

Determinación de la estabilidad e irritabilidad del hidrolizado de sericina

Hector Correa-Rivero*, Elaine Díaz-Casañas, Osmel Bernal Veitía, Yolanda Malvarez Fernández

Dirección de Producción, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

*Correo electrónico: hcorrea@censa.edu.cu

Recibido: 8 de enero de 2020

Revisado: 16 de abril de 2020

Aceptado: 17 de abril 2020

RESUMEN

La sericina es una proteína globular que se obtiene a partir de los capullos del gusano de seda *Bombyx mori* y tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. El objetivo de este trabajo fue determinar la estabilidad e irritabilidad dérmica y oftálmica del hidrolizado de sericina (líquido). 3 lotes producidos a escala piloto se almacenaron en frascos de polietileno de alta densidad en diferentes condiciones de temperatura: 40 ± 2 °C por 6 meses y temperatura hasta los 30 °C durante 18 meses. Se hizo una evaluación fisicoquímica y microbiológica a tiempo inicial y 1, 2, 3, 6 meses (acelerada) y 3, 6, 9, 12, 18 meses (anaquel). Se llevaron a cabo los estudios toxicológicos correspondientes a productos con fines cosméticos. Se constató que las características organolépticas, densidad, el pH, la concentración de proteínas y la identidad de los lotes en las dos condiciones de temperaturas y no hubo variación significativa en el tiempo del estudio. Se definió el tiempo de vida útil del producto en 18 meses. Se concluyó que el hidrolizado de sericina en frascos de polietileno de alta densidad es estable a temperaturas hasta 30 °C durante 18 meses y no clasificó como irritante dérmico, ni oftálmico.

Palabras clave: Sericina, estabilidad, irritabilidad.

SUMMARY

Determination of the stability and irritability of the sericin hydrolyzate

Sericin is a globular protein that is obtained from the cocoons of the *Bombyx mori* silkworm and has applications in the pharmaceutical, food and cosmetic industries. The objective of this work was to determine the stability and dermal and ophthalmic irritability of the sericine hydrolyzate (liquid). 3 batches produced on a pilot scale were stored in high density polyethylene bottles under different temperature conditions: 40 ± 2 °C for 6 months and temperature up to 30 °C for 18 months. A physical-chemical and microbiological evaluation was performed at initial time and 1, 2, 3, 6 months (accelerated) and 3, 6, 9, 12, 18 months (shelf). Toxicological studies corresponding to products for cosmetic purposes were performed. It was found that the organoleptic characteristics, density, pH, protein concentration and the identity of the lots in the two temperature conditions, there was no significant variation in the study time. The shelf life of the product was defined in 18 months. It was concluded that the sericin hydrolyzate in high density polyethylene bottles is stable at temperatures up to 30 °C for 18 months and this product did not classify as dermal or ophthalmic irritant.

Keywords: Sericin, stability, irritability.

INTRODUCCIÓN

La proteína sericina es un polímero natural producido por el gusano de seda *Bombyx mori* [1]. Esta glicoproteína es soluble en agua y es 25%-30% del peso del capullo; además actúa como un adhesivo que une dos filamentos de fibroína para formar el hilo de seda [1, 2]. La molécula es hidrófila con un peso molecular que varía de 20 a 400 kDa y consta de 18 aminoácidos (incluidos los esenciales). Los grupos polares (grupos carboxilo, hidroxilo y amino) de las cadenas laterales de aminoácidos y su composición orgánica, solubilidad y la organización estructural permite la reticulación, las copolimerizaciones y las combinaciones con otros polímeros, que en conjunto transmiten propiedades únicas a la sericina, que hacen de esta un producto antioxidante, hidratante, cicatrizante, antibacteriano, con protección antimicrobiana, que también protege de la radiación ultravioleta y es antitumoral [3-5].

Con el desarrollo de la sericultura en Cuba, la producción de derivados del gusano de seda está en auge, entre ellos el hidrolizado de sericina, materia prima de la industria

cosmética [6]. El Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria con la Entidad de Ciencia, Tecnología e Innovación “Sierra Maestra” diseñaron, desarrollaron, registraron y comercializan el hidrolizado de sericina (líquido), que se obtiene a través de un proceso de extracción y purificación de esta proteína presente en el capullo del gusano de seda.

La seguridad y la eficacia de los productos están influenciadas no solo por sus propiedades intrínsecas sino por su estabilidad en el tiempo, por lo cual fue necesario, determinar el tiempo de vida útil e irritabilidad dérmica y oftálmica de este producto para fines cosméticos, lo que constituyó el objetivo de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los 3 lotes producidos a escala piloto se identificaron como HS01, HS02 y HS03 y fueron envasados en frascos de 100 mL de polietileno de alta densidad, con tapón de goma y retapa de aluminio, una de las presentaciones en las que se propone para circular en el mercado.

Se tomaron cantidades suficientes de producto de cada lote para evaluar sus características fisicoquímicas y microbiológicas en el tiempo inicial y a los 1, 3 y 6 meses para la estabilidad acelerada en condiciones de temperatura controlada en 40 ± 2 °C. Para la estabilidad en anaquel la condición de almacenamiento fue a temperatura ambiente que en Cuba tiene una media anual de 25 °C. Según las regulaciones vigentes [7] en los productos que no requieren refrigeración, la condición de almacenamiento en anaquel en la zona climática donde se encuentra Cuba es hasta 30 °C. El estudio se realizó durante 18 meses y las evaluaciones fueron en tiempo inicial y a los 1, 3, 6, 9, 12, 18 meses.

Características organolépticas

Se evaluó la apariencia física en cuanto a olor y color, mediante la utilización de los órganos sensoriales [8,9].

Concentración de proteínas

El análisis de la concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry [10], que es de tipo colorimétrico. Se utilizó dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% para diluir las muestras y se empleó albúmina de suero bovino (BSA) como patrón [11].

Identidad por electroforesis en geles de acrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS PAGE)

Se determinó la identidad por electroforesis en geles de acrilamida con SDS. El principio del método se basa en que la carga eléctrica que poseen las moléculas de proteínas,

las cuales migran a diferentes velocidades cuando se le aplica un campo eléctrico al sistema, a un pH previamente establecido, así se logró la resolución de una mezcla de proteínas [12].

pH

El pH se determinó con un pH-metro marca Mettler-Toledo y se consideró como límite de aceptación entre 4 y 6, según las características propias de la formulación.

Límite microbiano

Se procedió según lo establecido por la *The United States Pharmacopeia, USP 41* [13] para determinar el total de microorganismos viables aerobios e identificar las especies de microorganismos aislados [9] por el método de placa vertida o número más probable (NMP).

Irritabilidad

Los estudios de irritabilidad se desarrollaron de acuerdo con las guías generales para los ensayos de sustancias químicas de la *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), en los principios de *Buenas prácticas de laboratorio* (BPL), según las leyes aplicadas al bienestar y cuidado humanitario de animales de laboratorio [14, 15], así como los lineamientos éticos trazados por la Organización Mundial de la Salud [16]. Los procedimientos se refinaron para minimizar la incomodidad, angustia o dolor de los animales.

Oftálmica. Se usaron 3 conejos albinos de Nueva Zelanda, adultos jóvenes de 1,8 a 2 kg de peso. El producto se aplicó con una jeringuilla de 1 mL (0,1 mL, sin aguja), directamente en el borde superior del limbo corneal, se separó el párpado inferior para evitar el derrame del producto, así este quedó en el saco conjuntival. Una vez administrado el compuesto el ojo tratado debió permanecer cerrado por espacio de 15 segundos, para ello se ejerció una ligera presión con los dedos índice y pulgar sobre los párpados. El otro ojo se tomó como control y no recibió tratamiento alguno. Se empleó en el examen de los ojos una solución de fluoresceína de sodio al 2 % para visualizar una eventual degradación de la córnea y un iluminador manual.

Dérmica. Se emplearon 3 conejos albinos de Nueva Zelanda, adultos jóvenes de 1,8 a 2 kg de peso. El producto se aplicó en una de las dos áreas depiladas de cada animal (6 cm²), la cual se cubrió con un parche de gasa estéril. El área de la piel sin tratar de cada animal se utilizó como control. La sustancia en estudio se mantuvo expuesta en el sitio de la piel cubierto con el parche de gasa estéril durante 4 h.

Al retirarse cada parche se lavó la zona de aplicación con solución de cloruro de sodio 0,9 % estéril. Inmediatamente después de retirar el parche, se examinó a los conejos para detectar signos de eritema o edema, luego a los 60 minutos y a las 24, 48 y 72 h, luego, se registraron las reacciones dérmicas observadas [17]. El periodo de observación se mantuvo durante 14 días después de la administración de la sustancia en estudio.

Análisis estadístico

Se empleó el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., EUA) para verificar si existían diferencias entre los lotes con respecto a las variables pH y concentración de proteínas.

RESULTADOS

Los resultados de la evaluación inicial realizada a los 3 lotes mostraron una buena reproducibilidad tecnológica. En cuanto a sus características organolépticas no se observaron cambios perceptibles, ni se detectaron signos visuales de inestabilidad física. Todos los lotes tanto en el estudio de estabilidad acelerada como en anaquel mantuvieron las especificaciones de calidad establecidas con una apariencia líquido claro de color amarillo pálido y también se mantuvo su olor característico.

En la figura 1 se puede apreciar que la concentración de proteínas tanto en el estudio de estabilidad acelerada como en el anaquel se mantiene en el intervalo 4-8 mg/mL durante el estudio de estabilidad de los lotes.

En la figura 2 se observa la presencia de la sericina, el hidrolizado de esta proteína obtenido en los 3 lotes evaluados (tanto en anaquel como en estabilidad acelerada) mostró una talla de 40-66 kDa. Donde L1 A: lote 1 estabilidad anaquel y L1 Ac: lote 1 estabilidad acelerada y así sucesivamente con los 3 lotes estudiados.

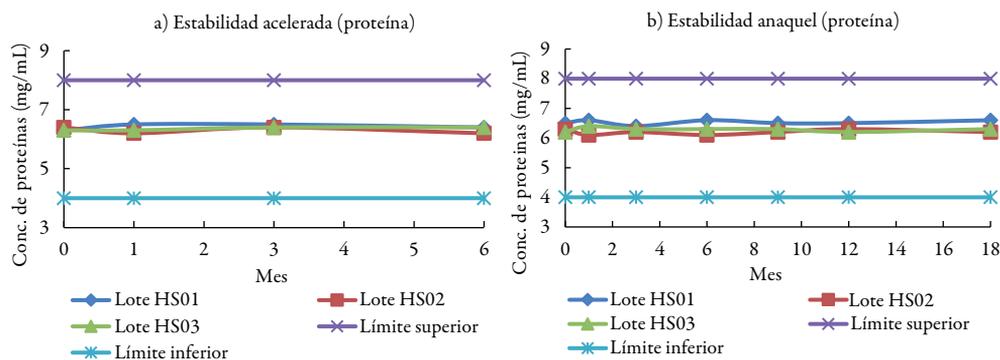


Figura 1. Resultados del contenido de proteínas: a) acelerada; b) anaquel.

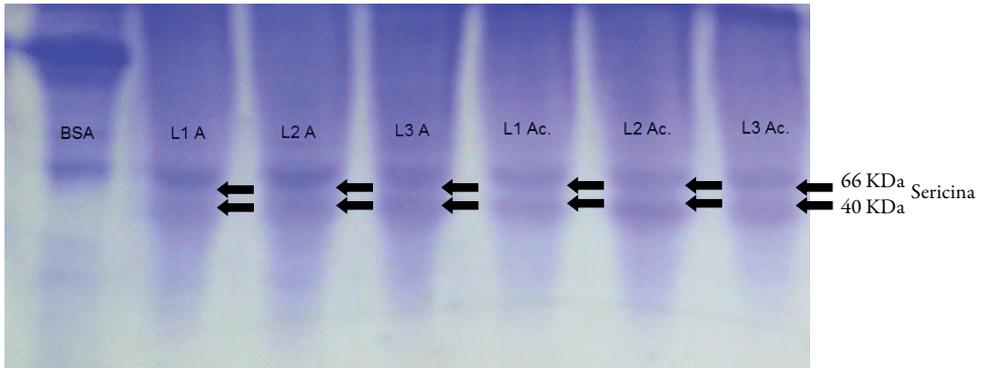


Figura 2. Patrón electroforético (SDS-PAGE) del hidrolizado de sericina.

El producto se diseñó con un pH en el intervalo de 4 a 5. En este sentido, tanto en el estudio de estabilidad acelerada y en anaquel, el pH de todos los lotes fue estable y no se manifestaron diferencias significativas entre los lotes durante los diferentes tiempos, lo que se puede apreciar en la figura 3.

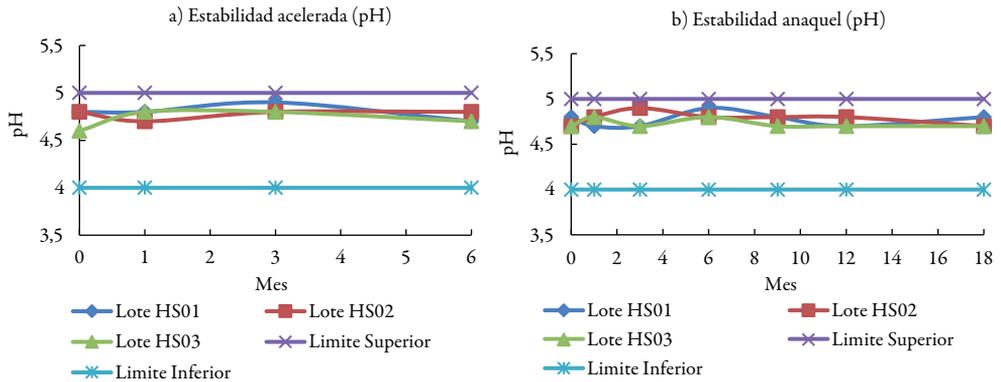


Figura 3. Resultados del pH en el tiempo: a) acelerada; b) anaquel.

Todos los lotes cumplieron con las especificaciones de límite microbiano establecidas, donde el conteo total de bacterias aerobias estuvo por debajo de 10^3 UFC/mL y el conteo total de hongos no fue superior a 20 UFC/mL, además no hubo presencia de los microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* ni de otras enterobacterias [9, 13].

En los ensayos de toxicidad la aplicación dérmica y oftálmica del hidrolizado de sericina hechos en animales de experimentación no provocaron alteraciones dérmicas ni oftálmicas. En ambos ensayos un valor de índice de irritación primario y ocular igual a cero. Como se puede apreciar en las tablas 1 y 2 respectivamente.

En ambos ensayos no se observaron otros signos clínicos en los animales. No fue necesaria la toma de muestras de piel para el estudio histopatológico. El producto en estudio se clasifica como no irritante dérmico y ni ocular por los resultados en las condiciones experimentales evaluadas.

Tabla 1. Resultados del ensayo de irritación dérmica del producto en conejos.

Reacciones dérmicas observadas	Tiempo de observación (después de retirado el parche)					Índice de irritación primaria (IIP)
	0 h	1 h	24 h	48 h	72 h	
Eritema y formación de escaras	0	0	0	0	0	0
Formación de edema	0	0	0	0	0	0

Tabla 2. Resultados del ensayo de irritación oftálmica del producto en conejos.

Tiempo de observación (horas)	Lesiones oculares observadas		
	Córnea	Iris	Conjuntiva
1	0	0	0
24	0	0	0
42	0	0	0
72	0	0	0
Total (máximo valor 110)	0	0	0
Índice de irritación ocular (IIO)	0		

DISCUSIÓN

La estabilidad de los productos farmacéuticos depende de factores ambientales como temperatura, humedad, luz, y de factores relacionados con el producto entre los que sobresalen las propiedades físicoquímicas del principio activo y de los excipientes, la forma farmacéutica y su composición, los procesos de fabricación, la naturaleza y propiedades del envase utilizado. Es por ello que el estudio de estabilidad es la principal herramienta para evaluar la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento para los productos [18].

En este caso el producto no es un medicamento, pero si una materia prima registrado para elaboración de productos cosméticos. Según los resultados antes expuestos, el producto mantiene sus propiedades fisicoquímicas y sus características en las condiciones y periodo de almacenamiento evaluadas, lo que concuerda con lo que establecen las regulaciones para este tipo de producto, así se definió su periodo de validez [18].

La concentración del ingrediente activo es fundamental porque de esta depende la actividad biológica, con la concentración de proteína de seda (sericina) que posee el producto se pueden fabricar productos cosméticos y farmacéuticos. La sericina de esta formulación se corresponde con la fracción de mayor solubilidad en agua, atendiendo al proceso (altas temperaturas) mediante el cual se obtuvo. Según Kunz *et al.* [19], los diversos métodos de extracción de sericina, su origen y la variedad de capullo, proporcionan diferentes características y peso molecular, lo que puede reflejarse además en propiedades biológicas.

Como se ha mencionado anteriormente, el peso molecular de la sericina se ve afectado por factores como la temperatura, el pH y el tiempo del proceso de extracción que se utilice, en este caso se obtuvieron dos bandas de aproximadamente de 40 y 60 kDa, respectivamente, esto es similar a lo reportado por Çapar y Aygün [20], quienes determinaron el peso molecular por métodos cromatográficos. Otros autores [21, 22] han obtenido sericina con fracciones de peso molecular entre 12 y 66 kDa; 50 y 150 kDa; 100 y 200 kDa.

La determinación del pH es necesaria para detectar cualquier alteración de este indicador durante el almacenamiento, lo que asegura que el valor de pH del hidrolizado de sericina es compatible con los componentes de la formulación. El pH en todos los lotes fue estable y no se manifestaron diferencias durante el periodo de almacenamiento en los diferentes tiempos evaluados, sin que excediera los límites establecidos para este producto. En este caso el pH se estableció sobre lo ácido y lo más cercano posible al de la piel, ya que uno de los componentes de la formulación es efectivo solo en condiciones ácidas [23].

En ambos estudios de estabilidad, tanto en acelerada como en anaquel, los 3 lotes cumplieron con el límite microbiano, que permiten controlar la carga microbiana en procesos como la purificación, la formulación y el envase. Estos resultados demostraron que la selección del envase final contribuyó a que el producto se mantuviera dentro de las especificaciones establecidas por la USP 41 [13], aunque todas las funciones del acondicionamiento son importantes, puede afirmarse que la protección es el factor crítico ya que incide sobre la estabilidad del producto [24, 25].

En los ensayos de toxicidad, la aplicación dérmica y oftálmica del hidrolizado de sericina, realizados en animales de experimentación no provocaron alteraciones dérmicas ni oftálmicas, por lo que no mostraron signos clínicos que evidenciaran un proceso tóxico.

De forma general, los 3 lotes mantuvieron las especificaciones evaluadas dentro de los límites establecidos, lo que indica que fue certera la selección de los excipientes de la formulación, así como del envase, aspecto fundamental para garantizar la estabilidad del medicamento [24, 25]. Se concluyó que el hidrolizado de sericina en frascos de polietileno de alta densidad es estable a temperaturas hasta 30 °C durante 18 meses y no es irritante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la dirección del Proyecto Nacional de Sericultura de Cuba, especialmente a la ECTI Sierra Maestra por su contribución al financiamiento de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. R.I. Kunz, R.M. Costa, L.F. Chasko, M.R. Marçal, Silkworm Sericin: Properties and biomedical applications, *Biomed. Res. Int.*, **2016**, 8175701 (2016).
2. M. Mondal, K. Trivedy, S.N. Kumar, The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori Linn*, a review, *Caspian J. Environ. Sci.*, **5**(2), 63-76 (2007).
3. P. Aramwit, S. Kanokpanont, W. De-Eknamkul, T. Srichana, Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericina, *J. Biosci. Bioeng.*, **107**(5), 556-561 (2009).
4. T. Wei, M.Z. Li, R.J. Xie, Preparation and structure of porous silk sericin materials, *Macromol. Mater. Eng.*, **290**(1), 188-194 (2005).
5. J.H. Wu, Z. Wang, S.Y. Xu, Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater, *Food Chem.*, **103**(4), 1255-1262 (2007).

6. M.C. Pérez-Hernández, *Sericultura: bases científicas para su desarrollo sostenible en Cuba*, tesis doctoral, Instituto Nacional de Ciencia Agrícolas (INCA), 2017.
7. Regulación 24, *Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de nuevos ingredientes farmacéuticos activos*, CECMED, La Habana, 2000.
8. NC-26-131, *Medicamentos veterinarios. Líquidos de administración oral o de uso externo, especificaciones generales de calidad*, CECMED, La Habana, 1985.
9. Regulación N.º 37, *Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos*, CECMED, La Habana, 2012.
10. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **132**, 265-275 (1951).
11. J.A. Whitsett, B.L. Ohning, G. Rose, J. Meuth, T. Weaver, Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant used for replacement therapy, *Pediatr. Res.*, **20**, 460 (1986).
12. A.H. Gordon, Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels, en: *Laboratory techniques, biochemistry and molecular biology*, T.S. Work, E. Work, editors, Academic Press-Elsevier, New York, 1973.
13. *Farmacopea USP 41*, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Washington, D. C., 2018, p. 176, 253.
14. OECD, *Guideline for testing of chemicals*, OECD 405, Acute Eye Irritation/Corroton, 2012.
15. Regulación N.º 97-2012, Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos CECMED, La Habana, 2012.
16. WHO, *Draft regional guidelines on stability testing of active substances and pharmaceutical products*, URL: <http://www.emro.who.int/emp/media/pdf/EMR-C5312En.pdf>
17. OECD, *Guideline for testing of chemicals*, OECD 404, Acute Dermal Irritation/Corroton, 2015.
18. Regulación N.º 23-2000, *Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos*, CECMED, La Habana, 2000.

19. R.I. Kunz, R.M. Brancalhão, L.F. Ribeiro, M.R. Natali, Silkworm sericin: Properties and biomedical applications, *BioMed Res. Int.*, **2016**, 8175701 (2016).
20. G. Çapar, S.S. Aygün, Characterization of sericin protein recovered from silk wastewaters, *Turk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, **72**(3), 219-234 (2015).
21. R. Sothornvit, R. Chollakup, P. Suwanruji, Extracted sericin from silk waste for film formation, *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, **32**, 17-22 (2010).
22. P. Aramwit, O. Keongamaroon, T. Siritientong, N. Bang, O. Supasyndh, Sericin cream reduces pruritus in hemodialysis patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled experimental study, *BMC Nephrol.*, **13**, 119 (2012).
23. R. Kirk, R. Sawyer, H. Egan, "Composición y análisis de alimentos de Pearson", Compañía Editorial Continental. México, 2004.
24. V. Ratna, Stability of drugs: Packaging and stability, 2005, URL: <http://www.pharmainfo.net/free-books/stability-drugs?page=4961>.
25. G.A. Shabir, Review of pharmaceutical product stability, packaging and the ICH Guidelines, *Am. Pharm. Rev.*, **11**(1), 139-141 (2008).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

H. Correa-Rivero, E. Díaz-Casañas, O. Bernal-Veitía, Y. Malvarez-Fernández, Determinación de la estabilidad e irritabilidad del hidrolizado de sericina, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(2), 280-290 (2020).