saludables. En base a esto, y a las propiedades de la sericina, principalmente a su actividad antioxidante, ésta puede considerarse como candidata para la elaboración de alimentos funcionales mediante su agregado a éstos. En la Tabla 2 se detallan los ingredientes aprobados por el sistema de regulación japonés, FOSHU, para la elaboración de este tipo de alimentos (Cortés *et al.* 2005).

Tabla 2. Ingredientes aprobados por el sistema de regulación japonés, FOSHU, para la elaboración de alimentos funcionales.

Ingredientes para alimentos funcionales

(según sistema de regulación japonés FOSHU)

- Fibras alimentarias
- Oligosacáridos
- Péptidos y Proteínas
- Glucósidos, Isoprenoides y Vitaminas
- Alcoholes y fenoles
- Ácidos grasos poliinsaturados.
- Bacterias ácido lácticas
- Colinas (lecitina)

Fuente: Cortés, 2005.

El consumo de estos compuestos en la ingesta de alimentos funcionales tiene múltiples efectos beneficiosos en el organismo. Las **fibras alimentarias**, debido a su capacidad hidrofílica, retienen agua y nutrientes hidrosolubles, como los azúcares, fijan ácidos biliares y minerales, y aumentan la viscosidad y el volumen del contenido intestinal. La propiedad fundamental de la fibra insoluble es su gran capacidad hidrofílica y el aumento del bolo fecal. En este sentido, la cantidad de la ingesta es muy importante. La fibra soluble, como prebiótico, sostiene la microflora del colon (Gallego, 2003).

Los **oligosacáridos** son polímeros de hasta 20 aminoácidos. Por ejemplo, la leche materna es rica en oligosacáridos, los cuales actúan favorablemente sobre la población de bifidobacterias en el intestino del neonato. En Europa y en Estados Unidos se suplementan alimentos destinados a niños y adolescentes con oligosacáridos tipo inulina, fructulinosacáridos y galactoligosacáridos, mientras que en Japón se emplean otros extraídos de plantas o sintetizados a partir de lactosa o sacarosa (Miñana, 2007).

Los **péptidos bioactivos y las proteínas funcionales**, además de su valor nutricional por la presencia de aminoácidos, son capaces de ejercer efectos biológicos específicos. Poseen actividad antitrombótica y antihipertensiva, relacionadas al sistema cardiovascular; actividad antipercolesterolemia, hallada por ejemplo en biopéptidos de soya; propiedades antimicrobianas e inmodulantes, procedentes de los biopéptidos obtenidos de la leche y otros productos lácteos; y por último, actividad antioxidante. Se han identificado péptidos que presentan actividad antioxidante en proteínas de alimentos como la leche, la soja, el garbanzo, el

huevo o el pescado. La capacidad antioxidante se debe a que estos compuestos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno. Los péptidos bioactivos reaccionan más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas de la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Erosqui, 2013).

Glucósidos, Isoprenoides y Vitaminas: Los glucósidos son fitoquímicos con usos medicinales, utilizados en mínimas concentraciones. Por ejemplo, los cardioglucósidos son sustancias con gran eficiencia en variadas afecciones cardíacas. Los isoprenoides pertenecen a la familia de los lípidos y abarcan varias vitaminas como la vitamina A, E y K. Otros de ellos, forman parte de los aceites esenciales de algunas plantas. Las vitaminas son sustancias inorgánicas que están presentes en los alimentos y son absolutamente imprescindibles para el correcto funcionamiento del organismo. Son 13, las vitaminas A, C, D, E, K y las vitaminas B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, biotina, vitamina B-6, vitamina B-12 y folato o ácido fólico). Cada una de ellas posee una función específica en el cuerpo humano (Astoviza, 2010).

Los **alcoholes y compuestos fenólicos** también ejercen una potente acción antioxidante necesaria para el funcionamiento de las células vegetales. Actualmente hay un interés creciente en estas moléculas debido a sus múltiples propiedades antioxidantes: por un lado, son captadores de radicales libres y por otro, impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación, favoreciendo la prevención del cáncer, de las enfermedades cardiovasculares e incluso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Creus, 2004).

Los **ácidos grasos poliinsaturados** son esenciales en muchas funciones bioquímicas, y aunque se requieren en pequeñas cantidades, el organismo humano tiene muchas limitaciones para formarlos a partir de precursores más simples, por lo cual deben estar presentes en la dieta (Valenzuela Bonomo & Garrido, 1998).

Las **bacterias ácido lácticas**, principales microorganismos probióticos, son añadidas a alimentos con efectos positivos en el organismo. Por ejemplo, la ingestión de *Lactobacillus GG* disminuye la gravedad y duración de la diarrea de origen vírico.

Las **colinas (lecitina)** son fosfolípidos que ayudan a la solubilización de los ácidos biliares en la bilis. La lecitina de soja, por ejemplo, posee vitaminas del grupo B, vitamina E con función antioxidante, fósforo, y contribuye a mejorar el perfil lipídico en sangre, ya que reduce el colesterol (Valenzuela Bonomo & Garrido, 1998).

4.1.1 La sericina como ingrediente para alimentos funcionales

La sericina se encuentra incluida dentro de la clasificación de “Péptidos y proteínas”, debido a la estructura proteica que la caracteriza. Esto no significa que sólo actúa como fuente proteica en el alimento, sino que además le brinda otros beneficios, a los que se debe el nombre de *alimento*

funcional. Hoy en día no existen en el mercado alimentos que contengan sericina, no obstante, en el 2004 se aprobó en España una patente en la cual se refiere a la sericina como antioxidante, para ser utilizada en el campo de los alimentos, cosméticos, o médico.

El desarrollo de alimentos funcionales implica comprobar la inocuidad de la sericina con respecto al organismo humano. Para esto, previamente se debe evaluar su toxicidad en animales. En un estudio realizado por Bunarsa *et al.* (2013), se evaluó la toxicidad de un hidrolizado de proteínas de sericina en un grupo de ratones, analizando la respuesta de ésta en los órganos vitales de los animales y los valores hematológicos. En el ensayo se alimentaron ratones con 50, 100 y 500 mg/kg de sericina hidrolizada con enzimas proteolíticas, durante 28 días. Al comparar con el grupo control, se observó que el peso del animal, y el peso de los órganos vitales como los pulmones, riñones, hígado y el bazo, no presentaron variaciones con ninguna de las cantidades de sericina suministradas. En cuanto al análisis hematológico, tampoco se observaron variaciones en el recuento de glóbulos rojos y el porcentaje del hematocrito, al igual que los neutrófilos y linfocitos que tampoco evidenciaron variaciones. Estos datos sugieren que los oligopéptidos derivados de la sericina no tienen efectos tóxicos en los órganos vitales, en particular órganos linfoides y del sistema inmune, por lo tanto es válido continuar las investigaciones con el fin de convertir a la sericina en ingrediente para alimentos funcionales (Bunarsa *et al.*, 2013).

En la Tabla 3 se detallan las características y los pasos a seguir, con respecto a la elección del alimento funcional al cual se le añadirá el ingrediente activo.

Tabla 3. Consideraciones que debe garantizar la selección del alimento.

Aspectos que debe cumplir el alimento funcional
1. Control de calidad.
2. Las características organolépticas del alimento no deben sufrir cambios significativos.
3. Ser económicamente viable a través de un proceso industrial.
4. No ser tóxica debido a un exceso de la dosis empleada o por interacciones con otros componentes originales del alimento.
5. El alimento seleccionado debe ser consumido regularmente y en cantidades predecibles por la población.
6. Estabilidad y biodisponibilidad de los nutrientes bajo condiciones de uso y almacenamiento.

Fuente: Cortés, 2005.

4.2 Antioxidantes

Una de las principales características de la sericina es su capacidad antioxidante. Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La protección contra la oxidación es importante en dos enfoques distintos: a nivel alimenticio y a nivel biológico.

En los procesos metabólicos que implican producción de energía, se forman especies reactivas que son neutralizadas por enzimas presentes en el organismo, como catalasa, glutatión peroxidasa y varios compuestos no enzimáticos como selenio, tocoferol, vitamina C, aminoácidos y péptidos. Estas especies reactivas pueden causar impactos negativos en la célula, lo que se conoce como estrés oxidativo (Cornish & Garbary, 2011).

Por otro lado, la descomposición y el deterioro de los alimentos se deben, en parte, a las reacciones de oxidación de los lípidos que contienen. Los ácidos grasos poliinsaturados, ya sea como ácidos grasos libres o triglicéridos, son los más propensos a sufrir este tipo de descomposición. Como resultado, se generan compuestos intermediarios y radicales libres, que generan rancidez y deterioran el alimento. En las frutas, algunas verduras y champiñones, e incluso en la industria del vino, el pardeamiento enzimático causado por la oxidación, es un problema, ya que al producir alteraciones en el color, reducen el valor comercial de los productos, o incluso los hacen inaceptables para el consumidor. Además de los aspectos relacionados al sabor y a la apariencia física del alimento, estos procesos de oxidación reducen la calidad nutricional, ya que los intermediarios formados reaccionan con compuestos antioxidantes, como el ácido ascórbico, destruyéndolos; o se pierden otros compuestos en el alimento durante su acción como antioxidante para prevenir este daño, como la vitamina E, por ejemplo (Gordon, 2001).

Debido a la importancia de estas sustancias, se han desarrollado antioxidantes sintéticos como hidroxitolueno butilado (HTB), hidroxiniasol butilado (HAB) y propil galato (PG) para retardar los procesos de oxidación y peroxidación en alimentos. Sin embargo, estos compuestos deben estar bajo una regulación estricta debido a sus potenciales riesgos para el ser humano a causa de su síntesis química. Frente a esto, los antioxidantes naturales para la industria alimenticia con efectos positivos en la salud, adquieren suma importancia como una alternativa segura y eficiente (Shi & College, 2001).

Se cree que la sericina, en su entorno natural, podría funcionar como una barrera de protección del capullo de seda y del gusano contra agentes externos mediante su actividad antioxidante, previniendo el estrés oxidativo, inhibiendo la actividad tirosinasa y la peroxidación lipídica (Kato, *et al.* 1998). Dicha actividad antioxidante proviene de su naturaleza proteica, debido a la composición aminoácida de la sericina, también se debe a la presencia de carotenoides y compuestos fenólicos como los flavonoides.

4.2.1 Mecanismos de las sustancias antioxidantes

Los compuestos antioxidantes logran su efecto mediante diversos mecanismos. En la Tabla 4 se resumen los distintos tipos de antioxidantes, la vía mediante la que actúan y algunos ejemplos de estos.

Tabla 4. Tipos de antioxidantes y sus mecanismos.

Tipo de Antioxidante	Mecanismo	Ejemplos
Estabilizadores de la peroxidación lipídica	Previene la descomposición de compuestos lipídicos	Compuestos fenólicos
Estabilizadores de hidroxiperóxido	Previene la descomposición de hidroxiperóxidos en radicales libres	Compuestos fenólicos
Quelantes de metales	Se une a metales volviéndolos inactivos	Ácido fosfórico
Sinergistas	Promueven la actividad de antioxidantes apropiados	Ácido cítrico, ácido ascórbico
Bloqueadores del singlete de oxígeno	Transforman el singlete del oxígeno en triplete	Carotenos
Sustancias que reducen hidroxiperóxidos	Reducen hidroxiperóxidos en una vía que no implica radicales	Proteínas, aminoácidos

Fuente: Jan Pokorny Nedyalka Yanishlieva Michael Gordon © 2001

La actividad de estos compuestos depende de varios factores como la composición del lípido a oxidarse (en caso de presencia de grasas), la concentración del antioxidante, la temperatura, el oxígeno y la presencia de otras sustancias que cooperen con esta actividad, como el agua o algunas proteínas.

La sericina, debido a los mecanismos mediante los cuales actúa, se incluye dentro de los quelantes de metales, los bloqueadores del singlete de oxígeno y estabilizadores de la peroxidación lipídica.

4.2.2 Métodos para medir la actividad antioxidante

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo (Coba *et al.*, 2010).

Los ensayos *in vitro* más utilizados para medir esta actividad en los compuestos son: “*Ferric Reducing Antioxidant Power*” – FRAP, basado en la capacidad de reducción férrica, y otros tales

como: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil – DPPH, ácido 2,2-azinobis (3etilbenzotiazoline) -6- ácido sulfónico- ABTS, y “*Oxygen Radical Absorbant Capacity*” – ORAC, basados en la captación de estos radicales libres sintéticos por parte del compuesto a medir. El método “*Thiobarbituric acid-reactive substances*” - TBARS, en cambio, permite determinar el grado de peroxidación de lípidos. Se utilizan sustancias estándar antioxidantes como el ácido ascórbico y Trolox®. Éste último es un análogo hidrosoluble a α -tocoferol, ampliamente utilizado en estos ensayos debido a su alta disponibilidad comercial.

A continuación se explicarán con mayor detalle aquellas técnicas que han sido utilizadas por diversos autores como Kato (1998), Chlapanidas (2013), Aramwit (2010) y Zhaorigetu (2001), para reportar en sus ensayos la actividad antioxidante de la sericina.

Método TBARS. Es empleado para determinar la peroxidación de lípidos en sistemas *in vitro*. Es un sistema de medición rápido, sensible y económico. Es ampliamente usado para controlar la calidad de alimentos. En éste método, el ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con malondialdehído (MDA), un producto secundario de la peroxidación de lípidos, para generar un color rojo el cual se puede detectar espectroscópicamente a una longitud de onda de 532-535 nm (Londoño, 2012).

Método para medir la actividad anti-tirosinasa. Se parte de una solución de tirosinasa obtenida a partir de hongos, la cual se mezcla con una solución del antioxidante a una concentración conocida, se le añade dihidroxi-fenilalanina para medir su conversión a dopa-quinona y se incuba durante 5 a 10 minutos. Finalmente se mide la absorbancia a 475 nm. El porcentaje de inhibición de la actividad tirosinasa es calculada de acuerdo a la Ecuación 1. El valor obtenido es directamente proporcional a la actividad antioxidante que ejerce el compuesto.

$$\text{Inhibición (\%)} = [(A - B)/A] \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

A: Representa la diferencia de absorbancia del control entre 0,5 y 1 minuto de incubación.

B: Indica la diferencia de absorbancia de la muestra con el antioxidante y el control entre los mismos tiempo de incubación (Aramwit *et al.*, 2010).

Método DPPH. Gran variedad de métodos han sido desarrollados basándose en evaluar el efecto antioxidante de radicales sintéticos en solventes polares y a temperatura ambiente. Unos de los radicales sintéticos más utilizados es el 2,2 difenil-picrilhidracil (DPPH). El bloqueo (o neutralización) de radicales DPPH se monitorea por una disminución en la absorbancia a 515 nm, la cual ocurre debido a la reducción causada por el antioxidante.

Método FRAP. Consiste en la formación de un complejo férrico con el reactivo TPTZ, el cual en presencia de antioxidantes forma un complejo azul de máxima absorción a 593 nm; los resultados se pueden expresar como $\mu\text{mol Trolox/g}$ o como $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$ (Chavely Restrepa *et al.*, 2009).

Método ORAC. Se basa en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO). La técnica mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del daño oxidativo. La proteína usada es la fluoresceína. El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. Por esto, se utiliza el radical iniciador, el AAPH, para generar el radical peroxil ROO (CORNUCOPIA, 2004).

Método ABTS. El método ABTS consiste en la generación del radical $ABTS^+$, por la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio para producir un cromóforo azul verdoso con absorciones máximas a longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm. En presencia de antioxidantes se produce una disminución de la absorbancia del radical $ABTS^+$; los resultados suelen ser expresados como $\mu\text{mol Trolox/g}$ material analizado. Este método puede ser utilizado en un amplio rango de pH y se aplica para sistemas tanto acuosos como orgánicos (Chavely Restrepa *et al.*, 2009).

4.2.3 Acción antioxidante de la sericina

La sericina, como se ampliará a continuación, ejerce un efecto antioxidante mediante varios mecanismos: previene la descomposición de compuestos lipídicos, se une a metales volviéndolos inactivos (quelante de metales), y bloquea las especies reactivas como el oxígeno singlete.

4.2.3.1 Inhibición de la peroxidación lipídica por acción de la sericina

La reacción directa entre una molécula de lípido poli-no-saturado y oxígeno molecular se conoce como peroxidación lipídica. Estas reacciones, y los productos secundarios que generan, además de ser dañinos para el organismo, alteran la calidad de los alimentos, modificando su textura, el sabor y en algunos casos el color de los mismos (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

Kato *et al.* (1998), evaluaron la actividad antioxidante de la sericina mediante el mecanismo de inhibición de la peroxidación lipídica en extractos de cerebro de ratón homogenizados. Para esto utilizaron el método TBARS, que es específico para mediciones de este tipo.

Al incubar las muestras con 0,3% de sericina y efectuar mediciones incrementando el tiempo de incubación, se observó una gran diferencia entre la medida de absorbancia de éstas y las del control (muestra sin sericina). A mayor tiempo de incubación, la muestra tratada con sericina presentó un leve aumento de productos derivados de la peroxidación de lípidos, indicando una menor oxidación, a diferencia del control, el cual mostró alta absorbancia debido a la presencia de abundantes productos causados por la peroxidación lipídica (Figura 4A).

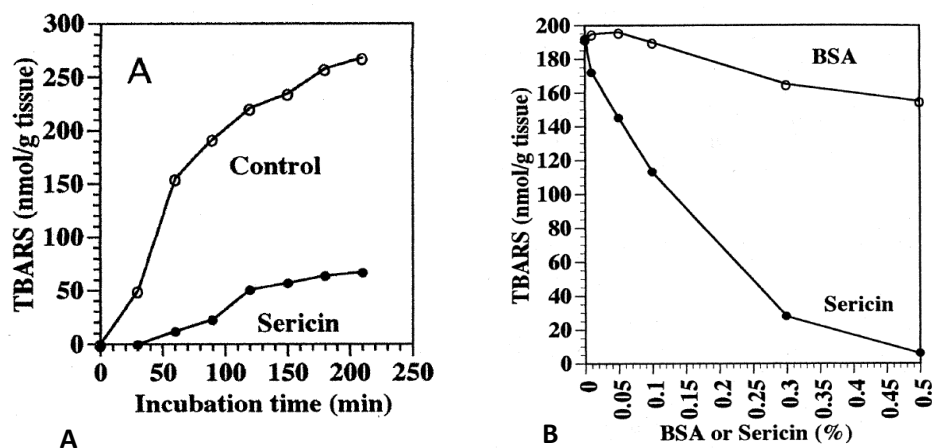


Figura 4. Actividad antioxidante de la sericina mediante la inhibición de la peroxidación de lípidos medida con el método TBARS. A) Absorbancia según el tiempo de incubación. B) Absorbancia según concentraciones crecientes de sericina o BSA (control). Fuente: Adaptado de Kato, 1998.

En otro ensayo realizado por los mismos autores, se adicionó a una muestra de la misma naturaleza antes descrita, concentraciones crecientes de sericina (0-0,5%) y a otra muestra le adicionaron las mismas cantidades de proteína albúmina sérica bovina (BSA), esta última utilizada como control. Los resultados se muestran en la Figura 4B. Se observó que la absorbancia es inversamente proporcional a la cantidad de sericina añadida, acercándose a cero cuando la concentración era de 0,5%. En cambio, en la muestra control, la peroxidación lipídica apenas disminuyó con el agregado de cantidades crecientes de BSA. Esto indica que la sericina disminuye notablemente la peroxidación de lípidos, lo cual podría llegar a ser muy efectivo en el campo alimenticio con el fin de minimizar el deterioro de los alimentos (Kato *et al.*, 1998).

4.2.3.2 Inhibición de la actividad tirosinasa por acción de la sericina

Entre los mecanismos antioxidantes de la sericina, la inhibición de la actividad de la tirosinasa es la más importante. La tirosinasa es la enzima involucrada en la melanogénesis (síntesis de melanina) y la catálisis del proceso de oxidación de la tirosina a la dihidroxi-fenilalanina (DOPA), y de la DOPA a la dopa-quinona. La enzima tirosinasa posee una metaloenzima que contiene átomos de cobre como sitio activo, y cataliza estas reacciones oxidando los átomos de cobre. Estos procesos, por ejemplo, son los responsables del ennegrecimiento de muchas frutas y verduras, lo que se conoce como pardeamiento enzimático (Özer *et al.*, 2007). También están involucradas en enfermedades como el cáncer, y otras neurodegenerativas como el Parkinson, es por esto, que los compuestos con actividad anti-tirosinasa son investigados ampliamente tanto en el campo alimenticio como médico (Aramwit *et al.*, 2010).

Se ha descubierto que la sericina ejerce un efecto quelante sobre los átomos de cobre de la tirosinasa, es decir, los secuestra y por tanto la imposibilita para actuar. Esta capacidad antioxidante se debe a su alto contenido de aminoácidos con grupos hidroxilos (serina y treonina) los cuales ejercen la actividad quelante (Kundu *et al.*, 2008).

Diversos autores como Aramwit *et.al* (2010), Kato *et.al* (1998) y Chlapanidas *et.al* (2013) han reportado una actividad anti-tirosinasa a partir de muestras de sericina proveniente de capullos de distintas cepas, donde se varió tanto la alimentación de los gusanos como las técnicas de utilizadas para su extracción.

Aramwit *et al.* (2010) evaluaron la capacidad anti-tirosinasa de la sericina de tres cepas distintas, extraídas mediante cuatro tratamientos: con calor, con álcalis, con ácidos y con sales (urea). Para las pruebas de capacidad antioxidante se utilizó como control el ácido kójico. En la Figura 5 se observan las muestras utilizadas y sus variaciones en el color del capullo según la cepa.

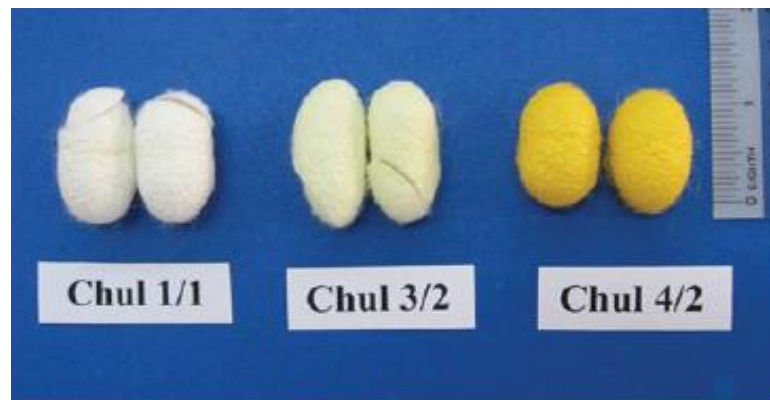


Figura 5. Capullos correspondientes a tres cepas distintas de *Bombix Mori*. Fuente Aramwit, 2010.

Los resultados obtenidos muestran que el mayor potencial antioxidante, indicado como una actividad menor de la enzima tirosinasa (ver Figura 6), debido a la inhibición causada por la sericina, se obtiene con la muestra extraída con urea, mientras que con la sericina obtenida a partir del tratamiento alcalino no se evidenció inhibición de la tirosinasa en ninguna de las cepas estudiadas. Se cree que la mayor inhibición de la enzima tirosinasa en la extracción con urea, se debe a la gran cantidad de aminoácidos valina y arginina resultantes, los cuales tiene más afinidad para unirse a la enzima tirosinasa e inhibirla. Por el contrario, los péptidos con mayor proporción de tirosina, actúan como sustrato para la enzima tirosinasa, activándola y promoviendo su función oxidativa (Aramwit *et al.*, 2010).

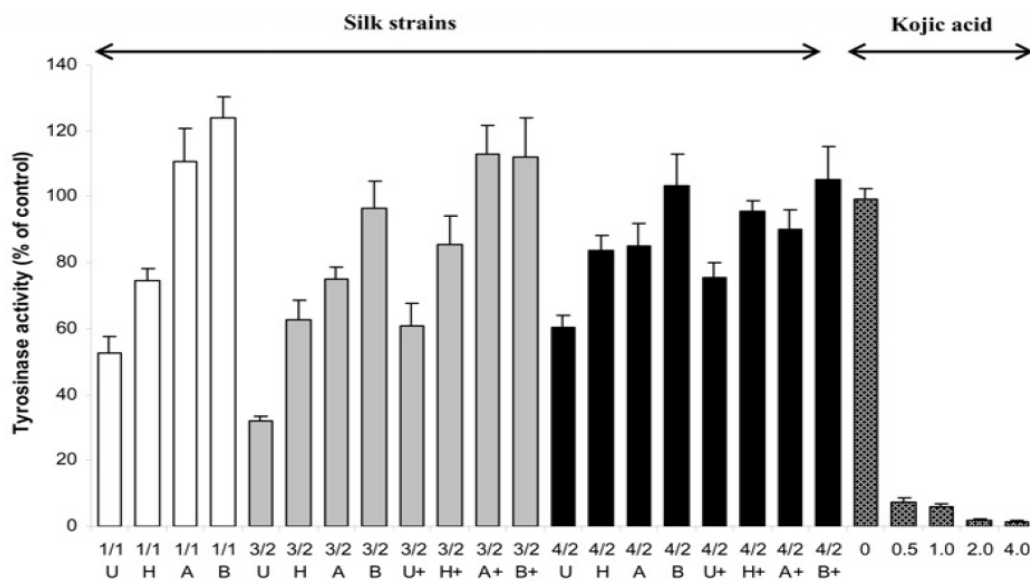


Figura 6. Efecto de la sericina en la actividad de la tirosinasa. Los números 1/1, 3/2 y 4/2 corresponden a las distintas cepas. Los tratamientos se indican como H (calor), U (urea), B (álcalis), A (ácidos). El signo + indica la actividad tirosinasa luego de la remoción del pigmento del capullo. Las últimas 4 muestras corresponden a los controles, siendo 0,5; 1; 2 y 4 la concentración de éste. Fuente: Aramwit, 2010.

En algunas muestras (indicadas con el signo + en la Figura 6) se removió el pigmento del capullo para estudiar la relación entre la actividad antioxidante y los compuestos responsables de esta coloración. Se observó que en las muestras carentes de pigmento la actividad antioxidante fue menor, por lo tanto podría decirse que los compuestos responsables de la coloración del capullo poseen actividad anti-tirosinasa (Aramwit *et al.*, 2010).

Kato *et al.* (1998), ensayaron la actividad anti-tirosinasa de una muestra de sericina extraída mediante el calentamiento de los capullos de *Bombyx Mori*, su posterior filtrado, dializado y secado del líquido obtenido. Se evaluó la actividad en muestras de 0,5% y 1,0% de sericina. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de la sericina en la actividad tirosinasa

Sericina %	Actividad tirosinasa	Método de extracción
0,0	100%	Calentamiento de capullos,
0,5	76%	posterior filtrado, diálisis y
1,0	50%	secado de capullos

Fuente: Adaptado de Kato, 1998.

Se ha reportado que la alimentación de los gusanos de seda influye en algunas de las características biológicas de la sericina, por ejemplo, en la concentración de urea en la hemolinfa, o en la variabilidad de las propiedades antioxidantes. Debido a esto, también se ha investigado la variación de la actividad antioxidante según la alimentación proporcionada a los gusanos de seda *Bombyx mori* (Chlapanidas et al., 2013). Para esto alimentaron 20 cepas distintas de gusanos con un producto artificial y otros con hojas de morera, estas últimas indicadas con las letras FL. Los capullos se desgomaron en autoclave para extraer la sericina, posteriormente se secaron mediante *spray dry* y se obtuvo el polvo de sericina. En la Figura 7 se observa la variedad de cepas utilizadas.



Figura 7. Capullos utilizados de 20 cepas distintas (izquierda). Alimentación natural (indicada como FL) o artificial Fuente: Chlapanidas, 2013.

En la Figura 8 se muestra la actividad anti-tirosinasa de la sericina obtenida a partir de diferentes cepas. A diferencia de la Figura 6, mayores porcentajes de actividad significan mayor potencial antioxidante, ya que se relaciona con el porcentaje de inhibición de la enzima. Se puede observar que la mayor actividad antioxidante se obtiene con la cepa Nistari, alcanzando aproximadamente una actividad del 90%, y en las cepas alimentadas con hojas frescas (FL) se obtiene menor actividad anti-tirosinasa, aunque estas diferencias no son significativas. Las cepas Daizo y Sejaku green BG también resultaron efectivas, con porcentajes de actividad superiores al 75%. En cuanto a la influencia de la alimentación de los gusanos en la propiedad antioxidante de la sericina, los resultados no muestran una relación concreta entre estos aspectos. La cepa Rosa presentó una actividad anti-tirosinasa muy baja, menor al 10%. Esto indica que los pigmentos que generan color en el capullo no son los responsables de la totalidad de la actividad antioxidante.

4.2.3.3. Neutralización de especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte de la sericina

La toxicidad del O_2 está relacionada con la formación de las especies de oxígeno reactivas, las cuales tienen mayor reactividad que éste en su estado basal de triplete. Entre ellas se encuentran las especies que son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , es decir, el oxígeno atómico,

el ozono y el oxígeno en singlete; y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Torres, 2002). Todas estas especies pueden ocasionar un daño o estrés oxidativo.

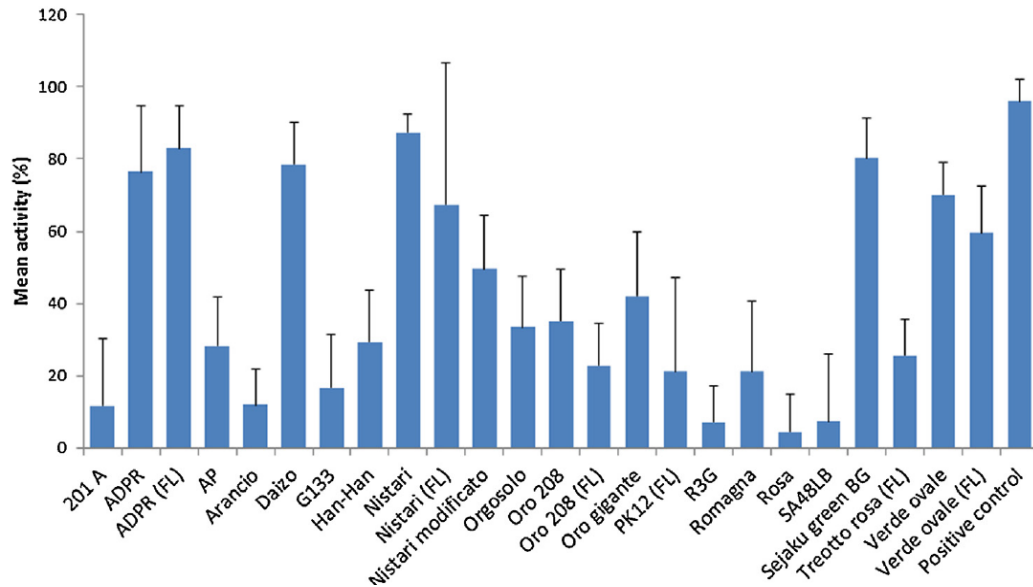


Figura 8. Se utiliza arbutina (derivado de hidroquinona) como control positivo, considerando este valor como 100% de actividad anti-tirosinasa. Las cepas alimentadas con hojas de morera (alimentación natural) se indican como FL. Fuente: Chlapanidas, 2013.

El estrés oxidativo se ha definido como la exposición de las células a un desequilibrio entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Esto trae como consecuencia alteraciones en la estructura y función de cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado. Los antioxidantes son los responsables de eliminar las especies químicas reactivas, los cuales se pueden encontrar en déficit por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Justo & Gutiérrez, 2002).

Existen compuestos que tienen acción antioxidante neutralizando estas especies reactivas del oxígeno. Chlapanidas *et al.* (2013), ensayaron este potencial en la sericina. El estudio fue realizado a partir de muestras de sericina de 20 cepas, detalladas anteriormente en la publicación del mismo autor. En la Figura 9 se observan los resultados obtenidos. Las cepas con mayor actividad en neutralizar las especies activas de oxígeno fueron *Nistari*, *Nistari (FL)*, *ADPR*, *ADPR (FL)*, *Verde Ovale*, *Verde Ovale (FL)* y *Sejaku Green BG*. Estos resultados coinciden con los observados en las pruebas de actividad anti-tirosinasa.

4.2.4 Actividad antioxidante en sistemas biológicos *in vitro*

Se han utilizado animales para evaluar los efectos de la sericina en sistemas biológicos. En la mayor parte de las publicaciones se trabaja con ratones, aunque también se ha ensayado su actividad como cicatrizante en conejos y en líneas celulares felinas. A continuación, se ampliará sobre la actividad antioxidante de la sericina reportada en sistemas biológicos celulares.

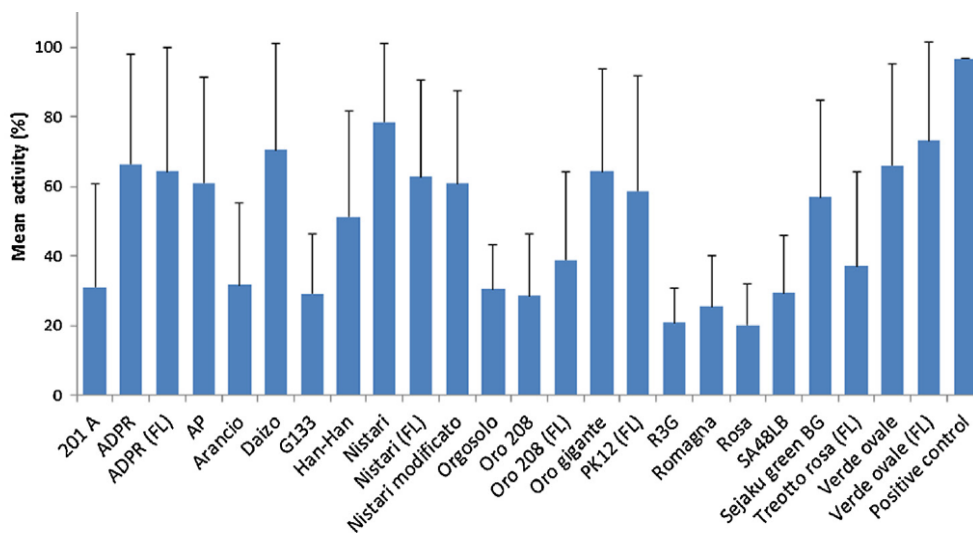


Figura 9. Medición de la actividad de neutralización de especies reactivas de oxígenos (ROS). Las cepas alimentadas con hojas de morera (alimentación natural) se indican como FL. Como control positivo se utilizó ácido ascórbico. Fuente: Chlapanidas, 2013.

4.2.4.1 Estrés oxidativo y el efecto de la sericina en el cáncer de colon

La sericina es una proteína resistente a la acción de las proteasas del cuerpo humano, llegando intacta al colon. Por esta característica, se investigó su relación con el cáncer de colon, y se descubrió que la ingesta de sericina posee efectos positivos en la prevención de tumores colónicos. No obstante, no hay estudios que prueben este efecto con sericina hidrolizada. Zhaorigetu *et al.* (2001) investigaron acerca de este comportamiento en las células del colon y la relación con la acción antioxidante de la sericina en estas células.

El efecto de la sericina en el tratamiento de cáncer de colon se estudió en un grupo de ratas con cáncer del colon inducido mediante agentes cancerígenos. Durante una semana los animales fueron alimentados con una dieta con 30 g/kg de sericina y otro grupo con la misma cantidad pero de caseína, siendo esta última el control negativo. Al finalizar el ensayo extirparon y examinaron el colon de los animales a nivel histológico, estudiando la proliferación celular, la expresión de proteínas *c-myc* y *c-fos*, y marcadores del estrés oxidativo del colon. Las células cancerígenas

fueron detectadas mediante tinciones específicas con 5-bromo-2deoxiuridina (BrdU). Se halló que en el grupo alimentado con sericina la incidencia de cáncer de colon se redujo notablemente (Zhaorigetu *et al.*, 2001).

Para medir el estrés oxidativo en la mucosa del colon se utilizaron marcadores específicos, 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) y 4-hidroxinonenal, los cuales miden aldehídos procedentes de la lipoperoxidación hidroxinonenal (Gastell, 2000). Se halló una disminución importante del marcador utilizado en las muestras provenientes de animales alimentados con sericina. Zhaorigetu *et al.* (2001) sugieren que la peroxidación de radicales libres está involucrada en el desarrollo de tumores del colon, ya que estos radicales intervienen con las bases nitrogenadas del ADN. En la Tabla 6 se observan los resultados obtenidos.

Tabla 6. Efecto positivo de la sericina en la protección contra el cáncer de colon y el potencial antioxidante en las células del colon, se observa una disminución en el % de células proliferativas y el estrés oxidativo en células tratadas con sericina.

Células proliferativas % (mediante tinción BrdU)	Control	Sericina
Recto	8.03 ± 0.42	6.15 ± 0.34
Colon distal	8.19 ± 0.40	6.56 ± 0.31
Colon proximal	7.45 ± 0.26	4.98 ± 0.35
Totales en colon	7.92 ± 0.29	5.94 ± 0.32
Estrés oxidativo en células % (mediante marcador 8-OHdG)	Control	Sericina
Recto	7.10 ± 0.51	4.56 ± 0.30
Colon distal	7.19 ± 0.55	4.83 ± 0.30
Colon proximal	5.50 ± 0.50	3.32 ± 0.21
Totales en colon	6.58 ± 0.51	4.24 ± 0.24

Adaptada de Zhaorigetu, 2001.

4.2.4.2 Efecto de la sericina en el estrés oxidativo en tejidos con daño celular inducido

Las células epidérmicas están en permanente contacto con el oxígeno y frecuentemente expuestas a las radiaciones solares, resultando en una alta producción de ROS y por lo tanto mayor incidencia al desarrollo de cáncer de piel (Zhaorigetu *et al.* 2003). Debido a la relación existente entre daño oxidativo y las enfermedades cancerígenas, algunos autores como Zhaorigetu *et al.* (2002) y Dash *et al.* (2008), han investigado la actividad antioxidante de la sericina en éste tipo de células mediante su acción en la reducción del estrés oxidativo causado por las ROS.

Zhaorigetu *et al.* (2002) evaluó el efecto de la aplicación tópica de sericina en la piel de ratones, con tumores epidérmicos inducidos mediante agentes químicos cancerígenos. Se trabajaron con grupos de 16 ratones, y concentraciones de 2,5 y 5,0 mg de sericina, las cuales fueron disueltas en

0,2 ml de acetona para su posterior aplicación. Se evaluó el desarrollo de tumores epidérmicos durante 20 semanas, comparando con un grupo control, al cual no se trató con sericina. En los resultados expuestos en la Figura 10A se observa una diferencia notable entre los distintos grupos.

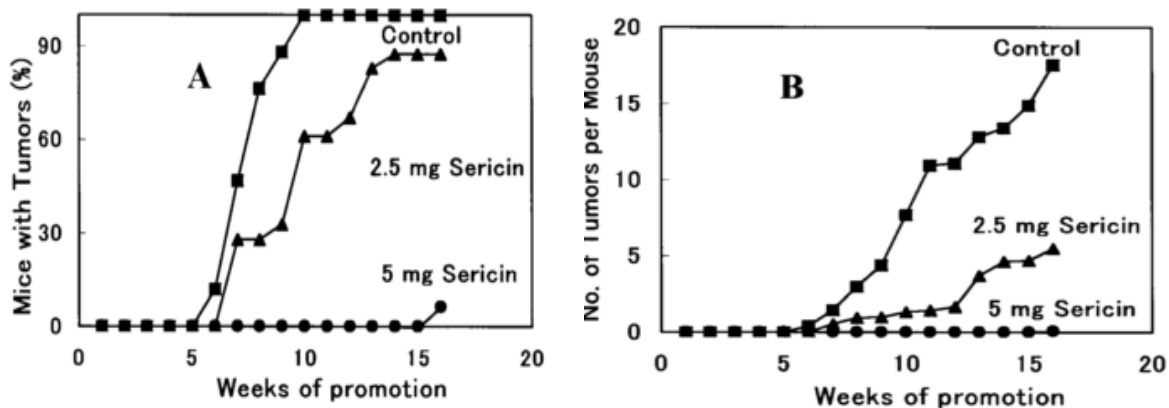


Figura 10. A) Porcentaje de ratones que desarrollaron tumores luego de administrarles dosis de 2,5 y 5 mg/kg de sericina y ser expuestos a agentes promotores de cáncer de piel. B) Multiplicidad tumoral al cabo de las 20 semanas de observación. Fuente: Zhaorigetu, 2002.

En los grupos control, el porcentaje de los ratones que desarrollaron tumores fue casi del 100% en la sexta semana de observación, a diferencia de los ratones a los cuales se les administró 5 mg de sericina, el porcentaje fue menor al 10% en la semana 16, luego de haber sido expuestos a los agentes cancerígenos. El número de tumores en cada ratón también fue notablemente mayor en el grupo control, alcanzando hasta los 19 tumores (Figura 10B). En los ratones que recibieron dosis de 2,5 mg el número de tumores por ratón fue aproximadamente de 6 a las 15 semanas, en cambio, en aquellos con dosis de 5 mg no se evidenció multiplicidad tumoral (Zhaorigetu et al., 2003). Estos hallazgos sugieren que la sericina tiene actividad supresora en la tumorigénesis de piel, inducida por productos químicos y radiación UV, reduciendo el estrés oxidativo.

Aunque en estos casos se evalúa la acción antioxidante mediante la aplicación tópica de la sericina, con una futura aplicación más orientada al desarrollo de productos medicinales que alimenticios, con el fin de observar el potencial antioxidante de la sericina en este ensayo, ya que las especies ROS son de la misma naturaleza, independientemente del tejido en donde se produzcan, o de la fuente que las ocasionen.

Dash *et al.* (2008), también estudiaron el efecto de la sericina en el estrés oxidativo en líneas celulares de fibroblastos felinos, causado específicamente por el peróxido de hidrógeno, el cual pertenece al grupo de ROS. Se trabajó con sericina aislada de las especies de gusano *Bombix mori* y *Antheraea mylitta*, la cual no se alimenta de hojas de morera. Se evaluó la actividad antioxidante

de la sericina en los fibroblastos dérmicos. A un grupo se le realizó un pre-tratamiento con sericina, con concentraciones de 5 a 150 ng de sericina/mg de tejido, y otro grupo se pre-trató con 150 ng/mg de gelatina como proteína control, durante 24 horas. Ambos grupos fueron expuestos a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno para provocar el estrés oxidativo. Un último grupo (control) no se lo expuso al estrés oxidativo ni fue sometido a pre-tratamiento alguno. Se midió la viabilidad celular en todos los grupos y la concentración de enzimas catalasa y lactato deshidrogenasa (LDH), ambas involucradas en la protección celular contra el estrés oxidativo (Dash, Acharya, Bindu, & Kundu, 2008). También se midió la concentración de malondialdehído (MDA), obtenida mediante el ensayo TBARS, para cuantificar productos ocasionados por peroxidación lipídica (Dash et al., 2008).

Los resultados de viabilidad celular se exponen en la Figura 11. En la misma, se observa cómo aumenta la proporción de células sobrevivientes al daño causado por el peróxido de hidrógeno a medida que aumenta la concentración de sericina con la que fueron tratadas, siendo más notable este aumento en la especie *Antheraea mylitta*.

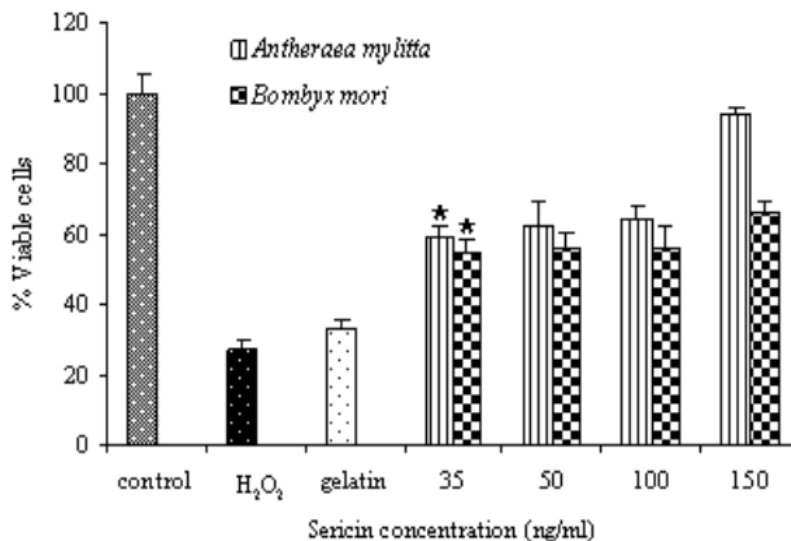


Figura 11. Porcentaje de células viables de fibroblastos dérmicos felinos luego de exponerlas a 0,5mM de peróxido de hidrógeno durante 24 horas, con excepción del grupo control. Previamente fueron tratadas durante 24 horas con gelatina y otras con concentraciones crecientes de sericina de seda de dos especies distintas de gusano. Fuente: Dash, 2008.

En la Figura 12 se exponen los niveles del compuesto MDA, y de las enzimas LDH y catalasa hallados en las líneas celulares expuestas al peróxido de hidrógeno. Se observa cómo la sericina extraída de la especie *Antheraea mylitta*, que fue la que mostró mayores diferencias en el ensayo de viabilidad celular, atenúa en gran medida los niveles de la enzima catalasa, cuya función es

catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, y también los niveles de MDA, acercándose ambos a los niveles obtenidos con el grupo control. El porcentaje de la enzima LDH de las células sometidas a estrés oxidativo se incrementó significativamente en comparación con el grupo control. La aceleración de la vía metabólica anaeróbica para afrontar el estrés oxidativo es reflejada por un incremento en la actividad de la enzima LDH, por lo tanto la medición de esta enzima es un indicativo del daño existente.

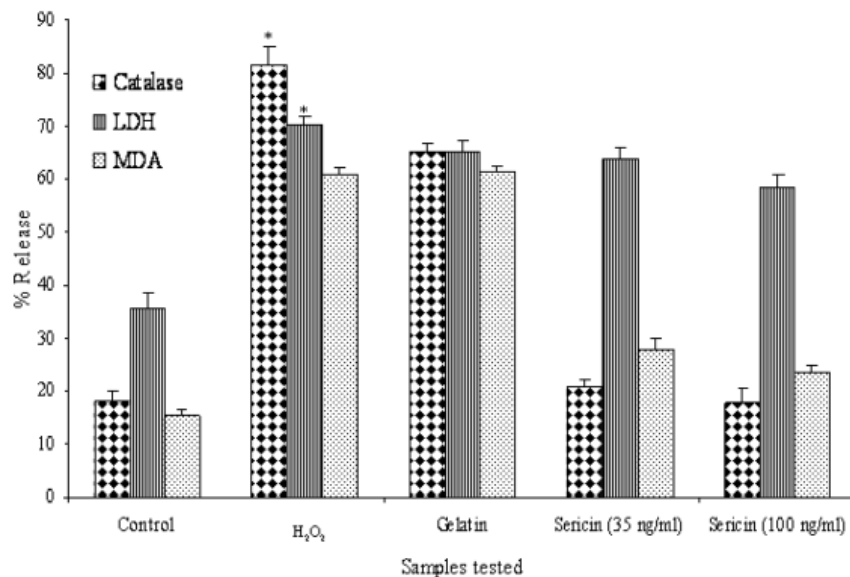


Figura 12. Efecto de la sericina extraída de *Antheraea mylitta* en líneas celulares de fibroblastos sometidas a daño oxidativo mediante la exposición a 0,5 mM de peróxido de hidrógeno durante 24 horas. Se midieron los niveles de LDH, MDA y catalasa comparando con un grupo control. Fuente: Dash, 2008.

Este estudio indica que la sericina podría proporcionar un efecto protector sobre fibroblastos al actuar como antioxidante mediante la reducción de la peroxidación lipídica, así como también, mediante la promoción de enzimas antioxidantes en sistemas endógenos *in vitro*.

4.2 Biopéptidos a partir de sericina

La función de las proteínas como compuestos activos en la dieta está siendo cada vez más estudiada. En los últimos años se han reconocido numerosas proteínas dietarias que constituyen una fuente valiosa de péptidos biológicos activos, llamados biopéptidos (Korhonen & Pihlanto, 2006).

4.3.1 Los biopéptidos

Los biopéptidos se definen como fragmentos específicos de una proteína que posee efectos beneficiosos en el cuerpo humano al ser ingerida, además de su aporte nutricional (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Los biopéptidos se encuentran inactivos dentro de su secuencia proteínica original y pueden ser liberados de 3 formas:

- a) A través de la hidrólisis por enzimas digestivas
- b) Mediante la hidrólisis por microorganismos proteolíticos
- c) A través de la acción de enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas

Los péptidos fisiológicamente activos se pueden producir en el interior del cuerpo humano, durante la digestión gastrointestinal y la fermentación con bacterias ácido lácticas, a partir de algunas proteínas presentes en productos lácteos, tales como la lactoferrina, lactoquinina o derivadas de la hidrólisis de la soya, entre otras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de cada proteína, su ingesta oral afecta de manera positiva al sistema digestivo, cardiovascular, inmune o nervioso. Debido a esto, los biopéptidos dietarios son promotores de la salud humana reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas y estimulando al sistema inmune. En la Tabla 7 se resumen los tipos de biopéptidos y el sistema del cuerpo humano en el cual actúa (Guerrero & Betancur Ancona, 2008).

Tabla 7. Biopéptidos y su efecto positivo en el organismo

Biopéptidos	Efecto beneficioso
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del tránsito intestinal	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Reguladores de la proliferación intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos

Fuente: Chel Guerrero, Betancur Ancona, 2008.

4.3.2 Actividad antioxidante de biopéptidos de sericina

Los pequeños péptidos se absorben de manera más eficiente que las proteínas a través de la membrana de la mucosa intestinal. Por este motivo, Wu *et al.* (2008) estudiaron la hidrólisis enzimática de la sericina para obtener péptidos bioactivos, para mejorar así los efectos funcionales y nutricionales de esta proteína en el organismo. Se investigó la actividad antioxidante luego de la hidrólisis con diferentes proteasas de grado alimenticio, midiendo la actividad quelante del ion hierro y la actividad anti-tirosinasa (Wu *et al.*, 2008), con el fin de establecer condiciones óptimas para la hidrólisis y establecer comparaciones con la sericina nativa y la sericina hidrolizada.

Para analizar los resultados de la actividad antioxidante en general, es muy importante tener en cuenta las condiciones de extracción de la muestra de sericina. Por este motivo, es difícil, y no resulta válido comparar los resultados numéricos entre diversos autores. La manera más aceptable es considerar las condiciones de las muestras de las cuales se parten, y establecer comparaciones mediante los controles utilizados por cada autor.

En el estudio realizado por Wu *et al.* (2008) la muestra de sericina fue obtenida a partir del agua de desgomado de una industria de seda de China, mediante el tratamiento con alta presión y temperatura. La hidrólisis se llevó a cabo en un pH alcalino de 8,4; a una temperatura de 43,97 °C y manejando una proporción enzima/sustrato de 3/1 (w/w). Con respecto a la composición de aminoácidos se halló una cantidad mayor al 30% de serina y treonina y la distribución del peso molecular fue de 250-400 kDa. En cuanto a las proteasas ensayadas, la proteasa P, proveniente de *Aspergillus mellus* fue la que demostró mejores resultados.

- *Determinación de la actividad quelante del ión hierro*

En la metodología empleada se utiliza ferrocina en una reacción colorimétrica. El Fe²⁺ forma un complejo con ferrocina de color púrpura que tiene una absorbancia máxima a 562 nm. En presencia de un antioxidante, sericina en este caso, el Fe²⁺ puede quelarse y la intensidad del color púrpura del complejo con ferrocina disminuye proporcionalmente a la concentración del antioxidante en la muestra de interés (Serrano *et al.*, 2011). Mediante la Ecuación 2, que se describe a continuación, se cuantifica la actividad quelante:

$$\text{Actividad quelante del ión de hierro (\%)}, IC_{50} = 1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

La medida de la actividad quelante se representa como IC₅₀, esto indica la concentración de sericina hidrolizada (SH) que causa una disminución de la actividad quelante del hierro en un 50%, es decir, cuanto menor es el valor de IC₅₀, mayor es la actividad quelante del hierro. Los resultados obtenidos por Wu *et al.* (2008), mostraron que la capacidad antioxidante no está relacionada con el grado de hidrólisis de los biopéptidos, sino que está involucrada con el tipo de proteasa que se utiliza, específicamente en la secuencia que escinde a la proteína (ver Tabla 8). Aunque en este ensayo de actividad quelante no se trabajó con muestras de sericina sin hidrolizar, según los

resultados obtenidos en cuanto a la actividad antioxidante, expresada como IC_{50} , los autores sugieren que la hidrólisis enzimática de la sericina podría aumentar la actividad antioxidante de la muestra nativa, debido a que puede incrementar su capacidad de ligarse al ión metálico involucrado en la funcionabilidad de la enzima tirosinasa (Wu *et al.*, 2008). No obstante, al comparar la SH con el EDTA, un importante quelador de metales, la actividad de SH es menor (ver Figura 13).

Tabla 8. Actividad quelante del ión hierro según las distintas proteasas utilizadas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Proteasas	Grado de hidrólisis (%)	IC50 (mg/ml)
As 1,398	22.23 ± 0.47	1.37 ± 0.02
Alcalasa	20.00 ± 0.28	no se halló actividad
Proteasa P	13.42 ± 0.30	0.19 ± 0.02
Proteasa N	11.80 ± 0.71	1.79 ± 0.05
Neutrasa	10.04 ± 0.58	4.42 ± 0.34

Fuente: Adaptado de Wu, 2008.

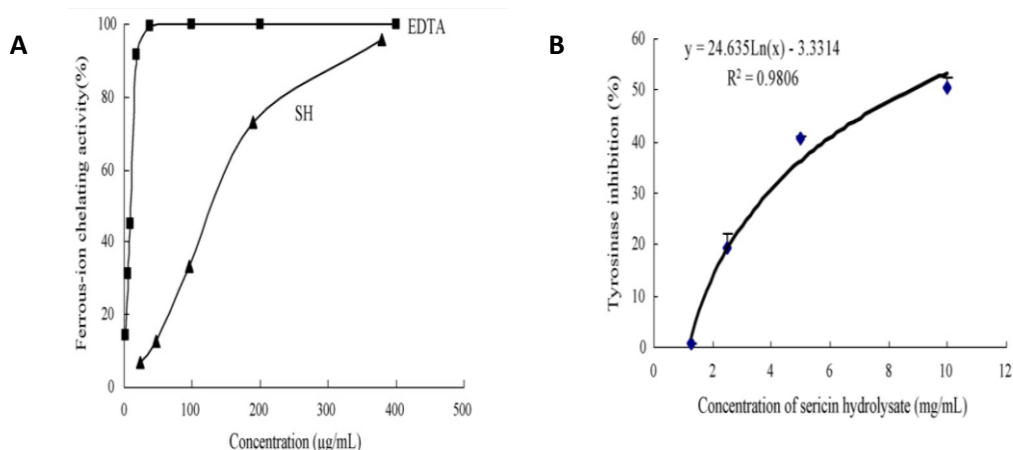


Figura 13 A) Actividad quelante del ión hierro según distintas concentraciones de SH, se utiliza EDTA como control positivo. B) Actividad anti-tirosinasa frente a diferentes concentraciones SH con proteasa P. Fuente: Adaptado de Wu, 2008.

- *Determinación de la actividad anti-tirosinasa*

El método utilizado fue el mismo que se describió anteriormente, en la sección 4.2.2, para medir esta actividad. Se halló que la hidrólisis con la proteasa P, es la que presenta mejores resultados en cuanto a la actividad antioxidante. El efecto inhibitorio de la tirosinasa con SH fue notable y aumenta proporcional al aumento de la concentración. Con 10 mg/ml la actividad anti-tirosinasa fue mayor al 50%. Debido a esto, la SH puede ser considerada un importante antioxidante, ya sea

para el organismo humano o para la conservación de alimentos, evidenciando mayor actividad antioxidante que la sericina nativa (Wu *et al.*, 2008).

En otro ensayo realizado por Jin-Bo Fan *et al.* (2010) se evaluó la capacidad antioxidante de la sericina hidrolizada con distintas enzimas como alcalasas, tripsinas, neutrasas, bromelina y papaína. Mediante espectrofotometría se midió la actividad antioxidante, incluyendo la peroxidación lipídica, el poder reductor, y la capacidad quelante del ión de hierro frente a los radicales sintéticos DPPH y ABTS. Los resultados indicaron que las proteasas utilizadas en la hidrólisis influyen en el potencial antioxidante de los biopéptidos de sericina, siendo la muestra procesada con la enzima alcalasa la que evidenció mejor actividad (Jin-Bo *et al.*, 2010).

4.4 Otras aplicaciones de la sericina en el área de alimentos

Además de la actividad antioxidante descrita, la sericina posee otros beneficios dentro del área alimenticia. Su composición aminoacídica le confiere características hidrofílicas, capacidad para retener agua, resistencia frente a enzimas digestivas y capacidad quelante. Estas propiedades conllevan a estudiar la sericina como prebiótico, su efecto en la constipación y su influencia en la absorción de nutrientes a través del tracto intestinal.

4.4.1 Efectos en la constipación

La constipación o estreñimiento es una condición que consiste en la falta de movimiento regular del intestino, lo que produce una defecación infrecuente o con esfuerzo. Es un síntoma gastrointestinal común que se presenta entre el 2 y 20% de la población (Remes-Troche, 2005).

A causa de la gran cantidad de aminoácidos hidrofílicos, la sericina posee capacidad de retener agua, esta característica y el no ser digerible en el tracto intestinal, la posicionan como candidata para el tratamiento de la constipación.

Sasaki *et al.* (2000) evaluaron el efecto de la sericina suministrada como suplemento dietario en ratas contra la constipación inducida por atropina (fármaco con efectos anticolinérgicos). Para comprobar la degradabilidad de la sericina en el tracto digestivo, se incubó a ésta con enzimas digestivas, propias del organismo, y se midieron los grupos amino libres con el transcurso de las horas. Se halló una cantidad notablemente menor de grupos amino libres en la sericina al compararla con la caseína, ésta última utilizada como control (Figura 14). Esto indica que la sericina no es digerible por las enzimas pepsina y pancreatina.

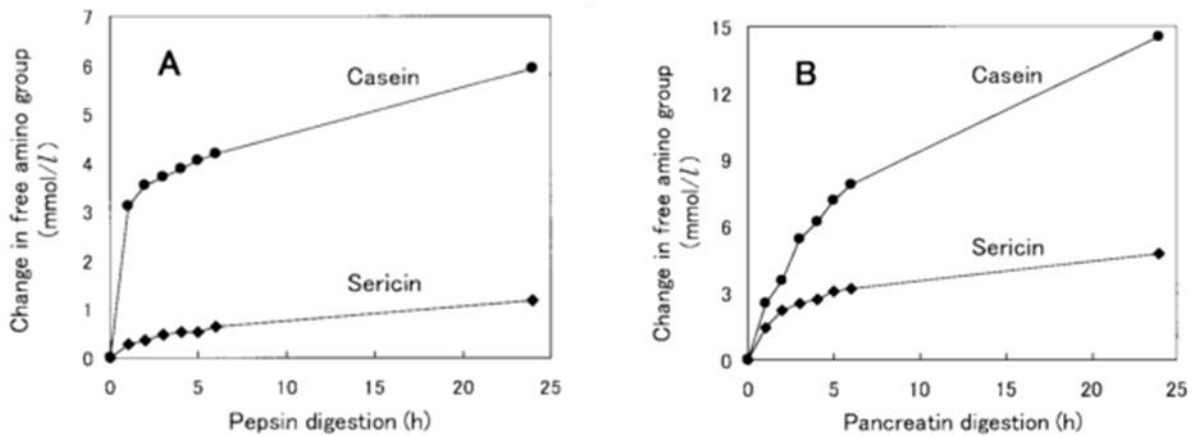


Figura 14. Cantidad de grupos amino libres frente a la incubación con enzimas A) Pepsina, B) Pancreatinina, como medida indirecta de la digestión de la sericina por parte de estas enzimas. Fuente: Sasaki, 2000.

Para evaluar el efecto del consumo de sericina en la constipación, se midió el peso seco de las heces de los ratones y el contenido de agua en éstas. Se obtuvieron resultados positivos en el grupo de ratones alimentados con 4% de sericina, frente a los animales de grupo control, alimentados con otra proteína de fácil digestión, como la caseína. Se halló una mayor cantidad de agua en las heces del grupo alimentado con sericina. Esta información sugiere otro efecto positivo de la sericina en el organismo, atribuido a la incorporación de esta proteína como un ingrediente para la formulación de un alimento funcional (Masahiro *et al.*, 2000).

4.4.2 Función prebiótica

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta. Producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las cuales tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero. También se ha hallado que estos compuestos elevan la concentración de inmunoglobulinas A y mucinas, compuestos que funcionan como barrera protectora en el intestino (Patel & Goyal, 2012).

Okazaki *et al.* (2011) evaluaron los efectos del consumo de sericina en el lumen intestinal de un grupo de ratones, incluyendo la microflora, mucinas e inmunoglobulinas. Se halló que el grupo de ratones alimentado con una dieta alta en grasas y suplementada con sericina, evidenció un aumento en los niveles de estos compuestos y los ácidos grasos orgánicos. Estos últimos están asociados con un bajo riesgo de cáncer de colon (Okazaki *et al.*, 2011).

4.4.3 Aumento en la absorción de minerales

El alto contenido de ácido aspártico en la sericina, así como de serina, sugiere que esta proteína puede tener una fuerte afinidad por algunos compuestos mediante la quelación de su grupo hidroxilo o carboxilo. Sasaki *et al.* (2000) investigó en ratones el efecto del consumo de sericina en la absorción de algunos minerales como zinc, hierro, magnesio y calcio.

En el ensayo se alimentó a un grupo de ratones con cantidades conocidas de Zn, Fe, Mg, Ca y sericina (30 g/kg). Paralelamente se trabajó con un grupo control, al cual no se le suministró la proteína de estudio. Se analizó la concentración de los minerales en las heces para analizar variaciones en la absorción intestinal de los mismos. Al comparar con el control, se encontraron menores cantidades de estos minerales en las heces correspondientes al grupo alimentado con sericina, mientras que se hallaron mayores concentraciones de estos en la sangre (suero plasmático). En la Tabla 9 se detallan los resultados obtenidos (Sasaki *et al.*, 2000). Los mismos sugieren que la sericina tiene un efecto positivo en la absorción de minerales, siendo ésta otra cualidad que contribuye con el potencial de la sericina para ser usada como ingrediente para alimentos funcionales.

Tabla 9. Efecto del consumo de sericina en la absorción de minerales en ratones.

	Mineral (mmol)	Control	Sericina
Mg	en heces	0.39 ± 0.03	0.27 ± 0.02
	en sangre	0.77 ± 0.02	0.82 ± 0.04
Ca	en heces	2.60 ± 0.11	2.05 ± 0.17
	en sangre	2.84 ± 0.04	2.86 ± 0.05
Zn	en heces	15.2 ± 0.08	12.4 ± 0.09
	en sangre	23.6 ± 1.2	24.4 ± 1.0
Fe	en heces	30.9 ± 1.8	26.6 ± 2.2
	en sangre	27.3 ± 1.7	28.8 ± 1.6

Fuente: Adaptado de Sasaki, 2000.

4.4.4 La sericina como conservante de alimentos

Además de los efectos positivos en el organismo sugeridos del por el consumo de sericina, esta proteína podría tener una aplicación en el área de alimentos como aditivo alimentario, específicamente como conservante, ya que los alimentos pueden ser alterados por diferentes géneros bacterianos y a su vez, pueden servir como vehículo de patógenos. Además, se sabe que los procesos oxidativos deterioran los alimentos, causando rancidez y pérdida de nutrientes. La sericina puede retrasar estos procesos debido a su actividad antimicrobiana y antioxidante, esta última fue explicado con mayor detalle en las secciones 4.2.3.1 y 4.2.3.2.

Se ha reportado por varios autores que la sericina posee también propiedades antibacterianas. En un ensayo realizado por Sarovart *et al.* (2003), se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (20, 15 y 10%) de sericina, extraída de tres cepas distintas (A, B y C), en el crecimiento de *Micrococcus*. Este género bacteriano ocasiona alteraciones a productos cárnicos debido a la desnaturalización de ciertas proteínas de la carne mediante la producción de ácidos. Además de esta capacidad proteolítica; pueden producir pigmentaciones y coloraciones anormales en la superficie de los alimentos, afectando su calidad (Rodríguez Gomez, 2010). Teniendo en cuenta la resistencia de algunas especies a las técnicas de conservación empleadas, por ejemplo el uso de salmueras, donde algunas especies toleran concentraciones elevadas de sal; es interesante investigar acerca de la inhibición del crecimiento de esta bacteria en los alimentos mediante el uso alternativo de productos de origen natural.

En la Figura 15 se observan los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición bacteriana. La actividad antibacteriana alcanza el 70% de inhibición con una concentración de 20% de sericina. No se apreciaron diferencias significantes entre las muestras de sericina extraídas de las tres cepas, no obstante si se evidenció que a mayor concentración de esta proteína, el efecto antibacteriano aumenta (Sarovart, et al., 2003).

Otros autores como Jassim & Alsaree (2010), evaluaron la actividad antimicrobiana de la sericina, trabajando con cepas patológicas como *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli*. El número de colonias de dichas cepas del cultivo tratado con 2% de sericina disminuyó hasta un 85 % (Jassim & Alsaree, 2010).

En base a lo expuesto, se puede decir que la sericina podría actuar como conservante en alimentos mediante dos mecanismos distintos: retrasando los procesos oxidativos e inhibiendo el crecimiento de bacterias del género *Micrococcus*. Dichos autores reportaron hasta una disminución del 85% en el número de colonias luego del tratamiento con sericina.

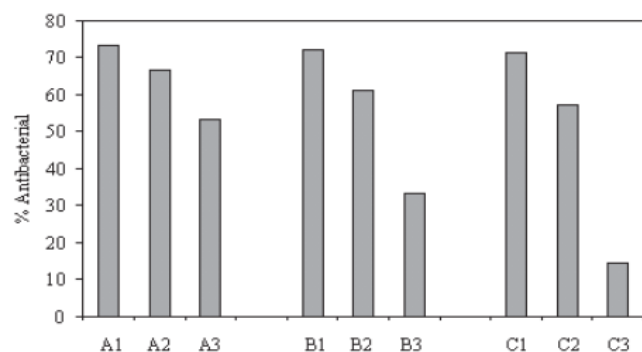


Figura 15. Efecto antibacteriano de la sericina proveniente de A: *Dok Bua*, B: *Nang Noi*, C: *Jul*. Los números 1, 2 y 3 corresponden a las distintas concentraciones de la sericina (20%, 15% y 10%). Fuente: Sarovart, 2003.

5. LA SERICINA Y LA REGULACIÓN ALIMENTARIA

5.1 Regulación de alimentos funcionales (*Codex Alimentarius*)

El *Codex Alimentarius* es un programa conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y La Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), que se encarga de establecer normas alimentarias. Debido a su importancia en el comercio internacional, muchos de los países que están desarrollando nuevas legislaciones utilizan a menudo como base las normas del *Codex*. El debate de los alimentos funcionales en el *Codex* se encuentra en su etapa inicial y los principales temas de discusión, antes de llegar a un consenso, son las alegaciones en cuanto a la reducción del riesgo de padecer enfermedades, la necesidad de verificación científica y el etiquetado (EUFIC, 2006).

5.1.1 Regulación a nivel mundial

En el *Codex Alimentarius* no se ha definido a los alimentos funcionales como una categoría, sin embargo, se encuentran en vigencia, desde 2004, lineamientos aplicables a las alegaciones de salud, las cuales se aplican a todos los alimentos y profundizan sobre la comunicación de las propiedades, distinguiendo declaraciones nutricionales y declaraciones higiénicas. Las declaraciones higiénicas se refieren a representaciones que establecen, sugieren o implican la relación existente entre un alimento o componente del alimento y la salud de los consumidores.

Analizando cada país o mercado económico común en particular, se puede decir que Japón, por ser el precursor de los alimentos funcionales o FOSHU (*Foods for Specified Health Use*), posee una legislación que data de 1991. Dicha normativa permite un número limitado de declaraciones de propiedades higiénicas, previa aprobación del Ministerio de Sanidad sobre bases científicas. La cantidad de alimentos funcionales permitidos demuestra un notable aumento: en noviembre de 1998 existían 126 alimentos funcionales autorizados, mientras que en julio de 2006 el número ascendía a 586, divididos en 7 categorías:

- 1) Alimentos que regulan las condiciones gastrointestinales
- 2) Alimentos que ayudan a regular los niveles de colesterol
- 3) Alimentos que ayudan a regular la presión arterial alta
- 4) Alimentos que ayudan a regular los niveles elevados de la glucosa en la sangre
- 5) Alimentos que mejoran la absorción de minerales
- 6) Alimentos que mantienen la salud de dientes y huesos
- 7) Alimentos que reducen los niveles de triglicéridos en sangre

En el Reino Unido de Gran Bretaña funciona el *Advisory Committee on Novel Foods and Processes*, ACNFP (Comité Consultivo sobre Nuevos Alimentos y Procesos), un cuerpo independiente de científicos expertos que asesora a la *Food Standards Agency* -FSA-, departamento encargado de proteger los intereses del consumidor en relación a normas y seguridad alimentaria que representa a Gran Bretaña en la UE (Olagnero *et al.*, 2007). Como “*Novel Foods*” han sido autorizados, entre otros, un aceite rico en ácido docosahexaenoico (DHA) y leche, yogur y margarinas con agregado de ésteres de fitoesteroles. Además existe una amplia lista de alimentos, ingredientes y/o procesos en evaluación o espera de la notificación (*Food Standards Agency*, 2006).

En Europa, el *Functional Food Science in Europe* -FUSOSE- se propuso como objetivo alcanzar un consenso en cuanto al uso de alimentos funcionales basado en la evidencia científica. Se concluyó que sus efectos beneficiosos deben alcanzarse con las cantidades que habitualmente se consumen en una dieta convencional. Se han propuestos dos tipos de alegaciones sanitarias, tipo A: promotores de una o más funciones; y tipo B: reducción del riesgo de enfermedades. En Europa solo se admiten alegaciones científicamente probadas y encaminadas a la prevención (Silveira *et al.*, 2003).

5.1.2 Regulación en Colombia

En Colombia, los alimentos funcionales son aún un mercado incipiente con grandes posibilidades de crecimiento. Según la Base de Datos Global de Nuevos Productos- GNPD, el lanzamiento de esta clase de alimentos en los últimos años ha estado asociado al aumento en la concentración de un componente con beneficios para la salud, y la eliminación o disminución de compuestos que restringen el consumo del alimento (como grasas).

Legalmente no existe aún una normativa que defina y regularice la producción, verificación científica de las propiedades saludables, desarrollo tecnológico y comercialización de los alimentos funcionales. Sin embargo, algunas normas establecidas regulan alimentos con propiedades adicionales para la salud, por ejemplo: el Decreto N° 1944 de 1996, reglamenta la fortificación obligatoria de la harina de trigo con vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido fólico y hierro; la Resolución N° 11961 de 1989 de la leche cultivada con *Bifidobacterium*; la Resolución N° 11488 de 1984 que precisa las normas técnicas relacionadas con alimentos infantiles, alimentos o bebidas enriquecidas y alimentos o bebidas de uso dietético, en los cuales se permite la adición de nutrientes y la denominación de fortificados; el Decreto 3636 de noviembre de 2005 por el cual se reglamentan los productos de uso específico, incluidos los productos importados con denominación del país de origen como “suplemento dietario”, “complemento alimenticio”, o “nutracéutico” (Rubiano, 2006).

Al comparar el desarrollo de alimentos funcionales en Colombia con otros países, se observa que aún se tiene un amplio camino por recorrer y que existe un sin número de posibilidades para la generación de alimentos funcionales innovadores. Para ello se debe tener claridad sobre las barreras, oportunidades y responsabilidades por afrontar, para que en un futuro cercano la canasta básica, además de satisfacer necesidades fisiológicas, mejore también el estado de salud de los consumidores (Naranjo & Vanegas, 2011).

Debido a la falta de una normativa concreta en cuanto a los ingredientes permitidos para el desarrollo de alimentos funcionales, ya sea a nivel mundial o nacional, es difícil que un alimento suplementado con sericina sea aprobado por el organismo correspondiente de cada nación. Podría ser más factible incluir en la dieta a la sericina a modo de suplemento dietario.

Considerar a la sericina como posible suplemento dietario quizás sea el primer paso para incorporarla a la industria alimentaria. En Colombia, el decreto 3249 del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos- INVIMA, define al suplemento dietario como *“aquel producto cuyo propósito es adicionar la dieta normal y que es fuente concentrada de nutrientes y otras sustancias con efecto fisiológico o nutricional que puede contener vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos, otros nutrientes y derivados de nutrientes, plantas, concentrados y extractos de plantas solas o en combinación”*. En el artículo 4 de este decreto, se indica que el estudio sobre aditivos permitidos se hará teniendo en cuenta la reglamentación del *Codex Alimentarius* y las listas de ingredientes, aditivos y sustancias permitidas por la *Food and Drugs Administration- FDA*, y por la *European Food Safety Authority- EFSA*.

Al consultar la base de datos de la FDA, se encontró que en Noviembre de 2001, este organismo aprobó y consideró como inocuo (Generally Recognized as Safe -GRAS) un polvo de proteínas de seda para uso alimenticio. Debido a que la seda está formada principalmente por sericina y fibroína, ambos compuestos de naturaleza proteica, se podría investigar la posibilidad de considerar a la sericina también dentro de esta aprobación, y con ello, su aceptación como ingrediente permitido para su consumo como suplemento dietario.

5.2 Regulación de antioxidantes en alimentos

Los antioxidantes añadidos a alimentos con el fin de evitar su deterioro se consideran *aditivos alimentarios*. Aunque existen muchos antioxidantes, ya sean sintéticos o naturales, sólo unos pocos son aceptados y reconocidos como seguros (GRAS) por los organismos internacionales como la *FAO Y Joint Expert Committee on Food Additives - JECFA*.

Al igual que en el caso de los ingredientes para alimentos funcionales, los estudios toxicológicos son esenciales para determinar la seguridad de cualquier compuesto con actividad antioxidante, así como también especificar el consumo diario permitido del mismo.

Luego de revisar las listas de los antioxidantes permitidos en alimentos por dichos organismos, se observa que la sericina no forma parte de este grupo. Los antioxidantes aprobados por la FAO y las concentraciones máximas permitidas se detallan en la Tabla 10 (Schmidt-Hebbel, 2009).

Tabla 10. Antioxidantes añadidos a alimentos aceptados por la FAO

Antioxidante	Cantidad máxima permitida
Ácido ascórbico	100 mg/kg
Tocoferoles	100 mg/kg
Lecitina	100 mg/kg
Galatos	100 mg/kg
Butilhidroxi-anisol (BHA)	200 mg/kg
Butilhidrquinona terciaria (BHTQ)	200 mg/kg
Citrato de mono-isopropilo	100 mg/kg
Etilendiamino-tetraacetato (EDTA)	250 mg/kg
Sal disódica	250 mg/kg

Fuente: Schmidt-Hebbel, 2009.

Además de estos requerimientos de seguridad en cuanto al consumidor, el antioxidante debe cumplir con otras exigencias como por ejemplo, ser soluble en grasas, no impartir un color extraño, olor o sabor al alimento, ser eficaz durante mínimo un año, a una temperatura de entre 25 y 30° C, debe ser estable a la temperatura de procesamiento del alimento, fácil de incorporar y eficaz a bajas concentraciones (Pokorny *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

A lo largo del trabajo se han abordado aspectos generales de la sericina, su procesamiento y las distintas formas de extracción, para su posterior aprovechamiento en el área alimenticia, teniendo en cuenta principalmente su actividad antioxidante. Entre las principales conclusiones se encuentran:

- La técnica de extracción de la sericina mediante agua caliente (utilizando autoclave) posee importantes ventajas frente a otros métodos, teniendo en cuenta características como su simpleza, bajo costo y calidad del producto extraído. Los métodos que utilicen tecnologías sofisticadas o productos químicos no representan opciones válidas para la obtención de sericina, debido a que el producto deseado debe estar libre de sustancias tóxicas, además de ser conveniente en términos económicos.
- La sericina posee efectos positivos en el organismo que contribuyen a su potencialidad con respecto a su utilización como un ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales. Entre estos efectos, la actividad antioxidante es la más importante.
- Debido a la falta de una regulación concisa a nivel mundial en cuanto a los alimentos funcionales, quizá el primer paso para incorporarlos a la industria alimentaria es considerarlos dentro de la clasificación de suplementos dietarios.
- Teniendo en cuenta que la sericina es obtenida a partir del desgomado de la seda y que actualmente la mayoría de las industrias la desechan, sus propiedades benéficas, por ejemplo su actividad antioxidante, adquieren una mayor valoración a nivel económico y ambiental.
- La sericina puede ser considerada como posible ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales, ya sea en su forma hidrolizada (biopéptidos) o de manera natural. No obstante, es importante investigar la inocuidad de la sericina sin hidrolizar y la estabilidad de la sericina en el alimento a adicionarse.
- Los biopéptidos de sericina presentan una mayor actividad antioxidante que la sericina natural, por lo que son considerados promotores de la salud, por servir tanto como antioxidantes así como suplemento proteico. No obstante, existe escasez de bibliografía de éste tema y se debe profundizar más en los estudios.
- Con respecto a las mediciones de la actividad antioxidante de la sericina, no es posible establecer comparaciones entre los ensayos realizados por distintos autores, ya que ésta se encuentra sujeta al método de extracción, a las condiciones de la muestra, y a las técnicas utilizadas para la medición de la actividad antioxidante.
- Las propiedades antioxidantes de la sericina comentadas son muy importantes a nivel terapéutico, ya que su consumo tiene efectos positivos en la prevención del cáncer de colon, y en otras enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Esto permite tenerla en

cuenta como ingrediente para el desarrollo de alimentos con funciones terapéuticas, beneficiando a quienes la consumen.

- Por otro lado, su efecto antioxidante en la peroxidación de lípidos, la actividad anti-tirosinasa; y su función como conservante, retrasando el deterioro de los alimentos causados por procesos oxidativos, posibilita su uso para evitar el daño de los alimentos. Aun así, se requiere profundizar su estudio para ser considerada como aditivo alimentario por las instituciones reguladoras.
- La temática estudiada en el presente trabajo ha sido trabajada mayoritariamente por los países asiáticos, grandes productores de seda, por lo tanto, gran parte de las publicaciones se encuentran en idiomas no comprendidos, dificultando el acceso a esta información.

RECOMENDACIONES

Continuar investigando la actividad antioxidante de los biopéptidos de sericina, y más aún, sus efectos en el organismo, esto con el fin de aportar información valiosa al estudio de la incorporación de la sericina (ya sea hidrolizada o en su forma nativa) como ingrediente en alimentos, con posibilidades de convertirlos en alimentos funcionales, y a su vez impactar positivamente en la economía y en el medio ambiente.

Conforme a esto, el estudio de la estabilidad de la sericina en el alimento, la realización de estudios clínicos que avalen de manera rigurosa los efectos beneficiosos que se le atribuyen, así como también cumplir con las expectativas de los consumidores y los aspectos de mercado y legislativos son puntos que aún deben desarrollarse.

En cuanto a la regulación alimentaria de los alimentos funcionales, las áreas de Investigación y Desarrollo, requieren énfasis en nutrición y acceso a investigaciones que les permitan tener mayor visión de las posibilidades de esta clase de productos, y así poder formar una entidad sólida que agilice la aprobación y promueva este tipo de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvírez-Morales, A., González Martínez, B., & Jiménez Salas, Z. (2002), Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 3(3).
2. Aramwit, P., Damrongsakkul, S., Kanokpanont, S., & Srichana, T. (2010), *Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 55(2), 91–8.
3. Aramwit, P., Kanokpanont, S., Nakpheng, T., & Srichana, T. (2010), *The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production*. *International journal of molecular sciences*, 11(5), 2200–11.
4. Astoviza Miriam Bolet; Socarrás Suárez María Matilde, *Alimentación adecuada para mejorar la salud y evitar enfermedades crónicas*, 2010, Rev Cubana Med Gen Integr v.26 n.2
5. Bunarsa, S., Promphet, P., & Sutheerawattananonda, M. (2013), *Hematological assessments of sericin-derived oligopeptides in BALB / c mice*, 8(1), 17–21.
6. Capar, G., Aygun, S. S., & Gecit, M. R. (2009), *Separation of sericin from fatty acids towards its recovery from silk degumming wastewaters*, *Journal of Membrane Science*, 342(1-2), 179–189.
7. Castro Duque, F. (1999), *Historia de la producción de seda en Colombia, siglos XIX - XX*.
8. Chavely Restrepa, D., Narvaez- Cuenca, C. E., & Restrepo Sanchez, L. P. (2009), *Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia*. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, 1517-1522, 2009, 32(6), 1517–1522.
9. Cifuentes, A. C., & Sohn Wook, K. (1998), *Manual técnico de sericultura*.
10. Coba, P., Tivi, L. M., & Vidari, G. (2010), *Importance of antioxidant activity and evaluation in ethanol extracts of *Oryctanthus* type*, Centro de Investigación y Valoración para la Biodiversidad CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador, 22–30.
11. Cornish, M. L., & Garbary, D. J. (2011), *Antioxidants from macroalgae : potential applications in human health and nutrition*, *Review Algae* 2010, 1–17.
12. CORNUCOPIA, CYTED. (2004). *Caracterización y evaluación funcional y de seguridad de compuestos bioactivos de frutas iberoamericanas como ingredientes alimentarios*.
13. Cortés, M., Churalt, A., & Puente D., L. (2005), *Alimentos funcionales : una historia con mucho presente y futuro*, 5–14.

14. Creus, E. V. A. G. (2004), Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud, *Ámbito farmacéutico* 23, 80–84.
15. Dash, R., Acharya, C., Bindu, P. C., & Kundu, S. C. (2008), *Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts*, *BMB reports*, 41(3), 236–41.
16. Erosqui Fundación, *Boletín Informativo para el ámbito de la salud* (2013), Metabolismo de las proteínas ; alimentos y aminoácidos esenciales.
17. Freddi, G., Mossotti, R., & Innocenti, R. (2003), *Degumming of silk fabric with several proteases*, *Journal of Biotechnology*, 106(1), 101–112.
18. Gallego, A. S. (2003), *Fibra y prebióticos : conceptos y perspectivas*, *Gastroenterol Hepatol*, 26(Supl.1):6-12 26, 6–12.
19. Gastell, J. P. de A. (2000), *Métodos para medir el daño oxidativo*, *Rev Cubana Médica Militar*, 29(3), 192–198.
20. Guerrero, L., & Betancur Ancona, D. (2008), *Biopéptidos alimenticios: nuevos promotores de la salud*, *Revista Salud Pública y Nutrición*, Vol 9 Num 2.
21. Gupta, D., Agrawal, A., Chaudhary, H., Gulrajani, M., & Gupta, C. (2013). *3-Cleaner process for extraction of sericin using IR*. *Journal of Cleaner Production*, 1-7.
22. Hongbo, Z. (2012). *Building the New Silk Road across the Pacific- Economic and trade relations between China and Latin America after the Financial Crisis in 2008*, *Journal Globalization and competitiveness*, Vol. 6 Num. 1 pp 115-135.
23. Jassim, K. N., & Alsaree, O. J. (2010). *Study of the antimicrobial activity of silk sericin from silkworm bombyx mori* Khalid N Jassim & Omar J Alsaree, 23(April), 130–133.
24. Jin-bo Fan, Li-HongG Zheng' Fang Wang Hui-Yuan Guo' Lu Jiang, Fa-Zheng Ren (2010), *Enzymatic hydrolysis of silk sericin by proteases and antioxidant activities of the hydrolysate*, *Journal of Food Biotechnology*, p. 382–39.
25. Justo, C., & Gutiérrez, R. V. (2002), *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*, 31(2), 126–133.
26. Kato, Sato, Yamanaka, Yamada, N. F. and M. N. (1998). *Silk Protein, Sericin, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity*, *Biosci. Biotechnology. Biochem.* 62 (1) p 145-147.
27. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). *Bioactive peptides: Production and functionality*. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960.

28. Kundu, S. C., Dash, B. C., Dash, R., & Kaplan, D. L. (2008). *Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications*, *Progress in Polymer Science*, 33(10), 998–1012.
29. Londoño, J. L. (2012), *Antioxidantes : importancia biológica y métodos para medir su actividad*, Capítulo 3.
30. Mahmoodi, N. M., Arami, M., Mazaheri, F., & Rahimi, S. (2010), *4-Degradation of sericin (degumming) of Persian silk by ultrasound and enzymes as a cleaner and environmentally friendly process*, *Journal of Cleaner Production*, 18(2), 146–151.
31. Mase, K., Okada, E., Iizuka, T., & Yamamoto, T. (2010), *Sericin-producing race of Bombyx mori for skincare material*, *Natural Ingredients*, 2–4.
32. Miñana, I. V. (2007), *Oligosacáridos en nutrición infantil : fórmula infantil, alimentación complementaria y del adolescente*, 65(4), 175–179.
33. Mondal, M., Trivedy, K., & Kumar, S. N. (2007), *The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., - a review*, 5(2), 63–76.
34. Niglio, O. (2012). *La seda, un hilo sutil que por siglos, ha unido a los pueblos de Oriente y de Occidente*, 25, 82–89.
35. Oh, H., Lee, J. Y., Kim, M. K., Um, I. C., & Lee, K. H. (2011), *Refining hot-water extracted silk sericin by ethanol-induced precipitation*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 32–37.
36. Okazaki, Y., Tomotake, H., Sasaki, M., & Norihisa, K. (2011). *Consumption of a Resistant Protein , Sericin , Elevates Fecal Immunoglobulin A , Mucins , and Cecal Organic Acids in Rats Fed a*, 1975–1981.
37. Olagnero, G., Genevois, C., Irei, V., Marcenado, J., & Bendersky, S. (2007). *Alimentos funcionales : Conceptos , Definiciones y Marco Legal Global*, 25, 31–39.
38. Özer, Ö., Mutlu, B., & Kivçak, B. (2007), *Antityrosinase Activity of Some Plant Extracts and Formulations Containing Ellagic Acid*, *Pharmaceutical Biology*, 45(6), 519–524.
39. Padamwar, M. N., & Pawar, a P. (2004), *Silk sericin and its applications : A review*, *Industrial Research*, 63(April), 323–329.
40. Patel, S., & Goyal, A. (2012). *The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review*. 3 *Biotech*, 2(2), 115–125.
41. Pescio, F., Basso, C. P., Divo, M., Frank, S. R. G., Pelicano, A., & Vieites, C. (2008). *Sericultura, Manual para la producción*.

42. Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001), *Antioxidants in food*, Editorial Woodhead Publishing Limited.
43. Remes-Troche, J. M. (2005), *Estreñimiento: evaluación inicial y abordaje diagnóstico*, 312–322.
44. Rodríguez Gómez, J. M. (2010), *Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos*, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 1., 19–66.
45. Rubiano, L. A. S. (2006), *Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación*, 10, 16–23.
46. Samaranyaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011), *Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications*, Journal of Functional Foods, 3(4), 229–254.
47. Sarovart, S., Sudatis, B., Meesilpa, P., Grady, B. P., & Magaraphan, R. (2003), *The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment*, Rev. Adv. Mater Sci. 5 p-193-198.
48. Sasaki, Masahiro, Amada, H. Y., & Ato, N. K. (2000), *A Resistant Protein, Sericin Improves Atropine-Induced Constipation in Rats*, Food Sci. Technol. Res., 6 (4), 280–283.
49. Sasaki, Mashiro, Yamada, H., & Norihisa, K. (2000), *Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium, and calcium in rats*, Nutrition Research, Vol. 20, No. 10, pp. 1505-1511.
50. Schmidt-Hebbel, H. (2009). *Aditivos alimentarios y la reglamentación de los alimentos*.
51. Serrano Maldoando, M., Legarreta, G., Perez, O. P., & Soriano Santos, J. (2011), *Actividad antioxidante y efecto citotóxico de Cladocolea Ioniceroides (van Tieghem) Kujit (Loranthaceae)*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 161–170.
52. Shi, H., & College, M. (2001), Part 3 *Natural antioxidants Introducing natural antioxidants*, Editorial Woodhead Publishing Limited.
53. Silveira Rodriguez, M., Susana, M. M., & Begoña Molina, B. (2003), *Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿cerca o lejos?*, Revista Española Salud Pública 2003; 77: 317-331.
54. Sonjui, T., Noomhorm, C., & Promboon, A. (2009), *Sericin Recovery from Silk Cocoon Degumming Wastewater by a Membrane Process*. Kasetsart J Nat Sci, 43, 538 – 549.
55. Sothornvit, R., Chollakup, R., & Suwanruji, P. (2010), *Extracted sericin from silk waste for film formation*, 32(1), 17–22.

56. Takasu, Y., Hata, T., Uchino, K., & Zhang, Q. (2010), *Identification of Ser2 proteins as major sericin components in the non-cocoon silk of Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, Songklanakarin J. Sci. Technol.40(4), 339–44.
57. Takeda, S. (1999), *Sericulture*, National Institute of Agrobiological Sciences Ibaraki, Japan, 912–914.
58. Torres, W. H. (2002). *Biología de las especies de oxígeno reactivas*, XXVI, 19–54.
59. Vaithanomsat, P., & Kitpreechavanich, V. (2008), *Sericin separation from silk degumming wastewater*. *Separation and Purification Technology*, 59(2), 129–133.
60. Valenzuela Bonomo, Alfonso; Garrido G., Argelia, *Importancia nutricional de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga: el beneficio de su suplementación*. *Rev. chil. nutr*; 25(3):21-9, dic. 1998.
61. Vieites, C. M., & Basso, C. P. (2010), *Sericicultura, Manual Técnico para la producción*, INTI.
62. Wu, J.-H., Wang, Z., & Xu, S.-Y. (2008), *Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater*, *Process Biochemistry*, 43(5), 480–487.
63. Zhang, Y.-Q. (2002), *Applications of natural silk protein sericin in biomaterials*. *Biotechnology advances*, 20(2), 91–100.
64. Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H., & Kato, N. (2003), *Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha*, *Oncology reports*, 10(3), 537–43.
65. Zhaorigetu, Sasaki, Watanabe, K. (2001), *Supplemental Silk Protein, Sericin, suppress colon tumorigenesis in 1,2-Dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, p. 2181-2186.