

EXTRACCION Y CARACTERIZACION DEL EXTRACTO PROTEICO DEL  
SUBPRODUCTO BISU DEL PROCESO DE OBTENCION DE SEDA

NATHALIA PATIÑO OSPINA

UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGIAS  
ESCUELA DE TECNOLOGIA QUIMICA  
PEREIRA  
2008

EXTRACCION Y CARACTERIZACION DEL EXTRACTO PROTEICO DEL  
SUBPRODUCTO BISU DEL PROCESO DE OBTENCION DE SEDA

NATHALIA PATIÑO OSPINA

Requisito parcial para optar  
al titulo de Tecnólogo Químico

Dirigido por:

Gloria Guerrero (U.T.P.)  
Química PhD Science  
Ricardo Acuña (CENICAFE)  
Biologo PhD Science

UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGIAS  
ESCUELA DE TECNOLOGIA QUIMICA  
PEREIRA  
2008

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios y a mis padres por motivarme a terminar esta etapa de mi vida. Ellos han sido mi mayor estímulo para crecer y culminar todas mis metas.

.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios por darme sabiduría.

A mi mamá Gloria, mi papá Bayardo por su apoyo constante y su lucha incansable hasta ver realizadas mis metas.

A mis abuelos, ellos han hecho de mi todo lo que soy.

A toda mi familia pues de alguna manera han contribuido a mi crecimiento personal

**El autor expresa sus agradecimientos a:**

Mi directora Gloria E. Guerrero por su apoyo, orientación y la dedicación brindada en el desarrollo de la investigación.

Gabriel Cadena Gomez Director de CENICAFE; por permitir el desarrollo de parte de este proyecto en sus instalaciones.

Ricardo Acuña investigador científico de la disciplina de Biotecnología y Mejoramiento genético de CENICAFE por su colaboración y guía constante para el desarrollo de este proyecto.

Gustavo Adolfo Ossa por compartir sus conocimientos y experiencias para la realización de las caracterizaciones.

Jose Hipolito Isaza por permitirnos el uso de sus instalaciones en el momento en que lo necesitaba.

Todos los profesores que en mi trayectoria como estudiante me exigieron y me ayudaron a fortalecer

Todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron.

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

Presidente del jurado

---

Jurado

---

Jurado

## GLOSARIO

**ANFOTERA:** es la molécula que contiene un radical base y otro ácido, pudiendo así actuar bien como ácido, o bien como base, según el medio en que se encuentre

**BANCO DE GERMOPLASMA:** es el sitio encargado de la producción de los híbridos (larvas), estas se las venden a los sericultores quienes terminan el proceso de cría.

**BISU:** seda enredada que se encuentra antes de aparecer las hebras aptas para el hilado.

**BORRA:** parte exterior del capullo que el gusano maduro hila antes de formar el capullo.

**CAPULLO:** cubierta protectora de muchas formas larvales antes de que lleguen al estado de pupa. La larva de muchos insectos teje un capullo en el cual se desarrolla la pupa.

**CAPULLO FRESCO:** capullo en el cual la pupa esta viva sin tratamiento de secado.

**CAVITACION ACUSTICA:** el sonido se transporta a través de un líquido como una onda, con ciclos alternados de compresión y expansión, esto puede producir que las moléculas empiecen a separarse.

**CRISALIDA:** pupa de insectos con metamorfosis completa, encerrada por una cubierta protectora.

**DESGOME:** quitar la goma de los tejidos. En el hilo de seda es quitar la sericina y otras impurezas de fibroina.

**DEVANADO:** condición de los capullos cuando se devanan para procesar el hilo de seda.

**FIBROINA:** proteína principal de las fibras de seda, producida a partir del fibroinogeno, esta constituida por aminoácidos tales como la glicina, alanina, serina y tirosina.

**FILAMENTO:** estructura tipo hilo largo. La seda es el único filamento entre las fibras naturales.

**GLANDULA DE SEDA:** glándula sericígena, donde se sintetiza y secreta la sustancia de la seda. La glándula posterior secreta fibroina y la glándula media secreta sericina.

**GUSANAZA:** alimento producido a partir de lombriz.

**HIBRIDO:** organismo que proviene del cruzamiento entre progenitores genéticamente diferentes.

**HILADO:** es retorcer varias fibras a la vez para producir un hilo más resistente, llamado también hilaza.

**MORERA:** hojas de morera; base de alimentación del gusano *Bómbix Mori Linn.*

**PATRON:** solución patrón; una solución química que se usa como muestra en análisis volumétrico.

**POZOS:** agujeros realizados con el peine de la cámara electroforética para depositar la muestra lista para la corrida electroforética.

**PUPA:** es la tercera fase del ciclo de vida después de la etapa larval en un insecto con metamorfosis completa.

**SDS:** Sodio dodecil sulfato.

**SEDA CRUDA:** hilo de seda que se compone de varios filamentos de capullos y que conserva la goma natural (sericina).

**SERICINA:** proteína adhesiva que es secretada por la división posterior de la glándula sericígena y que recubre la fibroina del filamento.

## CONTENIDO

	Pag
<b>INTRODUCCION</b>	<b>15</b>
<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>2. MARCO TEORICO</b>	<b>18</b>
2.1 GENERALIDADES DE LA SEDA	18
2.1.1 HISTORIA DE LA SEDA	18
2.1.2 CARACTERISTICAS DE LA SEDA	18
2.1.3 INTRODUCCION DE LA SEDA A COLOMBIA	18
2.1.3.1 INTRODUCCION DE LA SEDA EN EL EJE CAFETERO	19
2.1.3.2 INTRODUCCION DE LA SEDA EN RISARALDA	19
2.1.3.3 CRISIS DE LA SERICULTURA EN COLOMBIA	19
2.1.3.4 ESTADO ACTUAL DE LA SERICULTURA	20
2.2 ESTRUCTURA Y CARACTERIZACION DEL HILO Y CAPULLO DE SEDA	20
2.2.1 FORMACION DEL FILAMENTO DE SEDA	20
2.2.2 ESTRUCTURA DE LA SEDA	21
2.2.3 ESTRUCTURA DEL CAPULLO	21
2.2.4 CARACTERISTICAS DEL CAPULLO	22
2.2.5 COMPOSICION DE LOS FILAMENTOS DEL CAPULLO	22
2.2.6 PROPIEDADES QUIMICAS Y FISICAS DE LA SEDA	22

2.2.6.1 PROPIEDADES QUIMICAS	23
2.2.6.2 PROPIEDADES FISICAS	24
2.3 GENERALIDADES DE LA SERICULTURA	24
2.3.1 OTROS USOS DE LA SERICULTURA	24
2.3.2 OTROS GUSANOS DE SEDA	26
2.4 MARCO DE REFERENCIA	27
2.4.1 PRINCIPIOS DEL ULTRASONIDO	27
2.4.2 PRINCIPIOS DEL MICROONDAS	28
2.4.3 CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD	29
2.4.4 ELECTROFORESIS	29
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
3.1 MUESTRAS DE ANALISIS	32
3.2 OBTENCION DE EXTRACTOS PROTEICOS	32
3.3 CUANTIFICACION DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS	33
3.4 LIOFILIZACION DE LOS EXTRACTOS	33
3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA	33
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
4.1 DESCRIPCIÓN DEL BISÚ Y DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS	35
4.2 CUANTIFICACIÓN DE LOSEXTRACTOS PROTEICOS	35

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA	37
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>44</b>
BIBLIOGRAFIA	45
ANEXOS	49

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las características de la fibroina y la sericina.

Tabla 2. Contenido de fibroina y sericina en las diferentes capas de capullo.

Tabla 3. Contenido de cenizas de la seda.

Tabla 4. Contenido nutricional de la pupa del *Bómbix mori*.

Tabla 5. Cuantificación del contenido proteico en los extractos por Bradford.

Tabla 6. Separación electroforética en SDS-PAGE.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis SDS 15%.

Figura 2. Electroforesis SDS 10%.

Figura 3. Curva de calibración para determinar proteína por Bradford.

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Capullo del gusano de seda.

Anexo B. Gusano de seda.

Anexo C. La morera.

Anexo D. Ciclo biologico del gusano de seda.

Anexo E. Glandula sericigena.

Anexo F. Camara electroforetica.

## RESUMEN

En el presente estudio se obtuvo un extracto proteico del subproducto "Bisú" procedente de una empresa productora de seda mediante tres mecanismos ultrasonido, microondas y agitación magnética con calentamiento.

La cuantificación de los extractos se realizó por espectrofotometría Uv-Vis usando la técnica de Bradford basada en el indicador azul de Coomasie. La mayor concentración fue obtenida por agitación magnética, registrando 9.63mg/g de seda.

Los extractos fueron caracterizados por electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante para determinar la sericina presente, comparando los resultados con los reportados en estudios anteriores.

**Palabras clave:** ultrasonido, microondas, agitación magnética, espectrofotometría, Bradford, sericina, electroforesis unidimensional.

## INTRODUCCIÓN

La industria de la sericultura en Colombia surgió en la década de los 70 como una alternativa económica y social para el suroccidente del país (1).

La cadena productiva de sericultura en Colombia se inicia con la producción de los híbridos (larvas) por parte de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), esta entidad vende las larvas a los sericultores del país, quienes terminan el proceso de cría y obtienen el capullo fresco (Ver Anexo A) que lo venden a la planta industrial (SEDACOL) a varios grupos artesanales (2).

Cuando el capullo es vendido a SEDACOL, esta industria produce hilo de seda que le vende también a los grupos artesanales para que estos produzcan tejidos que llegan al consumidor final (3).

En los últimos años la industria serícola en Colombia viene atravesando una crisis que terminó con la liquidación del Centro de Desarrollo Tecnológico (CDTS), por serias dificultades económicas (2).

El 29 de septiembre del 2006 el CDTS hace entrega de sus instalaciones con las colecciones de cría de gusanos de seda y una extensión de tierra a la UTP, la cual buscará darle sostenibilidad a la producción de huevos que alimenten a los cultivadores de los países andinos y a las actividades de investigación, coordinadas por el Centro de Investigaciones y Extensión, entre las que se encuentra las del Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad (2).

Tanto la Gobernación de Risaralda, como la Universidad Tecnológica de Pereira, UTP, hicieron una solicitud a la red Andina de la Seda, para que a través del “Fondo de Investigaciones”, se pudiera financiar un proyecto de investigación que involucraba el Banco Germoplasma y de paso no dejarlo morir, garantizar el suministro de híbridos hacia el inmediato futuro, no solo para los caficultores colombianos sino para los demás de la región (3).

Como complemento a esta actividad la Red Andina de la Seda firmó un “Convenio Marco” con la Universidad Tecnológica de Pereira con el fin de realizar acciones de colaboración entre las partes para la realización de proyectos de investigación, extensión, docencia, venta de servicios y demás asuntos que se relacionan directamente con el objeto social de cada una de ellas, en especial para el sector agroindustrial y de la sericultura (4).

Las partes acordaron desarrollar la cooperación a través de intercambio de conocimientos adquiridos al desarrollar las actividades misionales institucionales, adelantar proyectos de investigación científica bilaterales y multilaterales en apoyo el desarrollo de la cadena productiva de la sericultura en Colombia y otras que sean necesarias para apoyar al sector serícola colombiano (4).

En Colombia a diferencia de otros países serícolas no se aprovechan los subproductos que proceden de esta industria y que pueden representar un beneficio económico importante para el país.

En la seda procedente del gusano de seda *Bombyx Mori Linn* están presente la fibroína y la sericina, siendo la fibroína incolora y resistente a la acción del agua hirviente como la de algunos ácidos y álcalis, mientras que la sericina por su distinta composición es soluble en agua en ebullición y es fácilmente atacada por soluciones alcalinas que se emplean durante el proceso de desgome en la producción de la seda. La sericina es eliminada de manera parcial o total sin aprovechar de alguna forma este subproducto (5).

En la Universidad Tecnológica de Pereira, la escuela de Tecnología Química se viene adelantando estudios sobre el aprovechamiento de los subproductos crisálida y sericina. Es así como se realizó un primer estudio sobre la caracterización de los lavados de la seda encontrándose un contenido importante de sericina pero con una alta degradación que puede limitar su uso cosmético. Para continuar con esta investigación se plantea este proyecto con el fin de evaluar el bisú como otra fuente de sericina de primera calidad, empleando técnicas de extracción como ultrasonido, microondas y agitación magnética.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el extracto proteico del subproducto “bisú” del proceso industrial de obtención de seda de *Bombyx mori linn* híbrido píamo I.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar diferentes condiciones de extracción por ultrasonido y seleccionar aquellas que permitan el extracto con mayor concentración de proteínas.
- Evaluar los extractos proteicos del bisú de seda empleando microondas y cuantificarlos por espectrofotometría Uv-Vis.
- Caracterizar los extractos proteicos obtenidos mediante electroforesis SDS-PAGE desnaturizante unidimensional con el fin de determinar la calidad de sericina presente.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 GENERALIDADES DE LA SEDA

#### 2.1.1 Historia sobre la seda.

La seda se descubrió en la China hace más de 4600 años. La sericultura se introdujo en Corea alrededor del año 200 a.C., cuando grupos de inmigrantes chinos arribaron allí. A Occidente la seda llegó a través de numerosas rutas. En el año 300 d. C., la sericultura se extendió hacia el Occidente y la cría del gusano de seda se estableció en la India. La seda dejó de ser un material industrial y tomó gran valor. Los agricultores pagaban sus impuestos y agradecían favores especiales en grano y seda (6).

#### 2.1.2 Características de la seda.

La seda tiene, la cualidad de conservar el calor corporal, mientras que las imitaciones, por ser un producto sintético, son sumamente frías. Entre su larga lista de atributos, hay que agregar la enorme capacidad de absorción para el agua, los gases y los colorantes; y para cerrar con broche de oro, basta decir que es un magnífico material para aislar los alambres de metal (7).

Se encontraron hebras de características delgadas y brillantes, a las que se les llamó sedas artificiales, como la artisela, la sedalina y el rayón. Ninguna de ellas ha logrado obtener la resistencia del hilo del *Bombyx mori*, que es de 8 gramos, peso que puede soportar antes de romperse; tampoco igualan su elasticidad, ya que un metro logra estirarse hasta 10 centímetros más, sin romperse; y, desde luego, no han superado su consistencia, duración ni finura (7).

#### 2.1.3 Introducción de la seda a Colombia.

El Doctor Manuel Vicente de la Roche, distinguido médico colombiano fue el encargado de la introducción y climatización de la morera y el gusano de seda asiático en nuestro país. En 1868 consiguió algunos huevos, logro que los gusanos nacieran y sin ayuda alguna, los cuidó y estudió hasta hacer conocer esta industria en todos sus detalles (8).

Algunos departamentos habían hecho una propaganda sobre el cultivo de la morera para la producción del capullo de seda y por eso existían pequeñas plantaciones en el Valle, Santander y otras regiones que podrían producir capullo si hubiera una entidad que las orientara y se lo comprara (8).

La buena aceptación de la seda en el mercado americano y la facilidad con que se producía en Colombia, fueron factores para que el señor Cabarrus hiciera un viaje a los Estados Unidos en busca de capital americano que permitiera aumentar la producción y resistir los primeros años de noviciado que indudablemente dejaría pérdida (8).

Pero es solamente en 1968 cuando se introdujo la sericultura al campo experimental de CENICAFE, por parte de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y por iniciativa del señor Alfonso Peñaranda, entonces representante de la federación en Japón (8).

**2.1.3.1 Introducción de la seda en eje cafetero.** La Federación de Cafeteros en 1971 inicio el montaje de la Granja “Belmonte” en Pereira, en donde inicialmente sembraron lotes con variedad “Ichinose” provenientes de CENICAFE. Allí se continuaron las evaluaciones tanto de la morera como de los gusanos y en 1974 la Federación de Cafeteros a través del programa de Desarrollo y Diversificación inició la propagación con agricultores de las zonas cercanas a la Granja “Belmonte” (8).

Durante esta época hubo una importante participación de personajes que trabajaron arduamente buscando el crecimiento y el desarrollo del sector serícola en Colombia (8).

Así, con la colaboración de expertos italianos, brasileros y chinos, lograron consolidar la presencia de la sericultura en los departamentos de Risaralda, Caldas, Quindío y Cauca (8).

**2.1.3.2 Introducción de la seda en Risaralda.** A finales de 1989 y principios de 1990 aparecen inversionistas coreanos, quienes establecen con otros inversionistas colombianos fábricas, productoras de seda cruda en Pereira (COKOSILK S.A.) y Popayán (COSEDAS), aprovechando los altos niveles de precios que se habían alcanzado en los mercados internacionales (8).

Durante esta época, la sericultura presentó un gran auge y desarrollo y Colombia no sólo alcanzó a desarrollar la fase industrial sino que también estableció un Banco de Germoplasma de Gusano de Seda, lo que le permitió al país iniciar la producción de sus propios híbridos, con la creación del híbrido “Perla del Otún”, inicialmente y el “konsota” a partir de 1992 (8).

**2.1.3.3 Crisis de la sericultura en Colombia.** La caída de los precios internacionales de la seda trajo como consecuencia la desaparición de la industria COSEDAS en el Cauca y una fuerte reestructuración de la empresa COKOSILK en Pereira, en donde el Gobierno Colombiano la intervino (9).

En 1994 se crea el Centro de Desarrollo Tecnológico de Sericultura CDTS que sería el Banco de Germoplasma de gusanos de seda. Hasta el año 2003, el CDTS abasteció de huevos de seda a éste y los demás países de la región y por serias dificultades económicas e internas fue liquidado. A partir del año 2004 no continuó realizando este proceso y se espera que ahora con la ayuda de la Red Andina y la intervención de UTP, este servicio se pueda seguir prestando (9).

**2.1.3.4 Estado actual de la sericultura.** El principal apoyo a los sericultores colombianos y de la región andina, se encuentra plasmado en el convenio que la Red Andina de la seda suscribió en Noviembre de 2004 con la Universidad Tecnológica de Pereira, UTP. Esta Universidad fue seleccionada por la gobernación de Risaralda y el Ministerio de Agricultura de Colombia, para manejar, sostener y conservar el Banco de Germoplasma de gusanos de seda que estaba en manos del Centro de Desarrollo Tecnológico de Sericultura, CDTS, entidad liquidada. Tanto la Gobernación de Risaralda, como la misma UTP, hicieron una solicitud a la Red Andina de la Seda, para que a través del “Fondo de Investigación”, se pudiera financiar un proyecto de investigación que involucraba el Banco de Germoplasma y de paso no dejarlo morir, garantizando el suministro de híbridos hacia el inmediato futuro, no solo para los sericultores colombianos sino para los demás de la región (9).

## **2.2 ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS DEL HILO Y CAPULLO DE SEDA**

### **2.2.1 Formación del filamento de seda.**

En el cuerpo del gusano, existe un par de glándulas de seda, en las cuales se acumulan los componentes de la seda que son obtenidos a partir del alimento consumido (10).

La glándula de seda (Ver Anexo E) puede ser dividida en tres regiones que tienen diferentes funciones: la glándula anterior, media y posterior (10).

La región posterior de la glándula de seda es de gran longitud curvada y secreta exclusivamente fibroína, una de las proteínas principales del hilo de seda que conforma el 75 al 85% de la seda. La fibroína consta de glicina, alanina, serina y tirosina, estos aminoácidos son sus principales componentes (10).

La región media de la glándula de seda es la más grande de las tres regiones y tiene tres divisiones bien definidas formando una figura de “S”. Esta región secreta la sericina. La composición de aminoácidos en la sericina es muy diferente comparado con la de la fibroína, en la cual la serina, el ácido aspártico, la glicina y la treonina son los mayores componentes de la sericina (10).

La región anterior es un tubo estrecho con un diámetro de *4mm*. Esta no secreta ninguna sustancia de seda, sino que es el lugar donde el filamento largo de seda es formado por presión del tubo, eliminando el agua de la seda (10).

### 2.2.2 Estructura de la seda

En la parte superior del filamento de seda se encuentra la sericina la cual cumple la función de reunir dos filamentos de fibroína en uno. Cuando se elimina la sericina a través del desgome utilizando agua con jabón, queda solamente la fibroína la cual tiene la característica de ser lisa, suave y brillante (11).

La sericina se divide en cuatro capas según la velocidad de disolución en agua alcalina. Entre ellas la primera y segunda capa exterior se disuelven fácilmente, mientras que la tercera y cuarta capa interior del filamento no se disuelven fácilmente (11).

La sericina no es soluble por debajo de 20°C, pero cuando la temperatura sube a 60°C, empieza a disolverse la primera y segunda capa. La tercera capa se elimina más fácilmente en agua a 83°C, mientras que quedan algunas sericinas insolubles a una temperatura de 100°C (11).

**Tabla 1.** Comparación de las características de la fibroína y la sericina

<b>FIBROÍNA</b>	<b>SERICINA</b>
Ocupa el 75% de la corteza del capullo	Ocupa el 25% de la corteza del capullo
Proteína insoluble	Proteína soluble y globular
Expansión limitada	Expansión infinita
Absorción de tintura alcalina	Absorción de tintura acida
Carácter principal de la seda	Forma estructura secundaria de la seda

### 2.2.3 Estructura del capullo.

El capullo esta conformado por cinco partes: la borra, la corteza, la pupa, el forro de la pupa y la piel del gusano. La borra corresponde al 0.6 al 0.9% del peso total del capullo fresco, el filamento de borra es muy delgado y rompible; su contenido de sericina es alto y no se puede devanar. La corteza constituye 15 al 24% del peso total del capullo fresco y es la parte usada para devanar. El forro de la pupa es lo ultimo en hilar el gusano y es un tejido irregular, ocupa el 25% del peso total del capullo (12).

#### **2.2.4 Características del capullo.**

La forma es una característica importante definida por la raza e influye en su calidad, generalmente cada raza de gusano tiene una forma de capullo diferente. Vista por fuera puede ser: redonda, elíptica, cónica, en huso, cintura apretada y poco apretada (12).

Generalmente puede decirse que los capullos con tamaño grande presentan una tendencia a poseer un filamento grueso y largo; en cambio para los capullos con tamaño pequeño ocurre todo lo contrario (12).

El color y la brillantez del capullo, son dos características específicas del capullo. Su color depende de la capacidad que posee el gusano de sintetizar la proteína a través del aparato digestivo y las glándulas sericígenas como una característica propia de la raza (12).

Se conoce el grosor por medio del tacto e igualmente por el uso de un medidor; generalmente el grosor de la corteza del capullo esta dentro de 0.36 y 0.9 mm. La dureza es el grado de flacidez y resistencia del capullo al tacto (12).

#### **2.2.5 Composición de los filamentos del capullo.**

El filamento esta conformado por babas secretadas de las glándulas sericígenas, que al entrar en contacto con el medio ambiente se solidifican; a la salida de la glándula las secreciones se unen en un solo filamento compuesto por fibroína y recubierto por sericina. La composición química del filamento es:

- Proteína pura	97%
- Cera	0.4-0.8%
- Carbohidratos	1.2-1.6%
- Factor de coloración	0.2%
- Materia inorgánica	0.7%

#### **2.2.6 Propiedades químicas y físicas de la seda.**

Los hilos que en su conjunto forman la tela de seda están compuestos por una materia viscosa conocida como fibroína, que están recubierta por un barniz denominado sericina y lubricado su conjunto por mucoidina (13).

### 2.2.6.1 Propiedades químicas:

**Tabla 2.** El contenido de fibroína y sericina en las diferentes capas del capullo son:

	Sericina %	Fibroína %
Borra	44.40	65.60
Seda de las capas exteriores	31.47	68.53
Seda de las capas interiores	26.70	73.28
Seda de la cubierta	29.30	70.70

**Tabla 3.** Contenido de cenizas:

Ceniza de cubierta	1.64%
Ceniza de seda cruda	1.65%
Ceniza de seda cruda hilada con agua destilada	0.75%

Estas cenizas en cantidad bastante estables, se componen de cal, magnesio, sesquióxido de hierro y alúmina, pudiendo encontrarse en proporciones que oscilan en 0.64%, de acuerdo a la siguiente estimación:

Cal	0.526%
Alúmina y óxido de hierro	0.418%

Los datos fueron obtenidos a partir del proceso de desgomado de la seda.

La seda se disuelve fácilmente sumergiéndola en una solución amoniacal de óxido de cobre o también en solución de óxido de níquel amoniacal, asimismo el cloruro de zinc básico la disuelve en frío y si la solución se eleva de temperatura el efecto disolvente será más rápido (13).

El ácido sulfúrico concentrado, el ácido clorhídrico y el ácido nítrico, también tienen efecto disolvente sobre la seda, como también las soluciones en distintos grados de concentración de potasa y soda cáustica cuyo poder disolvente no solamente alcanza la sericina, sino que puede atacar la fibroína si la exposición es prolongada (13).

La seda químicamente se comporta como anfótera, aunque algo más ácida que la lana, lo que tiene la ventaja de ser afín con casi todas las materias colorantes empleadas en tintorería industrial (13).

La seda es insensible a los reductores y oxidantes débiles, por ello puede ser blanqueada por estos agentes, también se considera como higroscópica ya que puede absorber hasta el 30% de agua sin que resulte húmeda al tacto (13).

**2.2.6.2 Propiedades físicas:** la seda se caracteriza por su gran brillo y resistencia siendo su elasticidad incomparable, también esta considerada como un importante aislante, tanto para el calor, como para la electricidad (13).

La longitud promedio de un hilo de seda se calcula entre 400 y 3000 m, estimándose que un gramo de hilo de seda mide entre 900 y 1000 m y su grosor se puede estimar en 0.019 a 0.030 mm; y su peso específico es de tan solo 1.44 a 1.33 para la fibroína y 1.32 a 1.37 para la sericina (13).

## 2.3 GENERALIDADES DE LA SERICULTURA

### 2.3.1 Otros usos de la sericultura.

A partir de la seda no solo se producen hilos y prendas de vestir, también se han desarrollado otras actividades con la intención de sacar el mejor provecho posible, creado un gran mercado productivo (14).

**-Usos medicinales.** No solo en artículos de lujo se usa la seda, se fabrican con ella venas artificiales para reemplazar las naturales en las operaciones cardiovasculares (14).

Son muchos los usos medicinales que se le han atribuido tanto a la morera como al gusano mismo. Algunos de ellos fueron reportados por Lee y por el Manual Chino de Recetas Medicinales, hacen alusión a que la hoja de morera puede ser usada en tratamientos para bajar la presión sanguínea, contra la diabetes, tratamientos para bajar el colesterol, tratamiento contra el cáncer y mencionan datos hasta para prolongar la juventud (14).

En varios experimentos se ha descubierto que las larvas del gusano de seda muestran mayor actividad para bajar el nivel de glucosa sanguínea que las pupas. El efecto de bajar la concentración de azúcar se debe a la inhibición de la reacción catalítica de la alfa glucohidrolasa en el intestino delgado (14).

Por otro lado el “Manual Chino de Plantas Medicinales” anteriormente mencionado explica que las “moras” fortalecen los riñones y ayudan a la visión, además nutre la sangre (14).

El gusano de seda se utiliza en la medicina tradicional china como "*bombyx batryticatus*" o *gusano tieso* usado para disolver flemas y aliviar [espasmos](#) (14).

**-Usos alimenticios** Se ha demostrado que la morera y la pupa, pueden ser usadas en la alimentación tanto humana como animal (14)

Luego de muchos estudios se comprobó que la hoja de morera cumple con las funciones básicas de nuestro organismo, contiene altos niveles de proteína cruda, muchos minerales como hierro y calcio y aminoácidos. La hoja se mezcla con espagueti o con helado dando un sabor muy agradable y en polvo se puede ingerir como té (14).

Además de la morera, la pupa de gusano seca es consumida normalmente en países orientales como un alimento y es vendida en los supermercados en forma enlatada como cualquier otro producto (14).

En China, los niños prefieren la pupa como alimento a la chocolatina. Los indios nativos de América, usan las pupas deshidratadas en harinas y gomas de mascar (14).

La morera, la pupa y la gusanaza son usadas en la alimentación de animales como peces, vacunos, cerdos, caballos, cabras. Es posible usar hojas frescas de morera en reemplazo parcial del concentrado comercial (14).

**Tabla 4. Contenido nutricional de la pupa del *Bombyx mori*.**

PROTEINA CRUDA	GRASA CRUDA	CARBOHIDRATOS	QUITINA Y CORIANINA	CENIZA
49.3	26.99	5.6	7.3	5.7

**-Usos industriales** La madera producida por los frondosos árboles de morera (Ver Anexo C) es utilizada en labores normales de carpintería, en otros países son famosas las raquetas de tenis hechas de hojas de morera. Otro uso importante es el de las ramas de morera como "leña" dado el importante volumen que se puede obtener, ayudando a la conservación del medio ambiente (14).

La seda es usada en la obtención de cintas para maquinas de escribir, computadores y maquinas registradoras. E incluso es usada como un aislante en aparatos sofisticados como naves espaciales y en suturas de alta cirugía (14). Los cosméticos que contienen proteína extraída del capullo del gusano de seda son muy buenos para la piel seca, debido a su acción de bloquear rayos ultravioleta y de conservación de la humedad (14).

Durante el proceso de cocinado del capullo, se desprenden grandes cantidades de proteína, la cual si es almacenada da como resultado un tónico que al utilizarlo restablece el pH capilar y previene la caída del cabello (14).

Jabones, fertilizantes, aceites para cosmetología pueden ser extraídos de la pupa y en fin existen múltiples aplicaciones de los subproductos de la sericultura que pueden tener un gran potencial de uso industrial (14).

Las bicicletas usadas en competencias internacionales llevan llantas especiales hechas con fibras de seda porque proporcionan mayor suavidad y mejor tracción. Los esquiadores prefieren medias e interiores de seda porque conservan el calor e impiden que se acumule la humedad (14)

Por otro parte puede usarse el hilo de seda para la confección artesanal de prendas en el hogar, producto que puede comercializarse en las exposiciones y ferias artesanales. La producción de hilos de seda aparece como una alternativa apropiada para mejorar el nivel de ingreso de las familias de escasos recursos de zonas rurales y pequeñas poblaciones (15).

### **2.3.2 Otros gusanos de seda**

Los denominados vulgarmente gusanos de seda salvajes pertenecen a la familia Satúrnidos; se cultivan en semidomesticidad y producen una seda de menor calidad y que, al no ser siempre una fibra continua la que forma el capullo, no puede ser devanada como en el caso del "*Bombyx mori*", sino que ha de ser sometida a las mismas manipulaciones que las fibras cortas, para formar un hilo continuo. Únicamente se explotan en China, India y República de Madagascar. Algunos son:

- *Bombyx mandarina Moore*; lo señalan como el mas probable antecesor del *Bombyx Mori* por sus características.
- *Antherea pernyi*, son los gusanos silvestres, procedente de China, alimentado con hojas de encina, da un capullo gris.
- *A Yamamai*, también se nutre con hojas de encina, procede de Japón, y el capullo de seda es grande y de color verde.
- *A. mylitta*, polífago de origen indio, se alimentan de hojas de Terminalia y otras plantas.
- o *Phílosamia cynthia* es criado y domesticado con las hojas de la plantas "Aceite de Ricino", produce capullos blancos y rojo ladrillo (10).

## 2.4 MARCO DE REFERENCIA

**Extracción, cuantificación y caracterización de proteínas.** Para el desarrollo del presente trabajo, se emplearon las siguientes técnicas:

### 2.4.1 Principios del ultrasonido.

Los sonidos son vibraciones que se propagan a través del aire, agua o sólidos. La audición en los seres humanos, ocurre siempre que una vibración tenga una frecuencia comprendida entre unos 15 y 20 KiloHertz, y su intensidad sea la suficiente para llegar al oído interno, cuando las vibraciones superan estos márgenes se habla de ultrasonido y no son perceptibles por el ser humano. Las frecuencias superiores a los 18 KiloHertz (ciclos por segundo) son generalmente consideradas como ultrasónicas (16).

El ultrasonido provee una excelente forma de energía para la modificación de las reacciones químicas, y mucho más eficiente que las normalmente usadas (temperatura y luz). Esta nueva herramienta se denomina Sonoquímica (16).

El origen del efecto químico del ultrasonido en los líquidos (efecto sonoquímico) es el fenómeno de Cavitación Acústica. El sonido se transporta a través de un líquido como una onda, con ciclos alternados de compresión y expansión. Si la onda de expansión es lo suficientemente poderosa, pueden generarse presiones negativas que traen como resultado que las moléculas empiecen a separarse formando "microburbujas" o cavidades (16).

Según el Centro de Sonoquímica de la Universidad de Coventry en el Reino Unido, el ultrasonido es utilizado por la posibilidad de realizar evaluaciones no invasivas ni destructivas, y por ser fuente de energía (2006). (16)

Las primeras reacciones químicas en el líquido se dan a causa de: las temperaturas y presiones generadas, que proveen la energía de activación requerida para la fragmentación de las moléculas (rotura de enlaces) generando especies más pequeñas o radicales, los cuales pueden a su vez causar reacciones secundarias (16).

La extracción por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (17).

Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias se ven afectados por la sonificación, ya sea que las sustancias de interés se encuentren en células internas o externas del tejido. Al reducir el tamaño de las partículas del material vegetal se aumenta el área de exposición al solvente y a la cavitación producida. (17).

La primera aplicación comercial del ultrasonido fue en 1917; desde entonces, el tema se ha desarrollado y expandido a un gran número de aplicaciones. Los proyectos más importantes que envuelven esta técnica no se encuentran entre los confines de la química, sino en tecnologías de procesamiento, ya que ha sido mejor reconocido en la industria que en los ámbitos de la ciencia pura (18).

Se ha encontrado que las extracciones por ultrasonido son más eficientes que los métodos de extracción tradicionales como reflujo térmico y soxhlet, y más económica y sencilla que los métodos de extracción no tradicionales como la extracción por fluidos súper críticos, por lo cual se comprueba su viabilidad industrial (18).

Las variables que se deben analizar para optimizar la técnica de extracción por ultrasonido son temperatura, solvente, volumen del solvente, tiempo de extracción, tamaño de la punta de prueba, poder del ultrasonido y duración del ciclo aplicado (18).

Esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas (19).

El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (20).

El ultrasonido tiene una eficiencia 70 veces mayor que la extracción por solventes, 11 veces mayor que la extracción por destilación y 35 veces mayor que la extracción por soxhlet (21).

La extracción por ultrasonido por su eficiencia, bajo costo y posibilidad de extracción a bajas temperaturas, se convertirá en una herramienta ampliamente aplicada tanto en la industria como en el laboratorio (21).

#### **2.4.2 Principios del microondas**

La irradiación de microondas causa movimiento moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia vegetal (22).

Según los estudios realizados, la extracción por microondas es más eficiente sobre métodos tradicionales como extracción por solventes a temperatura ambiente, reflujo térmico y Soxhlet. Adicionalmente, se obtuvo mejores resultados utilizando el microondas que con la técnica de ultrasonido, pues hubo una eficiencia 5,86 veces mayor. Sin embargo, en productos en los cuales la temperatura de extracción puede afectar la funcionalidad de la sustancia extraída, el uso del ultrasonido es de suma importancia (22).

Las extracciones por microondas han probado ser más eficientes en algunos casos, requieren un equipo sencillo y no es muy costoso, aunque utilizan tratamiento térmico rápido que puede afectar los compuestos de interés en la extracción (22)

#### **2.4.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

El método de Bradford para proteínas solubles se usa para determinar las concentraciones de proteínas solubles en agua por medio de la medición espectrofotométrica con azul de coomasie en forma aniónica. Para lo cual se hace una gráfica con un patrón de concentraciones conocidas como la albúmina serica bovina, y con esta se hace una regresión lineal y se compara con la absorbancia de la solución a estudiar. El máximo de absorbancia del colorante azul de coomasie en solución ácida varía de 495 a 595nm tras añadir proteína debido a la estabilización de la forma aniónica del mismo por interacciones hidrofóbicas e iónicas (23).

#### **2.4.4 Electroforesis.**

La electroforesis es un método en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa (24).

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, éstas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo) (24).

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria debido a que poseen energía cinética propia denominada difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión (25).

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzaran a moverse formando un frente cuya anchura aumentara con el tiempo (25).

Para reducir la anchura de este frente se reduce el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga mas resistencia ha dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será mas lenta, pero el ensanchamiento del frente se vera reducido también (24).

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, dodecilsulfato de sodio o SDS que es un detergente de acción desnaturalizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas en una proporción de una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos (24).

Los geles de poliacrilamida se forman por polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada en el tamaño del poro (24).

La electroforesis en poliacrilamida (SDS PAGE) es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína (25).

**Detección de proteínas en el gel:** Luego de realizada la separación electroforética, es necesario visualizar y, en algunos casos, cuantificar las bandas proteicas en el gel, a continuación se describen brevemente algunos de las técnicas más utilizadas (26).

*Azul de Coomasie (Coomasie Brilliant Blue, CBB):* Es el método más común de tinción de proteínas. El CBB es un colorante orgánico que en medio ácido se une a las proteínas mediante interacciones electrostáticas con los grupos amino. Luego de teñido y desteñido el gel las proteínas se visualizan como bandas azules. La tinción con CBB es simple pero presenta baja sensibilidad, se pueden detectar hasta 0,2-0,5 µg de proteína por banda (26).

*Tinción con sales de plata:* Los procedimientos de tinción con plata se basan en la reducción de la plata y se pueden agrupar en dos categorías. Los métodos alcalinos se basan en el uso de plata amoniacal o como solución diamina. Los iones de plata complejados con las proteínas son reducidos por formaldehído en medio ácido. En el segundo grupo de métodos, se usa una solución débilmente ácida de nitrato de plata para embeber el gel. El revelado se logra por la reducción selectiva de los iones plata a plata metálica por formaldehído en medio alcalino. La tinción con plata es monocromática, produciendo bandas de color marrón oscuro. La sensibilidad es su gran ventaja siendo 20-200 veces mayor que con CBB y pudiéndose detectar hasta 0,1 ng de proteína por banda. Entre las desventajas se encuentra el alto costo, el hecho de ser un método laborioso y lento, poco reproducible y que no todas las proteínas se tiñen (26).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 MUESTRAS DE ANÁLISIS

Las muestras utilizadas corresponden al subproducto conocido con el nombre de Bisú, del proceso semiindustrial de obtención de seda a partir del capullo del gusano de seda *Bombyx mori Linn* Híbrido "Pílamo 1", suministrado por la empresa SEDACOL localizada en la vía Florida-Risaralda.

Las muestras se recolectan en SEDACOL y transportaron hasta el laboratorio de OLEOQUIMICA de la Universidad Tecnológica de Pereira, donde se almacenaron en bolsas plásticas a temperatura ambiente.

#### 3.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Las extracciones se efectuaron utilizando agua como solvente y variando las relaciones bisú:agua para determinar las mejores condiciones de extracción y empleando las siguientes técnicas:

- **Baño ultrasonido con calentamiento:** se empleó las relaciones bisú-agua 1.5:12, 1.5:16, 1.5:24 y la extracción se realizó por 2 horas en cada caso, utilizando un equipo ultrasonido de marca FISHER SCIENTIFIC con calentamiento en un rango entre (60-80) °C.
- **Microondas:** para cada una de las relaciones anteriores se realizó la extracción por microondas durante 2 minutos.
- **Baño ultrasonido con calentamiento-microondas:** alternando las técnicas Ultrasonido-Microondas y empleando las mismas relaciones bisú-agua anteriores las muestras se sometieron a baño ultrasonido durante 2 horas y posteriormente a microondas durante 2 minutos.
- **Baño ultrasonido con calentamiento, congelamiento y microondas:** en esta ocasión se combinaron las dos técnicas de extracción utilizando las mismas relaciones solvente-bisú pero adicionalmente se congelaron las muestras después de la extracción por ultrasonido. Las muestras se extrajeron por ultrasonido durante 2 horas se congelaron durante 24 horas y posteriormente se lleva al microondas durante 2 minutos.
- **Agitación magnética:** en esta técnica se empleo una relación diferente de bisú-agua con la intención de obtener la mayor cantidad de extracto

proteico; pues las relaciones anteriores no eran tan favorables para dicha extracción. Se usó una relación bisú-agua de 1.5:10, la muestra se agitó durante 30 minutos y el calentamiento se realizó mediante baño maría a una temperatura de 80° C.

Los extractos obtenidos se almacenaron en viales de polipropileno estériles y se congelaron para su posterior cuantificación por el método de Bradford.

### 3.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

**Método de Bradford:** se prepararon los patrones de albúmina sérica bovina en un rango de (0 a 10) µg/mL y se hizo la curva de calibración en el espectrofotómetro UNICAM UV-VISIBLE (UV<sub>2</sub>), utilizando el reactivo de Bradford y haciendo la lectura a una longitud de onda de 595nm.

Las muestras se prepararon de igual manera por triplicado para cada uno de los extractos obtenidos teniendo en cuenta el rango de concentración. A estas muestras ya preparadas se les realizó la cuantificación con el método colorimétrico usando el reactivo de Bradford, utilizando el protocolo previamente estandarizado (27).

### 3.4 LIOFILIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para eliminar la cantidad de agua a los extractos proteicos se usó un liofilizador de marca LABCONCO, con una temperatura del colector de -39°C a una presión de vacío de 0.76 E 10<sup>-3</sup> milibares y con un programa de temperaturas a una tasa de cambios y a una velocidad de 1.00°C/min durante 24 horas. El liofilizado se preservó en cajas de vidrio a una temperatura de -20° C para la caracterización por electroforesis.

### 3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA

La caracterización se realizó mediante técnicas electroforéticas, y para lo cual se emplearon los extractos proteicos liofilizados. Se empleó electroforesis vertical desnaturante en geles de acrilamida (SDS-PAGE vertical).

**Condiciones generales de corrida.** Se usó una cámara electroforética MINI PROTEAN II CELL Bio-Rad (Ver Anexo F) y se emplearon condiciones de separación estandarizadas en CENICAFE para proteínas de broca en investigaciones previas (28) empleadas igualmente en trabajos de sericultura (29).

**Electroforesis SDS- PAGE.**

- Preparación de la muestra:  
Tanto los patrones como las muestras de análisis se disolvieron en un buffer de carga compuesto por: (2-Hidroximetil-2-Metil-1,3 Propanodiol), Ácido clorhídrico (TRIS- HCl 1M), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, Glicerol al 50%, 2-β-Mercaptoetanol al 1%, Agua, Azul de Bromofenol al 1%(para observar el frente de corrida).
- Geles de separación:  
Se emplearon geles discontinuos compuestos por en gel de concentración al 4% el cual contiene Tris-HCl 0.5 M, SDS al 10% y un gel de separación al 15% en Tris-HCl 1.5 M, además como polímero se usó una relación del 30% de acrilamida y del 0.8% de bisacrilamida, como catalizadores de la polimerización se usaron Persulfato de Amonio al 10% (APS) y N, N, N, N-Tetrametil-Etilendiamina (TEMED).
- Separación electroforética:  
Fue llevada a cabo en un sistema “mini” para pequeños volúmenes de muestra (10-20)  $\mu$ L, empleándose el buffer de corrida compuesto por: (TRIS, SDS, Glicina), utilizando un patrón de pesos moleculares de 37.6 a 200.8 KiloDalton.
- Condiciones de corrida:  
La separación electroforética se realizó a un voltaje de 100V durante una hora y media.
- Tinción y revelado:  
Se realizo una mezcla de Acido Acético, Azul de Coomasie, Metanol y Agua, con agitación constante (agitador orbital marca LAB-LINE), y el revelado se hizo con una mezcla de Acido Acético y Agua. La anterior técnica se basa en estudios realizados por previos autores (29).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DESCRIPCIÓN DEL BISÚ Y DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

En el presente estudio se empleó el bisú, que es un subproducto del proceso industrial de obtención de seda, es una fibra corta, elástica, liviana y suave de color similar a la seda, el material de estudio presentaba una gran cantidad de suciedad a pesar de que hizo una limpieza mecánica no fue posible eliminar todas las impurezas adheridas, ya que el bisú se encuentra almacenado hace varios años sin protección del polvo, la humedad y muchos otros factores que pudieran afectar la calidad de los extractos. En los extractos se observaron residuos sólidos, color amarillo pálido y olor característico, para aminorar la cantidad de impurezas los extractos fueron filtrados para su posterior cuantificación.

### 4.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEÍCOS

Se emplearon diferentes relaciones solvente-bisú 1.5:12; 1.5:16; 1.5:24; 1.5:10, usando como solvente agua y cinco diferentes técnicas de extracción como son: microondas, ultrasonido con calentamiento, ultrasonido con calentamiento-microondas, ultrasonido con calentamiento-congelamiento-microondas y agitación magnética.

Todos los extractos obtenidos se cuantificaron por la técnica de Bradford ya que en trabajos anteriores (29) se encontró que presenta una mayor sensibilidad que otras técnicas colorimétricas. Se emplean los extractos sin liofilizar.

Los resultados de la cuantificación de cada uno de los extractos obtenidos se observan en la tabla 5.

Como se puede apreciar, en la extracción por microondas, se obtuvieron valores de concentración entre 1.33 y 0.85 mg/g de muestra logrados empleando relaciones bisú-agua 1.5:16 y 1.5:24 respectivamente, por este método se obtuvo una buena concentración de proteína aunque no la mejor con relación a otras técnicas empleadas. Este tipo de extracción es adecuado para obtener un extracto proteico de forma rápida pero el inconveniente de este método es la falta de control de la temperatura para evitar la degradación de la proteína.

Los resultados obtenidos a partir de la extracción realizada por ultrasonido con calentamiento son reportados en la tabla 5 como muestra 2. Se aprecian según los valores de concentración obtenidos oscilaron entre 1.07 y 0.83 mg/g de muestra logrados empleando relaciones bisú-agua 1.5:16 y 1.5:24 respectivamente,

observándose que no se logra una buena concentración como con ultrasonido con calentamiento-microondas, pero se ha demostrado en estudios anteriores (29) que la técnica es un buen método para la obtención de extractos proteicos de buena calidad.

De las técnicas de extracción empleadas la que arrojó los mejores resultados fue la combinación de ultrasonido con calentamiento- microondas (ver tabla 5).

Los promedios que se obtuvieron se encontraron entre 1.87 y 0.71 mg/g de muestra, logrados empleando relaciones bisú-agua de 1.5:16 y 1.5:24 respectivamente. Al parecer la extracción adicional con microondas complementa la realizada por ultrasonido con calentamiento. Es posible que la concentración sea mayor en esta técnica debido a que el rompimiento de la fibra se realiza por el ultrasonido y posteriormente el microondas realiza la extracción de la proteína.

La muestra número cuatro se trata inicialmente igual a la número dos, luego se somete a congelamiento buscando una mayor extracción de proteína al ser sometida al microondas. Los resultados obtenidos no fueron los esperados pues se obtuvo la más baja concentración en promedio de las técnicas empleadas 0.42mg/g de muestra con una relación agua-bisú 1.5:24 y la mayor concentración promedio lograda fue de 0.72mg/g de muestra con una relación agua-bisú 1.5:16.

A pesar de haber usado condiciones distintas en la relación agua-bisú la extracción realizada por agitación magnética dio resultados aceptables, reportando como mayor concentración 0,96mg/g de muestra y valores muy similares en sus respectivas réplicas indicando que el método es reproducible. La relación usada fue 1,5:10 de agua-bisú. No fue posible realizar más ensayos por no contar con las muestras necesarias. No se obtuvo la mayor cantidad de extracto de los ensayos realizados pero se puede afirmar que la técnica es apropiada para la extracción de proteína, sin embargo llevarla a cabo es complicado porque se requiere de mucho solvente y poca muestra para realizar una buena agitación y esto conlleva a un tiempo prolongado de liofilización dificultando el procedimiento.

En cuanto a la comparación de las relaciones cabe resaltar que en todas las extracciones las mayores concentraciones fueron en la relación bisú-agua 1,5:16 demostrando que esta relación es la más adecuada para la extracción del bisú.

La extracción por ultrasonido con calentamiento y microondas es la técnica por la que se obtuvo mayor cantidad de proteína y la concentración mas baja se obtuvo por ultrasonido con calentamiento-congelamiento-microondas siendo también esta la técnica menos reproducible de los ensayos.

Los datos más reproducibles fueron los obtenidos por microondas, reportando una desviación estándar de 0.02.

Se uso como patrón para la cuantificación la albúmina serica bovina (BSA) con un rango de patrones de 0 a 10  $\mu\text{g/ml}$  cuya curva de calibración se presenta en el la figura 3.

### 4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA

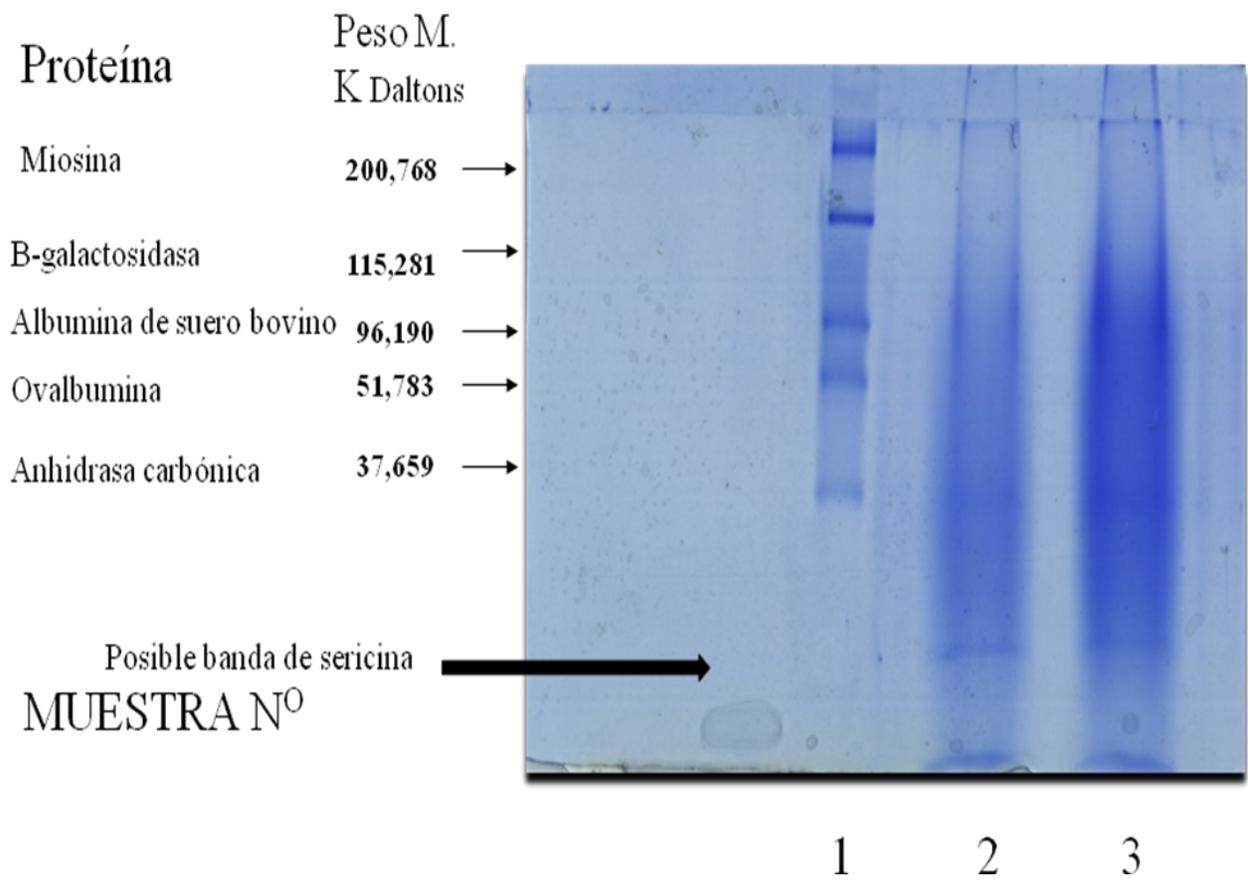
Para la caracterización se empleó electroforesis desnaturizante SDS-PAGE con todo los extractos liofilizados provenientes de las diferentes técnicas de extracción usadas y un patrón de pesos moleculares entre 37.659 y 200.768 KiloDalton.

Se hicieron varias electroforesis y solo se muestran los dos mejores resultados obtenidos de los geles realizados, los resultados obtenidos se exponen en las figuras 1 y 2.

Al realizarle electroforesis a las técnicas de ultrasonido con calentamiento, ultrasonido con calentamiento-microondas y ultrasonido con calentamiento-congelamiento y microondas, no se pudo obtener ningún resultado positivo; los geles realizados no presentaron ninguna banda y solo se podía apreciar un barrido en cada uno de los carriles en los que se había depositado la muestra.

**Tabla 6. Separación electroforética en SDS/PAGE**

Nº DE CARRIL	TIPO DE MUESTRA
1	MARCADOR DE PESO MOLECULAR
2	MICROONDAS
3	AGITACION MAGNETICA
4	AGITACION MAGNETICA
5	AGITACION MAGNETICA
6	MICROONDAS
7	MICROONDAS

**Figura 1. Gel electroforesis SDS 10%**

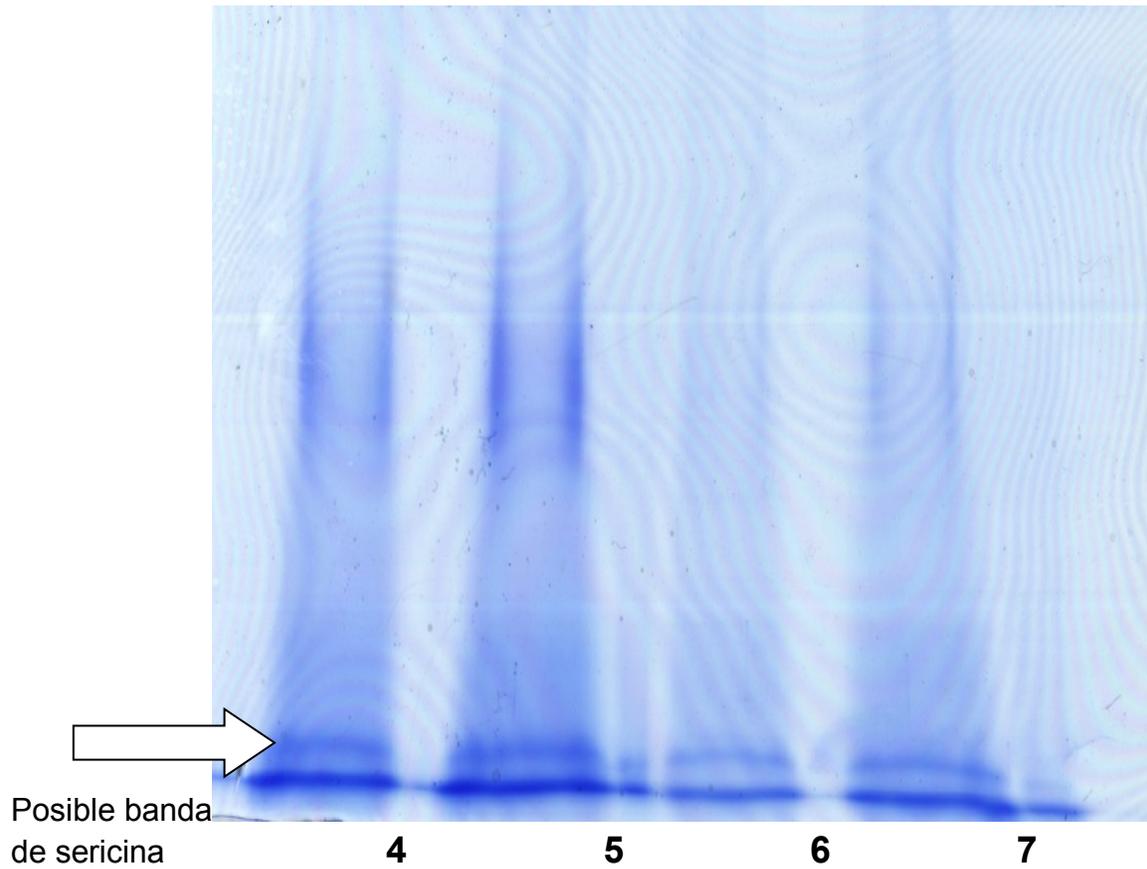
Es posible que la proteína se halla degradado. En estudios previos realizados a la sericina los autores realizaron la extracción con ultrasonido con calentamiento durante una hora y se obtuvieron muy buenos resultados al caracterizar la proteína y se pudieron observar bandas definidas. En este estudio las extracciones se realizaron durante dos horas con el fin de obtener la mayor cantidad de extracto proteico posible, pero nos sometíamos a una posible degradación de la proteína debido a la exposición prolongada al calor.

Esta es una posible explicación a los malos resultados obtenidos en los geles para dichas extracciones.

Como se aprecia en la figura 1 los carriles 2 y 3 provenientes de los liofilizados de microondas y agitación magnética respectivamente presentan un barrido sin bandas claramente definidas pero según la intensidad de la coloración, la proteína puede estar en alta concentración; al final del barrido se pueden observar dos bandas bien definidas con migración similar. En base al patrón de pesos moleculares usado, las bandas se encuentran por debajo de 37.659 KDalton que podría atribuirse la proteína de interés (sericina) que se encuentra en un rango de 21.1-29 KDalton acercándose mas a este ultimo coincidiendo con datos reportados por autores previos en trabajos de sericina (29) en donde se cataloga la sericina como una proteína de bajo peso molecular.

El carril 2 de la figura 1 y los carriles 6 y 7 de la figura 2 corresponden al mismo tipo de extracción (microondas), de igual manera el carril 3 de la figura 1 y los carriles 4 y 5 de la figura 2 corresponden a una misma extracción (agitación magnética) pero la diferencia en los geles es notoria, en el gel de electroforesis de la figura 1 se observa una considerable degradación de la proteína que no se observa en la figura 2, la diferencia radica en que antes de realizar los extractos para los carriles de la figura 2 se le realizo a la materia prima un lavado con agua fría buscando evitar la degradación de la proteína extraída, es posible que la suciedad presente en el bisú ayude a la degradación de la proteína al realizar el extracto.

El bisú usado como muestra de referencia no ha sido sometido a ningún tipo de tratamiento industrial, ni cocinado, suavizado o algún tipo de homogenizado al que es sometida la seda en sus lavados de desgome. Es por esperarse entonces que la sericina presente en los extractos obtenidos de bisú y en las bandas presentes en el gel de electroforesis sea de tipo A, la más soluble.

**Figura 2. Electroforesis Desnaturalizante (SDS)**

- 4: 15  $\mu$ l Agitación magnética
- 5: 20  $\mu$ l Agitación magnética
- 6: 10  $\mu$ l Microondas
- 7: 20  $\mu$ l Microondas

En la figura 2 en los carriles 4 y 5 se observaron bandas de intensidad importante de peso molecular superior a la posible banda de sericina; es posible haber recuperado una sericina tipo B esto debido a las condiciones de extracción empleadas; se realizo a una temperatura de 80°C a la cual es soluble no solo la tipo A sino también la tipo B.

Como se puede apreciar en la figura 2 en los carriles 4 y 5 se encuentran los extractos proteicos obtenidos por agitación magnética y en los carriles 6 y 7 por microondas. En el carril 4 se aprecian cuatro bandas, siendo la que se encuentra señalada en la figura 2 la que podría corresponder a la sericina por el bajo peso molecular, lamentablemente por falta de un patrón de proteína y de un patrón de pesos moleculares, no se pudo hacer una identificación definitiva, pero en comparación con resultados obtenidos en estudios previos realizados a la sericina que la describen como una proteína de bajo peso molecular es la que mas coincide. En cuanto al carril 5 que corresponde a agitación magnética presentó el mismo número de bandas, mostrando que la extracción en estos casos tuvo resultados similares en cuanto a la calidad del extracto se refiere. Las bandas de mayor peso molecular pueden atribuirse a la presencia de otras proteínas que se encontraban en la muestra de análisis.

Finalmente en los posos 6 y 7 se observan solamente dos bandas, que corresponden a los extractos proteicos obtenidos por microondas las cuales podríamos atribuir a la sericina.

En términos generales se puede observar que en este gel se obtuvo una buena separación electroforética con bandas un poco definidas y donde se puede evidenciar la presencia de la sericina. Se observan bandas de mayor peso molecular que podríamos atribuir a fragmentos de otras proteínas. En cuanto a la pureza de la proteína, se aprecian bandas adicionales que indican que seria recomendable hacer una purificación de los extractos proteicos previa a la corrida electroforética, además la sericina estaría migrando muy cerca del frente de la corrida indicando que las condiciones de separación no son las mejores, para futuros estudios sobre sericina en el análisis electroforético seria recomendable aumentar el porcentaje de SDS; superior al 15% ya que dicha proteína es de bajo peso molecular . Además la tinción de los geles se hizo con azul de comassie que es una técnica apropiada pero presenta baja sensibilidad y en algunos extractos obtenidos la concentraciones de proteína son muy bajas y no se aprecia ninguna banda en los geles revelados; sin embargo se podría hacer tinción con plata que es un técnica que tiene una sensibilidad de 20 a 200 veces mayor que el azul de comassie y así poder revelar las bandas presentes si las hay (26). Este tipo de tinción no se pudo realizar por no contar con los medios necesarios.

En cuanto a la cuantificación realizada por Bradford, el extracto con mayor concentración de proteína fue el obtenido con ultrasonido con calentamiento seguido de microondas pero al evaluar los extractos proteicos por electroforesis desnaturante al 10% y revelado con azul de comassie los mejores resultados se obtuvieron para los extracto por agitación magnética, indicando una mejor calidad, sin embargo debido a los barridos observados en la figura 1 es recomendable hacer un pre tratamiento a la materia prima bisú para mejorar la calidad del extracto proteico y así mejorar la calidad de la sericina.

Una purificación sencilla seria lavar el bisú con suficiente agua fría y luego ponerlo a secar a temperatura ambiente, es un proceso simple y rápido que arrojó muy buenos resultados al realizar los extractos usados para la electroforesis de la figura 2 pues no se observa el barrido que presenta la electroforesis de la figura 1 donde a la materia prima no se le realizó ningún tipo de lavado.

La calidad y procedencia del bisú se puede catalogar como una fuente de error ya que este tiene un tiempo prolongado de almacenamiento sin ningún tipo de higiene y expuesto a toda clase de contaminantes que a la hora de realizar el extracto pueden conllevar a la degradación de la proteína.

Otra posible fuente de error es la calidad de los extractos durante los procesos de extracción, en donde parte de la proteína se pudo haber degradado, por otra parte se pudo extraer impurezas contaminantes con los procesos drásticos como es el microondas y el ultrasonido que son dos tipos de radiaciones que interactúan de manera compleja con las moléculas.

Es recomendable realizar la extracción con ultrasonido con calentamiento solo durante una hora pues en este estudio aumentamos el tiempo de duración de la extracción tratando de obtener la mayor cantidad de extracto, pero lo que obtuvimos fue la degradación de la proteína debido a la prolongada exposición al calor.

No se pudo contar con un buen extracto para la elaboración de la electroforesis motivo por el cual no aparece reportado ningún gel de las extracciones realizadas con ultrasonido con calentamiento.

## 5. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto proteico del subproducto bisú con 5 diferentes técnicas de extracción (ultrasonido, microondas, ultrasonido-microondas, ultrasonido-congelamiento-microondas y agitación magnética) utilizando en cada caso 3 relaciones diferentes bisú-agua y realizando cada determinación por triplicado se demostró que la relación agua-bisú que permite una mayor concentración en la extracción es 1.5:16.
- Se realizó la cuantificación de los extractos proteicos obtenidos del subproducto industrial de seda “bisú” por la técnica colorimétrica de Bradford, encontrándose que la mejor técnica de extracción de los ensayos en este estudio (ultrasonido, microondas, ultrasonido-microondas, ultrasonido-congelamiento-microondas y agitación magnética) es ultrasonido con calentamiento por 2 horas seguido de 2 minutos de microondas empleando una relación bisú-agua 1.5:16 obteniéndose una concentración máxima en promedio de 1.87mg de proteína por gramo de materia prima.
- Se realizó el análisis electroforético de todos los extractos proteicos de bisú obtenidos utilizando electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) en cámaras verticales (MINI PROTEAN II CELL Bio-Rad), con las condiciones de corrida estandarizadas por Cenicafé para proteínas de broca y haciendo la tinción con azul de comassie; la identificación de la sericina se aseguro en los extractos proteicos obtenidos por agitación magnética y microondas pues se presentaron bandas de bajo peso molecular atribuidas a la sericina.
- Según el análisis electroforético en condiciones desnaturizantes empleando (SDS- PAGE) y siguiendo el protocolo para proteínas de broca, se encontró que el extracto proteico del bisú obtenido con la técnica agitación magnética presenta la mejor calidad.

## 6. RECOMENDACIONES

- Para trabajos posteriores usar mayor cantidad de extracto proteico y utilizar una forma de tinción más sensible como plata.
- Llevar a cabo la extracción por ultrasonido durante un tiempo de exposición mas corto para que se pueda realizar la separación electroforética a los extractos obtenidos mediante esta técnica.
- Se recomienda hacer un pre-tratamiento a la materia prima que puede ser un lavado con agua fría para eliminar los contaminantes que puedan accionar posteriores errores en los análisis.
- Realizar un trabajo en donde se comparen las propiedades del bisú y la borra para establecer cual de los dos contiene mayor cantidad de sericina y sus características.
- Usar un porcentaje mayor de entrecruzamiento al realizar el gel de electroforesis para evitar que la banda de sericina quede tan cerca al frente de corrida.



## BIBLIOGRAFIA

1. TORRES M. Sericultura colombiana, publicación centro de desarrollo tecnológico se Sericultura- CDTS, No.27, año 5 Noviembre de 2001, p. 7-9.
2. Informe de rectoría al consejo superior de la Universidad Tecnológica de Pereira, publicado el 3 de Octubre del 2006 por publicaciones UTP.
3. SORIA S. Boletín Andino de la Seda, Publicación de Red Andina de la Seda, Año 2 No. 5 Mayo de 2005.
4. SALAMA A.Boletín Andino de la Seda, Publicación de Red Andina de la Seda, Año 2 No. 4 Febrero de 2005.
5. CASTAÑO J.J. Seda natural, muy natural. En: El Tiempo: sección opinión, 7 de Mayo de 2005, p. 1-32.
6. KIM M. H. Sericultura colombiana, publicación del Centro de Desarrollo Tecnológico de Sericultura CDTS, No. 27. Año 5 Noviembre del 2001, p. 7-9.
7. TORRES M. Sericultura colombiana, publicación del Centro de Desarrollo Tecnológico de Sericultura CDTS, No. 41. Año 8 Mayo del 2001, p. 9.
8. CIFUENTES C.; Cesar A. y SOHON, K.W. Manual Técnico de Sericultura (cultivo de la morera y cría del gusano de seda en el trópico). Pereira. Convenio CDTS-SENA, Año 2002, Cap 1, p. 23-31.
9. GARCIA J. Boletín Andino de la Seda, publicación de la Red Andina de la Seda, Año 2 No. 5, mayo de 2005, p.4-5.
10. IBARRA S. 2do Curso Latinoamericano de Sericultura Tropical, Memorias, Mayo 11 al 22 de 1998, Pereira, Risaralda, Colombia, publicación del Centro de Desarrollo Tecnológico de Sericultura CDTS, sección: Gusano de Seda, Fisiología del gusano de seda, p. 7-8.
11. ARTEAGA D. Revista Cimpec, La prodigiosa historia de la seda, enero-marzo, año 12, No. 46, p.32-35.
12. ECHEVERRIA J. 2do Curso Latinoamericano de Sericultura Tropical, Memorias, Mayo 11 al 22 de 1998, Pereira, Risaralda, Colombia, publicación del Centro de Desarrollo Tecnológico de Sericultura CDTS, sección: El capullo y el hilo de seda, p.1-12.

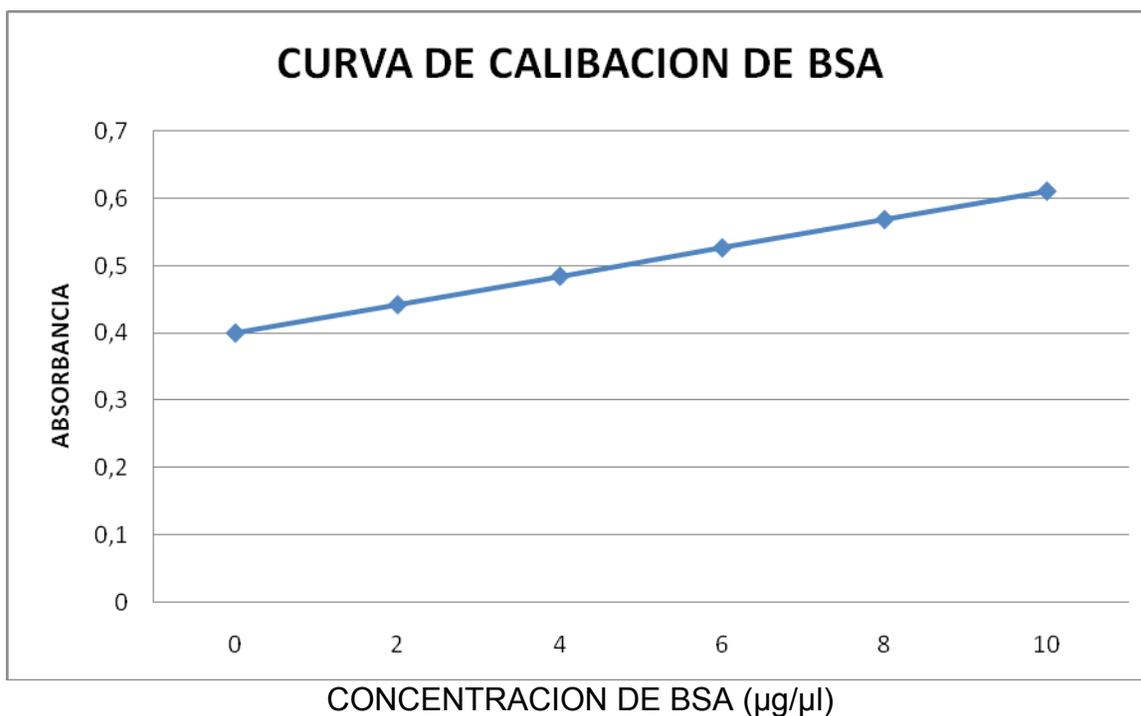
13. LACERCA Alberto M., Cría del gusano de seda, editorial Albatias, 1983, p. 181-188
14. CIFUENTES C.; Cesar A. y SOHON, K.W. Manual Técnico de Sericultura (cultivo de la morera y cría del gusano de seda en el trópico). Pereira. Convenio CDT-SENA, Cap 10, p. 393-402.
15. CARDONA M. Hilos de seda. En: Cromos, reporte especial, 12 de febrero del 2006, p.48-52.
16. Desconocido. Técnicas del ultrasonido, disponible en línea en: <http://www.intec.arcrude.edu/grupos/transferencia/Ultrasonido/cuerpoultrasonido>, visitada 15 Febrero 2008.
17. GAO M., LIU C. 2005. "Comparison techniques for the extraction World Journal of Microbiology & Biotechnology, Cap 21: 1461-1463.
18. MASON, T. J. 1999. "Sonochemistry: current use and future prospects in the chemical and processing industries". Philosophical Transactions of The Royal Society A: Mathematical Physical and Engineering Sciences, Pag. 355-369.
19. ROSTAGNO M., PALMA M., BARROSO C., 2003. "Ultrasound-assisted extraction". Journal of Chromatography Pag. 119-128.
20. VINATORU M., 2001. "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs". Ultrasonics Sonochemistry. Cap 8, pag. 303-313.
21. MULET A., CARCEL J. A., BON, J., San Juan 2003. "New food drying technologies- Use of ultrasound". Food Science and Technology International. Pag. 215-221.
22. DJILINI A., LEGSEIR B., SOULIMANI R., DOCKO A., YOUNOUS, C. 2006. "New extraction technique for products natural", *Journal of Brazilian Chemical Society*. Cap.17 Pag. 518-520
23. BADUI S., Química de los alimentos, 5 reimpresión, Editorial Alabama mexicana, México 1999, p. 648.
24. RYSZARD H. Grupo de investigación de la Universidad Javeriana, Disponible en internet en: <http://www.javeriana.edu.co> /Ciencias/neurobioquimica /electroforesis

25. AMÁRITA; Lenhinger, Principios de Bioquímica, España 2002, Cap 3, p.26
26. KOWSLOSKI F. Electroforesis de proteínas, Disponible en internet en: [http://www.bioquimica.fcien.edu.uy/practicas/3\\_protocolo\\_electroforesis\\_proteinas\\_2006.pdf](http://www.bioquimica.fcien.edu.uy/practicas/3_protocolo_electroforesis_proteinas_2006.pdf), encontrada el 23 de mayo de 2008.
27. CAPRETTTER.; David. Determinación de Proteínas Totales, Método de Bradford. Universidad de Rice, 24 de Mayo 1995 Cap. 5.
28. BOLLAG, Daniel M. y EDELSTEIN, Stuart J. Métodos de Proteínas. Departamento de Bioquímica. Universidad de Génova. Swrtzerland. Abril de 1994 Cap. 7.
29. ARIAS, Marcela y ARIZA, Carolina. Extracción y caracterización del extracto proteico de los residuos provenientes del proceso de desgomado de una empresa productora de seda. Pereira 2004. Tesis Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Departamento de Química.

**Figura 3. Curva de calibración para determinar proteínas por Bradford**

		<b>AJUSTADA POR MINIMOS CUADRADOS</b>	
<b>CONCENTRACION X</b>	<b>ABSORBANCIA Y</b>	<b>CONCENTRACION</b>	<b>ABSORBANCIA</b>
0	0.401	0	0.401
2	0.454	2	0.443
4	0.483	4	0.485
6	0.521	6	0.527
8	0.546	8	0.569
10	0.632	10	0.611

LEIDO A UNA LONGITUD DE ONDA 595nm



Coefficiente de correlación lineal: 0.982

Ecuación:  $Y = 0.02099 \cdot X + 0.401$

## **ANEXOS**

### **ANEXO A**

#### **CAPULLOS DEL GUSANO DE SEDA**



### **ANEXO B**

#### **GUSANO DE SEDA**



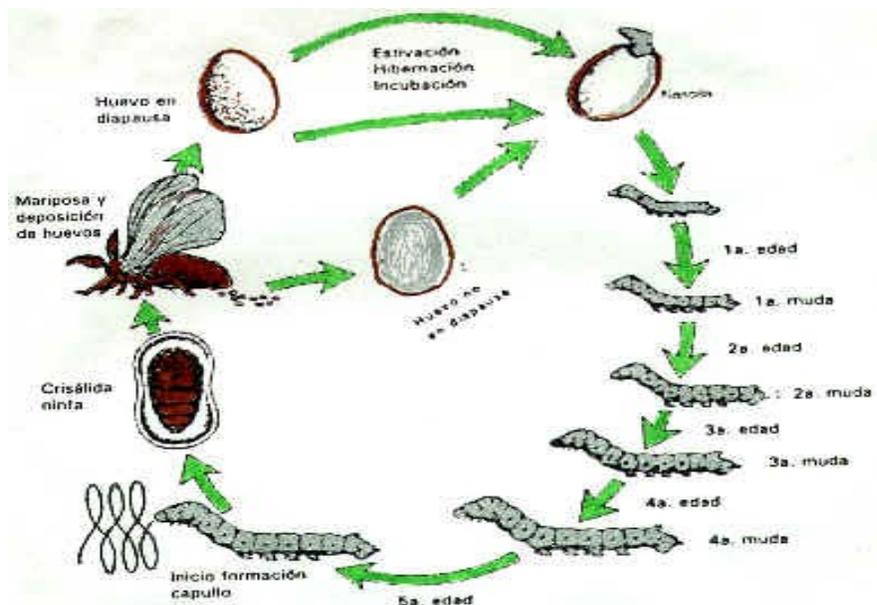
## ANEXO C

### LA MORERA



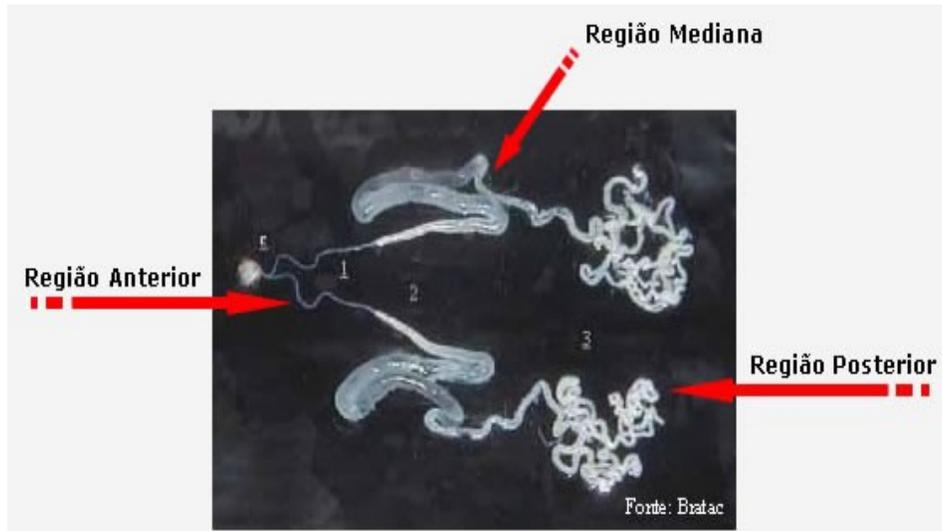
## ANEXO D

### CICLO BIOLÓGICO



## ANEXO E

### GLANDULA SERICIGENA



## ANEXO F

### CAMARA ELECTROFORETICA

