



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO DE UN SISTEMA
ESTAMPADO MOLECULARMENTE
PARA LA RECUPERACIÓN DE
LACTOFERRINA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

IRIS ADRIANA MÉNDEZ PALACIOS



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**

México, D.F.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

PRESIDENTE	Prof. Raúl Aguilar Caballero
VOCAL:	Profa. María de los Ángeles Valdivia López
SECRETARIO:	Prof. José Mariano García Garibay
1º SUPLENTE	Prof. Alfonso Sebastián Lira Rocha
2º SUPLENTE	Profa. Lucía Cornejo Barrera

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

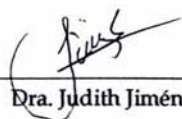
Área de Alimentos, Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

ASESOR



Dr. José Mariano García Garibay

SUPERVISOR TÉCNICO



Dra. Judith Jiménez Guzmán

SUSTENTANTE



Iris Adriana Méndez Palacios



(Foto RAPHO - Paris)

Es así como Dios nos salva,
no borrando nuestras miserias,
sino enseñándonos a caminar.

Dios te ama.
Tú eres precioso para El. Perdona y olvida
y comienza a hacer de tu vida algo hermoso para Dios.

Madre Teresa.

Dedicatorias:

Hoy, me siento orgullosa por haber alcanzado una de las más grandes metas de mi vida sin embargo, quiero hacer mención que no lo hice yo sola, a mi lado siempre estuvo una persona que ha sacrificado su vida y ha luchado contra todo para que llegara este momento. Por ello quiero hacer un reconocimiento y una dedicatoria especial a la mujer más importante y maravillosa que me ha regalado la vida.....mi Madre, a la cual siempre estaré agradecida por todo lo que ha hecho por mi.

Esto es por ti y para ti.

Te amo MAMÁ.

A mi padre:

Por toda la confianza y apoyo que me ha dado durante toda mi vida.

Con todo mi amor y respeto. Esto es para ti, te amo Papá.....

A mis hermanos:

A ti Paco, por ser como un padre para mi, por vivir conmigo los momentos más felices y difíciles de mi vida pero sobre todo, por ayudarme a salir adelante pues desde pequeña siempre fuiste y seguirás siendo mi ejemplo a seguir. Te amo manis.....

A Riquis y Gaby, por ser parte de mi vida y por enseñarme que uno de los más grandes y hermosos sentimientos es el que se tiene para con los hermanos. Los amo con todo mi corazón.

Al amor de vida, Rodrigo Pérez:

Porque además de ser el hombre al que amo es mi mejor amigo, por ayudarme y ser mi apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi carrera pero sobre todo, por estar conmigo y amarme a pesar de mis defectos.

Te amo mi Rorro, esto también es para ti.

Agradecimientos:

A Dios:

Gracias por permitirme llegar a esta etapa de mi vida, por darme la libertad de escoger mi camino, por estar siempre conmigo ayudándome, cuidándome y llenándome siempre de bendiciones pero sobre todo, por darme el mejor y más hermosos de los regalosa mi Madre.

A mi Madre:

Por darme la vida, por todo su amor, apoyo, comprensión, orientación y consejos. Gracias por enseñarme que no hay mejor mujer que aquella que lucha contra todo a pesar de los obstáculos y si alguna vez tropieza se levanta con la cara en alto y vuelve a dar lo mejor de si. A ti te debo todo lo que soy. Por ello ¡¡gracias Mamá!!.

A mi Padre:

Por ayudarme a ser una profesionista, por apoyarme y darme siempre la libertad de tomar mis decisiones con la finalidad de que me supere día con día, por creer en mi y darme siempre lo mejor de él, pero sobre todo porque gracias a él estoy en la más grande y hermosa Universidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por darme la oportunidad de formarme como profesionista y permitirme continuar mis estudios. Me siento orgullosa de pertenecer a esta mi Universidad por ello, le prometo llevar siempre en alto su nombre y ejercer mi carrera con orgullo y dignidad, porque soy y seguiré siendo PUMA de corazón.

A mi director de tesis el Dr. Mariano García Garibay:

Gracias por compartir conmigo sus conocimientos, por su ayuda, disposición y tiempo para la realización de este trabajo, pero sobre todo por creer en mi y por enseñarme con su ejemplo que para llegar a ser un excelente profesionista se necesitan cumplir dos condiciones: la primera, tener un amplio conocimiento en el campo de estudio y la segunda, tener un inmenso y humilde corazón. Toda mi admiración y respeto para Usted.

A mi asesora la Dra. Judith Jiménez Guzmán:

Gracias por su ayuda, confianza y enseñanza, por vivir junto conmigo los momentos buenos y malos de este proyecto, por ser una admirable profesionista y una extraordinaria persona, pero sobre todo por su inagotable paciencia y por el tiempo dedicado para la realización de la presente. Sin su ayuda no hubiera sido posible la culminación de la misma. Mil gracias.

Al Dr. Eduardo Bárzana García:

Agradezco su disposición, tiempo y sabios consejos, así como las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Al I.Q. Alberto López Luna:

Gracias por tu ayuda, por tu valiosa colaboración y por proporcionarme los conocimientos necesarios para este proyecto de investigación.

A mis sinodales:

Agradezco sinceramente su disposición y tiempo dedicado para la revisión y corrección de mi trabajo, así como sus acertadas observaciones al mismo.

A mis compañeros de la UAM Iztapalapa y UNAM (lab 314):

Por ayudarme cuando lo necesité, en especial a Christian Sarabia Leos.

A mis mejores amigas; Miriam Carmona y Alejandra López:

Gracias por ser mis amigas, mis consejeras y por todas las experiencias vividas a lo largo de mi carrera, por hacerme ver mis errores y por aceptarme tal y como soy.

Miriam, gracias por ser mi sostén cuando en algún momento sentía que ya no podía, tú sabes que a pesar de la distancia siempre seremos amigas.

Las quiero mucho.

A mis amigos Enrique, José Manuel (el Kame), Salomón, Andrea, Carlos, Armando (el chairó) y Patricia (la pato):

Por compartir conmigo los momentos más bellos e inolvidables de la facultad.

INDICE

Capítulo	Página
1- Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
2.1 Marco Teórico y Justificación.....	5
2.2 Objetivos.....	7
2.2.1 Objetivo General.....	7
2.2.2 Objetivos Específicos.....	7
2.3 Hipótesis.....	7
3. Antecedentes.....	8
3.1 Importancia de la leche como alimento funcional.....	8
3.2 Composición química y características de la leche.....	9
3.3 Proteínas de la leche.....	11
3.3.1 Caseínas.....	12
a. Caseína α_{s1}	13
b. Caseína α_{s2}	14
c. Caseína β	14
d. Caseína κ	14
3.3.2 Proteínas del suero de leche.....	15
a. β -lactoglobulina.....	17
b. α -lactoalbúmina.....	18
c. Albúmina sérica bovina.....	18
d. Inmunoglobulinas.....	18
e. Lactoferrina.....	19
3.3.3 Bioactividad de las proteínas del suero de leche.....	22
3.3.4 Bioactividad de la lactoferrina.....	24

Capítulo	Página
3.4 Técnica de Estampado Molecular.....	26
3.4.1 Monómeros funcionales.....	28
3.4.2 Agentes Entrecruzantes.....	29
4. Metodología.....	30
4.1 Diagrama general.....	30
4.2 Preparación del patrón de lactoferrina comercial	31
4.3 Caracterización del patrón de lactoferrina comercial.....	32
4.3.1 Determinación de proteína total.....	32
4.3.2 Determinación de azúcares reductores.....	34
4.3.3 Determinación de azúcares totales.....	35
4.3.4 Pureza y determinación de peso molecular	36
4.3.5 Identificación de proteína en gel de electroforesis.....	38
4.4 Purificación del patrón de lactoferrina comercial.....	39
4.5 Técnica para desarrollar el polímero estampado molecularmente.....	40
4.5.1 Remoción de la plantilla.....	41
4.5.2 Enfrentamiento del polímero estampado molecularmente con una solución compleja de lactoferrina.....	42
4.6 Técnica de complejación del Fe^{3+} con el ión SCN^-	43
4.7 Equipo utilizado.....	44
4.8 Diseño experimental y modelo estadístico.....	44

Capítulo	Página
5. Resultados y Discusión.....	45
5.1 Identificación, caracterización y purificación del patrón de lactoferrina comercial	45
5.1.1 Caracterización e identificación del patrón de lactoferrina comercial.....	45
5.1.2 Purificación del patrón de lactoferrina comercial.....	48
5.2 Desarrollo del polímero estampado molecularmente.....	54
5.2.1 Remoción de la plantilla.....	55
5.2.2 Enfrentamiento del polímero estampado molecularmente con una solución compleja de lactoferrina.....	56
5.2.3 Eficiencia en la capacidad de sorción del polímero estampado molecularmente determinado por electroforesis nativa.....	58
5.2.4 Eficiencia en la capacidad de sorción del polímero estampado molecularmente determinado por la técnica del Fe^{3+} con el ión SCN^-	63
6. Conclusiones.....	70
7. Perspectivas.....	72
8. Bibliografía.....	73
9. Apéndice.....	76
9.1 Curvas patrón.....	76
9.2 Espectro de absorción del Fe^{3+}	79

RESUMEN

La lactoferrina (LF) es una de las proteínas con mayor valor agregado del suero de leche debido a que ejerce importantes funciones en el ser humano; entre las principales se encuentran la actividad anticancerígena y la capacidad de acarrear minerales como el Fe^{3+} , sin embargo, purificarla del suero de leche es complicado, debido a que varias proteínas del mismo poseen una forma y un peso molecular muy parecido a ella.

El objetivo del estudio fue desarrollar un polímero estampado molecularmente (MIP) que permitiera la recuperación de la LF. Para ello se utilizó un patrón de LF comercial; se determinó que el contenido de proteína era de 56 %, además por medio de electroforesis nativa (EFN), se demostró que la muestra se encontraba contaminada. Se realizó una separación de la muestra por isoelectroenfoque, obteniéndose a la LF pura en las fracciones 11-14 con un pI de 8.0-8.4.

Para desarrollar el estampado molecular se utilizó como plantilla a la LF pura, y se sintetizaron 3 polímeros diferentes: el 1° hecho con 4-VYP¹ (MIP₁), el 2° con 4-VYP y MAA² (MIP₂), ambos a 60° C y el 3° con 4-VYP y MAA con luz UV (MIP₃). Estos polímeros se enfrentaron a soluciones impuras de LF y se determinó la disminución de proteína en los sobrenadantes. Solo el MIP₁ mostró capacidad de sorción de lactoferrina.

Con la finalidad de estudiar si el MIP₁ liga específicamente LF o bien a cualquier otra proteína se probaron técnicas más específicas para la determinación de LF, como la EFN y la determinación del Fe^{3+} por acomplejamiento con el ión SCN^- . Al comparar estos 2 métodos se observó que la EFN presenta una gran variabilidad a concentraciones altas de proteína, mientras que la reacción con SCN^- fue más precisa. Al comparar la concentración de LF en las soluciones enfrentadas al MIP₁ se observó una disminución significativa ($\alpha=0.6728$) del 27% con respecto a la solución original; por otro lado, al analizar los resultados obtenidos para el blanco se observa que la LF no disminuyó significativamente, demostrando que solo el MIP posee la capacidad de ligar específicamente LF.

En este trabajo se logró sintetizar un polímero capaz de ligar LF a partir de una solución compleja; aunque todavía se requieren estudios más profundos, se demostró que el estampado molecular es una técnica útil para lograr la purificación de proteínas de alto valor agregado.

¹VYP= vinilpiridina.

²MAA= ácido metacrílico

INTRODUCCIÓN

2.1 Marco Teórico y Justificación

El suero de leche es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Representa una mezcla muy variada de proteínas entre las que resaltan la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina y lactoferrina. Debido a que son proteínas globulares, compactas y poseen un PM muy parecido, lograr su separación a partir del suero de leche resultar ser muy complicado (García-Garibay y col., 1993).

La lactoferrina es una glicoproteína, monomérica, bilobal, que pertenece a la familia de las transferrinas. Tiene un peso molecular (PM) alrededor de 80 kDa y un pI = 8 (Farnaud y Evans, 2003). Está presente en secreciones como: lágrimas, saliva y fluidos seminales así como también abunda en el calostro y suero de leche (Tsuda y col., 2000). Es denominada la proteína roja de la leche debido a que posee dos sitios activos para ligar a la molécula de Fe^{3+} que es el que le da su color característico (Blackberg y Hernell., 1980).

Se ha demostrado que la lactoferrina ejerce importantes funciones biológicas en el organismo, por ejemplo: funciona como bacteriostático, ya que secuestra el hierro que necesitan las bacterias para su crecimiento (Tomé y Debbabi, 1998). Por otro lado una de las funciones que más auge ha tomado, es su actividad anticancerígena; los estudios que se han realizado han demostrado que una dieta suplementada con lactoferrina retarda la incidencia de cáncer en el colon en ratas tanto jóvenes como maduras (Buchhoz y Scheper, 2000). Existen reportes de que funciona como anti-inflamatoria, antioxidante y antimutagénica (Farnaud y Evans, 2003).

El estampado molecular es una técnica que se ha propuesto para la impresión de moléculas sencillas. Usualmente se ha reportado su uso en moléculas de bajo peso molecular, por ejemplo: azúcares, esteroides, drogas o péptidos pequeños, aunque todos los estudios publicados se han realizado en pequeña escala (Rachkov y Minoura, 2001; Piletsky y col., 2001). A la fecha existen gran variedad de metodologías y monómeros

propuestos, pero no se ha establecido una técnica específica, por lo que es necesario probar diferentes monómeros y condiciones dependiendo de la molécula a estampar.

El estampado molecular consiste en la selección de la molécula a estampar o plantilla, la cual se mezcla con una variedad de monómeros funcionales, de manera que formen un complejo, el cual es entrecruzado para fijar la posición de los monómeros funcionales alrededor de la plantilla. La remoción de esta molécula da paso a una cavidad que es selectiva para la plantilla y que no reconoce a cualquier otra molécula (Takeuchi y Haginaka, 1999).

En general la dificultad para fabricar materiales estampados se incrementa con el tamaño de la molécula seleccionada (Rachkov y Minoura, 2001), por tanto, si se logra establecer un método específico que permita la recuperación de la lactoferrina, entonces se obtendrán numerosas ventajas, como por ejemplo, un aumento en el valor comercial de esta proteína.

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo general desarrollar un polímero estampado molecularmente para lograr la recuperación de la lactoferrina, la cual es una de las proteínas con mayor valor agregado del suero de leche.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

- ✦ Desarrollar un polímero estampado molecularmente para la recuperación de lactoferrina.

2.2.2 Objetivos específicos:

- ✦ Caracterizar el patrón de lactoferrina comercial, determinando parámetros como concentración de proteína, azúcares reductores y totales, y pureza de la muestra.
- ✦ Purificar el patrón de lactoferrina comercial utilizando la técnica de isoelectroenfoque.
- ✦ Sintetizar un polímero estampado molecularmente, utilizando diferentes combinaciones de monómeros funcionales.
- ✦ Comprobar que el polímero estampado molecularmente es capaz de absorber lactoferrina a partir de una solución compuesta por varias proteínas, entre ellas la LF.

2.3 Hipótesis

Si el polímero estampado molecularmente es capaz de absorber lactoferrina a partir de una solución compuesta por varias proteínas, entonces se pueden crear nuevas técnicas que permitan la recuperación de esta proteína a partir del suero de leche o derivados.

ANTECEDENTES

3.1 Importancia de la leche como alimento funcional

La leche es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor ligeramente dulce y pH cercano a la neutralidad (Alais, 1998). Es la secreción de la glándula mamaria de una o más vacas sanas después de diez días del parto. Es un alimento conveniente, aceptable y extremadamente versátil ya que tiene propiedades que van más allá de ser un simple alimento.; posee un alto valor nutricional, por la riqueza y concentración de todos sus nutrimentos. Además, contiene todo lo necesario para permitir el desarrollo del recién nacido, como ácidos grasos indispensables, vitaminas, minerales y **proteínas**, por ello es el alimento que más se acerca a ser un alimento "ideal", (García-Garibay y col., 1993).

Además, la leche es un producto natural cuya función es servir como alimento durante la primera etapa de la vida cuando se debe sostener un crecimiento acelerado. El consumo humano de leche y productos lácteos de otras especies es tan antiguo que es imposible establecer su inicio histórico.

Por todo esto, desde tiempos inmemoriales el hombre ha hecho de la leche parte fundamental de su dieta por la gran cantidad de nutrientes que brinda y como materia prima de alto valor para la fabricación de diversos productos (García-Garibay y col., 1993).

3.2 Composición química y características de la leche.

De las más de 4000 especies de mamíferos que existen, se ha analizado la leche de aproximadamente 180, de estos análisis sólo cerca de 50 son considerados confiables. Por obvias razones, las leches mejor caracterizadas son aquellas de las principales especies de rumiantes y la humana (Fox y McSweeney, 1998).

La composición de la leche, aún dentro de la misma especie, puede variar en función de diferentes factores (Walstra y col., 2001) como son:

- a) Factores genéticos como son la especie (tabla 1), la raza y el individuo.
- b) La fase de lactación, la edad del animal, el número de lactaciones y la gestación. Es decir, factores fisiológicos.
- c) Los estados patológicos.
- d) La alimentación, el clima, el sistema de ordeño, esto es, factores ambientales y de manejo.

La leche es además un alimento funcional, pues aporta ciertos beneficios a la salud del recién nacido: mediante la leche la madre suministra a su cría todos los nutrientes que necesita, tanto para cubrir sus necesidades de energía (en forma de azúcares o grasa), como de proteínas, vitaminas y minerales. También le suministra sustancias biológicamente activas, como enzimas, factores de crecimiento y agentes protectores frente a los microorganismos. Hay que tener en cuenta que en los momentos inmediatamente posteriores al nacimiento, la cría no tiene todavía establecidos sus mecanismos inmunológicos de defensa, ni siquiera una flora intestinal propia, por lo que la leche contiene componentes que favorecen la proliferación de la flora beneficiosa e impiden la proliferación de una flora patógena (Spreer, 1992).

Muchas de las proteínas que se encuentran en la leche tienen funciones biológicas especializadas. Algunas de ellas actúan en la glándula mamaria, participando en la elaboración de componentes como la lactosa y la grasa.

Otras facilitan la asimilación por el lactante de algunos componentes de la leche, o intervienen en la protección del recién nacido frente a los microorganismos causantes de infecciones. Aunque estas proteínas se encuentran en pequeñas cantidades, su función biológica es claramente muy importante. Algunas de ellas pueden extraerse y emplearse en productos destinados a la mejora de la salud humana (Pedersen y Mollerup, 2003).

La Tabla 1 muestra la composición típica de la leche de las especies más explotadas en el mundo occidental, y de la leche humana. Su composición resulta muy notable, ya que la mayoría de sus componentes no se encuentran en ninguna otra parte del organismo. Así, la lactosa, que es el azúcar de la leche, no se encuentra en cantidad significativa en ningún otro tejido, animal o vegetal. Por lo que respecta a las proteínas, sucede lo mismo: las más abundantes son también exclusivas de la leche (García-Garibay y col., 1993).

Tabla 1. Composición de las principales leches comerciales y la humana (g/100g)
(García-Garibay y col., 1993).

Especie	Agua	ST ¹	SNG ²	Grasa	Proteínas	Lactosa	Minerales
Vaca	87.6	12.4	8.7	3.7	3.3	4.7	0.6
Cabra	87.0	13.0	8.5	4.5	3.3	4.6	0.6
Borrega	81.6	18.4	10.9	7.5	5.6	4.4	0.9
Humana	87.1	12.9	8.8	4.1	1.3	7.2	0.3

¹ST = Sólidos totales, ²SNG= Sólidos no grasos

Además de los componentes mencionados en la tabla 1, la leche contiene cientos de micro componentes, entre ellos están: vitaminas, iones metálicos, enzimas, etc.

3.3 Proteínas de la leche.

Las proteínas son la parte más compleja de la leche; en general se caracterizan por tener un elevado peso molecular comprendido entre 15,000 y 200,000 Da y por presentar un conjunto de propiedades que se derivan de su tamaño y su estructura peptídica. No atraviesan las membranas dializables y se precipitan fácilmente en solución por diversos reactivos, así como con sales minerales en concentraciones elevadas (Alais, 1998).

La leche de vaca contiene aproximadamente 3.5% de proteína en condiciones normales, sin embargo, este porcentaje varía dependiendo de las especies de mamíferos, entre 1 y 24%. Su función natural es proveer a los mamíferos jóvenes de los aminoácidos esenciales necesarios para el desarrollo de tejido muscular y de algunas otras proteínas con propiedades biológicas (Fox y McSweeney, 1998)

Además, la parte proteica de la leche es muy importante por las siguientes razones (Alais, 1998):

1. Las propiedades fisicoquímicas más importantes de la leche, especialmente las relacionadas con su estabilidad, derivan de la presencia de proteínas.
2. Desde el punto de vista nutricional las proteínas constituyen la parte más importante de la leche.
3. Algunas proteínas del suero de leche tienen actividades biológicas: enzimas, anticuerpos, inhibidores, etc. Las proteínas de la leche son características de cada especie por sus propiedades inmunológicas.

Las proteínas de la leche se dividen en dos grandes grupos: las caseínas y las proteínas del suero. Las caseínas constituyen el 80 % del total de proteínas en la leche de vaca, sin embargo, la proporción relativa entre proteínas del suero y caseínas varía dependiendo de la etapa de lactación (Varnam y Sutherland, 1994).

A continuación se dará una breve explicación de estos dos grupos de proteínas de la leche, refiriéndonos específicamente al caso de la leche de vaca.

3.3.1. Caseínas

Las caseínas de la leche están en forma de un complejo proteico fosforado, de carácter ácido, que precipita a pH de 4.6 y son susceptibles a coagulación enzimática en presencia de calcio (Amiot y col., 1992).

Las caseínas son hidrofóbicas y tienen muchos residuos de prolina (17, 5, 17 y 12 mol% en la α_{s1} , α_{s2} , β y κ respectivamente), y pocos de cisteína (las caseínas α_{s1} y β carecen de ellos y las caseínas α_{s2} y κ tienen dos cada una). Todas las cadenas polipeptídicas de caseína tienen al menos un enlace éster-fosfato por molécula (Walstra y Jenness, 1987).

Estas proteínas solo forman hélices α cortas y casi no presentan estructura terciaria, lo cual no significa que las moléculas se encuentren enrolladas aleatoriamente, pero en soluciones diluidas las cadenas están parcialmente desplegadas. Como quedan expuestos muchos grupos hidrofóbicos, se establecen fácilmente interacciones hidrofóbicas entre las moléculas. Por ello, las caseínas muestran amplias asociaciones, tanto en el interior de una misma molécula como entre ellas, formando las micelas de caseínas. Al contener poca estructura secundaria y terciaria, las moléculas de caseína no pueden ser desnaturalizadas, es por ello que la caseína no se insolubiliza por el calentamiento a temperaturas iguales o inferiores a 100 °C; la leche puede ser calentada por 24 h a 100 °C sin la coagulación de estas proteínas, sin embargo, el calentamiento severo ocasionará cambios en la leche que eventualmente provocarán la precipitación de las caseínas (Walstra y col., 2001).

Los grupos fosfato que en su mayoría están esterificados con residuos de serina y le proporcionan una alta densidad de carga negativa a las caseínas; al pH de la leche, estos grupos se encuentran ionizados, por lo que ligan fuertemente a iones divalentes como el Ca^{2+} . La cantidad de calcio ligado es proporcional al contenido de grupos serinfosfato. Por esta razón, las caseínas α_{s1} y β precipitan a concentraciones de calcio iónico bastante bajas (Walstra y col., 2001).

En la actualidad se admite que existen cuatro especies de caseínas bovinas: α_{s1} , α_{s2} , β y κ (Amiot y col., 1992). La tabla 2 muestra los tipos de caseínas, su concentración en la leche, el porcentaje que representan del total de las proteínas de la leche y algunas características.

Tabla 2. Caseínas presentes en la leche de vaca ¹ (Walstra y col., 2001).

Proteína	g/kg de leche	g/100g de proteína	Peso Molecular (Da)	Aminoácidos	Características
Caseína	26	78.5			pI aprox. 4.6
Caseína α_{s1}	1.0	31	23,600	199	Fosfoproteína
Caseína α_{s2}	2.6	8	25,200	207	Algunas con -S-S-
Caseína β	9.3	28	23,983	209	Fosfoproteína
Caseína κ	3.3	10	19,550	169	Glicoproteína

¹ Composición aproximada. pI= pH isoelectrico.

a). Caseína α_{s1}

La caseína α_{s1} contiene 8 átomos de fósforo por molécula. La composición en número de restos de aminoácidos pone de manifiesto un claro predominio de los grupos ácidos (7 Asp, 25 Glu, 8P), sobre los grupos básicos (14 Lis, 6 Arg, 5 His). La proporción de cadenas laterales no polares es elevada, por lo que se considera una proteína hidrófoba (aunque menos que la caseína β) y sensible al calcio en todas las temperaturas. La molécula está constituida por una simple cadena peptídica, donde existe una región hidrofílica entre los restos 45 y 89, donde se encuentran reunidos más de la mitad de los restos ácidos y 6 de los restos fosfóricos, agrupados en dos partes (46-48 y 64-68), (Alais, 1985).

La variante caseína α_{s0} que se encuentra en la leche en una cantidad muy pequeña, tiene un grupo fosfato más que la caseína α_{s1} (Walstra y col., 2001).

b). Caseína α_{s2}

La caseína α_{s2} está compuesta por 207 aminoácidos, dos de los cuales son cisternas. A causa de la variación del contenido en residuos fosfóricos, el peso molecular varía entre 25 150 a 25 390 Da. Se distingue de las otras caseínas por su bajo contenido en prolina y por su débil hidrofobicidad. Se considera como la caseína más sensible al calcio, sin embargo, la caseína κ le proporciona estabilidad como a las demás caseínas.

Gracias a la presencia de cistefna, las moléculas de caseína α_{s2} pueden asociarse en dímeros que a su vez se agregarán entre ellos por medio de interacciones electrostáticas, para formar polímeros (Alais, 1985).

c). Caseína β

Presenta analogías con la α_{s1} ; peso molecular próximo, cadena peptídica única, no contiene cistefna ni glúcidos; también es rica en prolina, muy hidrófoba y sensible al calcio. El contenido en prolina es excepcionalmente elevado: un resto de cada seis es Pro, por lo que esta caseína cuando se encuentra en solución no presenta estructura secundaria del tipo α hélice.

La caseína β es aún más hidrofóbica que la caseína α_{s1} ; la proporción de cadenas laterales no polares es del 53%. Por el contrario, es menos ácida, sólo contiene 5 grupos fosfóricos por molécula, 4 de ellos se encuentran en el mismo enlace que la caseína α_{s1} .

La caseína β no es sensible al calcio más que a la temperatura ambiente, hacia 20°C y por encima de ésta (Alais, 1985).

d). Caseína κ

La caseína κ contiene 169 restos de aminoácidos, por lo que su peso molecular es de 19 000 Da. Esta caseína es soluble en presencia de calcio a todas las temperaturas, por lo que posee un poder estabilizante sobre las otras caseínas cuando se encuentran frente al calcio. Tiene el papel de "coloide protector"; permite la formación de micelas estables en presencia de calcio (Alais, 1985).

La caseína κ contiene un enlace Fen-Met muy lábil; constituye el sustrato específico de la quimosina (cuajo) en el curso de la fase primera que precede a la coagulación de la leche. La ruptura específica de este enlace (105-106), da lugar a la formación de un péptido denominado "caseína-glico-péptido", el cual tiene un carácter hidrofílico. La proteína residual, insoluble, es llamada "paracaseína κ ", y es más hidrófoba que la precedente. Por estas características la caseína κ es una molécula típicamente "anfifila" (Alais, 1985).

3.3.2 Proteínas del suero de leche.

El suero de leche o suero de queso, es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Se obtiene tras la separación de las caseínas y de la grasa. Constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta. Su composición varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso de que proceda. La tabla 3, muestra la composición general del suero de leche (García-Garibay y col., 1993).

Tabla 3. Composición química del suero de leche (g/100) (García-Garibay y col., 1993).

Lactosa %	Proteína Cruda %	Cenizas %	Grasa %	Ácido láctico %	Agua %
4.9	0.9	0.6	0.3	0.2	93.1

Las proteínas del lactosuero representan el 14-24% del total de las proteínas en la leche. Aproximadamente el 70% del nitrógeno total (proteína cruda), corresponde a la proteína verdadera, la cual tiene un valor nutritivo superior al de la caseína y está compuesta por la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina, las inmunoglobulinas, la proteosapeptona, la **lactoferrina**, y las enzimas nativas; el resto lo forman aminoácidos, urea, creatina, amoníaco y ácidos nucleicos. Además el suero contiene las vitaminas hidrosolubles de la leche (Alais, 1998).

La tabla 4 muestra cuáles son las proteínas del lactosuero, su concentración en leche, y el porcentaje que representan del total de proteínas de la leche (García-Garibay y col., 1993).

Tabla 4. Proteínas del suero presentes en la leche de vaca¹ (García-Garibay y col., 1993).

Nombre de la proteína	Aminoácidos	Concentración g/l	PM (Da)	% total proteína en leche
B-lactoglobulina	162	2-4	18,283	9
A-lactoalbúmina	123	1-1.5	14,176	3.5
Albúmina sérica bovina	582	0.1-0.4	66,267	1
Proteosa peptona		0.6-1.8	4,000-40,000	2
inmunoglobulinas	Existen varios tipos de Inmunoglobulinas	0.6-1	Variable	3
Lactoferrina	125	0.1	80,000	
Total de prot. de leche		30-35		100
Proteínas del suero		5-7		14-24

¹ Composición aproximada

A diferencia de las caseínas, las proteínas del suero son compactas, globulares con un peso molecular que varía entre 14,000 y 1, 000,000 Da y son solubles en un intervalo de pH muy amplio (incluso a pH ácidos, siempre y cuando no se hayan desnaturizado por el calor). En estado natural no se asocian con las caseínas, pero en las leches tratadas térmicamente y homogenizadas, hay una fracción que sí lo hace (Badui, 1993).

En general son muy sensibles a las temperaturas altas y en menor grado al pH ácido (situación contraria a lo que sucede con las caseínas) debido a que su mecanismo de estabilidad es por hidratación y no por carga eléctrica; son las primeras proteínas de la leche en desnaturizarse y su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reducen el potencial de oxidación-reducción, que puede llegar a inhibir parcialmente las reacciones de

oxidación; contienen la mayoría de los aminoácidos y tienen un mejor balance de éstos que las propias caseínas, por lo que su valor nutritivo es mejor (Badui, 1993).

a.- β -Lactoglobulina:

La β -lactoglobulina (β -lg), es insoluble en agua destilada, soluble en soluciones diluidas de sales y precipitable por las altas temperaturas y por la acción de soluciones al 50% de sulfato de magnesio o de amonio; es la fracción proteínica que se ha estudiado con más detalle ya que ejerce una influencia decisiva en la estabilidad térmica de los productos lácteos. Suma aproximadamente 45% del total de las proteínas del suero y existe como dímero unido no covalentemente al pH normal de la leche (PM 36,520 Da como dímero), pero Timasheff y col. (1960) mostraron que la β -lg se disocia en monómeros de 18 kDa, cuando el pH es menor a 3.5.

Al igual que con otras proteínas globulares, los aminoácido hidrófilos, los hidrófobos y los ionizables se encuentran homogéneamente distribuidos a lo largo de la molécula, provocando que los no polares (tirosina, triptofano, leucina, fenilalanina, etc.) tiendan a unirse dentro de la molécula estableciendo una hidrofobicidad elevada en el centro; esta característica hace que se hidrate fuertemente en el exterior y que no se puedan unir entre ellas en forma hidrófoba. Su grupo disulfuro coadyuva a la estabilidad de estructura terciaria, y el sulfhidrilo libre la hace muy reactiva; de hecho es la fuente más importante de sulfhidrilos en la leche (Badui, 1993).

La β -lactoglobulina que no se encuentra en la leche materna, se considera como responsable de las reacciones alérgicas que se observan en infantes alimentados con leche de vaca; por esta razón, en los productos comerciales que imitan a la leche humana se utiliza suero de queso al que se le ha eliminado esta fracción proteínica mediante diferentes técnicas como puede ser una precipitación selectiva con polifosfatos o filtración el gel (Sawyer y col., 1999).

b.- α -lactoalbúmina:

La α -lactoalbúmina, es por orden de abundancia, la segunda proteína del suero y tiene actividad biológica, ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa, por lo que también se conoce como proteína B de dicho sistema. No contiene grupos sulfhidrilo libres, pero sí cuatro disulfuros provenientes de cistinas, lo que la hace tener 2.5 veces más azufre que las caseínas (Sharma y col., 2001). Entre sus características se encuentran su bajo peso molecular y su alto contenido de triptofano (Badui 1993).

c.- Albúmina sérica bovina:

La fracción de albúmina sérica bovina es la misma que la que se encuentra en el suero sanguíneo; sus principales características químicas son: que contiene un alto número de cistinas (17 por mol) y un grupo sulfhidrilo libre, y que es fácilmente desnaturalizable aún a bajas temperaturas. Su función no es muy clara, sin embargo, se piensa que al igual que en la sangre, sirve como un transportador de compuestos orgánicos como ácidos grasos o fármacos (Fox y McSweeney, 1998).

d.- Inmunoglobulinas:

Por su parte, las inmunoglobulinas suman aproximadamente 10 % del total de proteínas del suero; provienen de la sangre del animal, constan de moléculas de glucoproteínas con un alto contenido de grupos azufrados con actividad biológica de anticuerpo. La cría (humano o becerro) obtiene cierta inmunidad a través del calostro que consume, ya que éste contiene una gran cantidad de inmunoglobulinas. Originalmente se llamaron lactoglobulinas y posteriormente se conocieron como euglobulina y pseudoglobulina; actualmente se designan con abreviaturas como IgM, IgA, IgG₁ e IgG₂. La fracción IgM es un pentámero integrado por cinco cadenas de polipéptidos, mientras que la IgA es un dímero de la IgG.

Las inmunoglobulinas son componentes muy importantes de la membrana del glóbulo de grasa, promotoras del fenómeno de cremado de la leche que, además, contribuyen a las propiedades antibacterianas naturales de la leche que no ha sido sometida a tratamientos térmicos (Badui, 1993).

e.- Lactoferrina

La lactoferrina es una glicoproteína, monomérica, bilobal, y pertenece a la familia de las transferrinas; tiene un PM alrededor de 80 kDa y un pI = 8 (Farnaud y Evans, 2003). Su estructura se compone de 5310 aminoácidos, 124 átomos de carbohidratos, 2Fe^{3+} , 2CO_3^{2-} y 50 moléculas de agua (Moore y col., 1997).

Está presente en secreciones como: lágrimas, saliva y fluidos seminales, así como también abunda en el calostro y suero de leche. La concentración de LF puede variar dependiendo de la etapa de lactación así como la estación del año (Tsuda y col., 2000; Ohashi y col., 2003). Se ha reportado que la concentración de lactoferrina presente en la leche humana es alrededor de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ siendo que en el calostro hay 7 veces más LF, lo que indica que su concentración es de 7000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Riechel y col., 1998; Hsiang y Hsiung, 1999).

La estructura tridimensional de la lactoferrina se muestra en la figura 1 y 2. La proteína abarca dos lóbulos homólogos, los cuales se encuentran conectados covalentemente por tres α -hélice envolviendo residuos de aminoácidos. Cada lóbulo se subdivide más a fondo en dos dominios, con un sitio-hierro cada uno, el cual está situado entre las caras internas de la hendidura del inter-dominio (Sharma y col., 1998; Moore y col., 1997). Los átomos de cada hierro (Fe^{3+}) son coordinados a cuatro ligandos de la proteína los cuales corresponden a 2 Tyr, 1 Asp, y 1 His, (figura 1) y también a un anión sinérgico como el carbonato (Farnaud y Evans, 2003; Abdallah y Chahine, 2000).

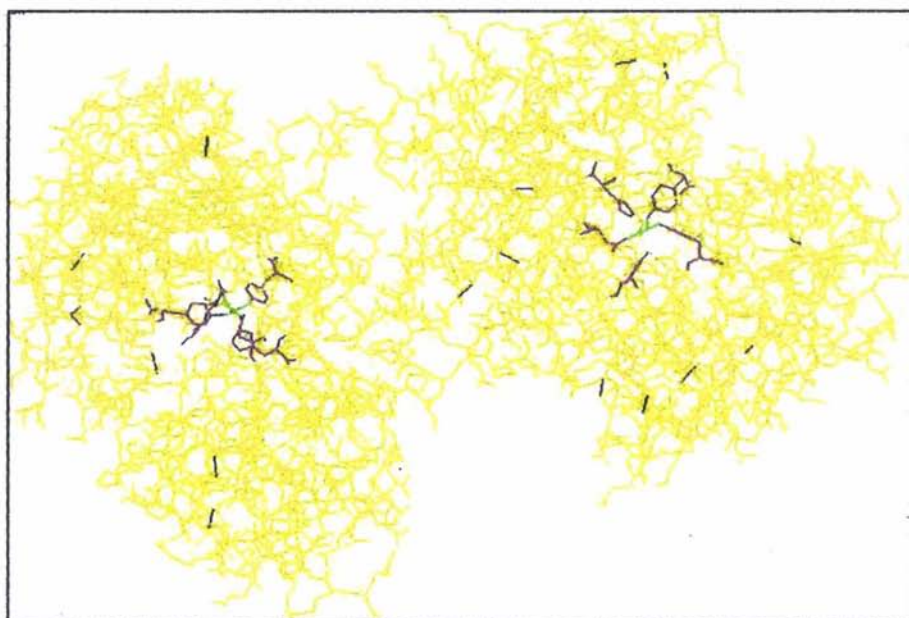


Figura 1. Representación tridimensional de la lactoferrina bovina, donde se observan los sitios-hierro de cada lóbulo (líneas verdes) coordinados a cuatro ligandos, los cuales corresponden a 2 Tyr, 1 Asp, y 1 His (Moore y col., 1997). Representación realizada por el programa RASMOL.

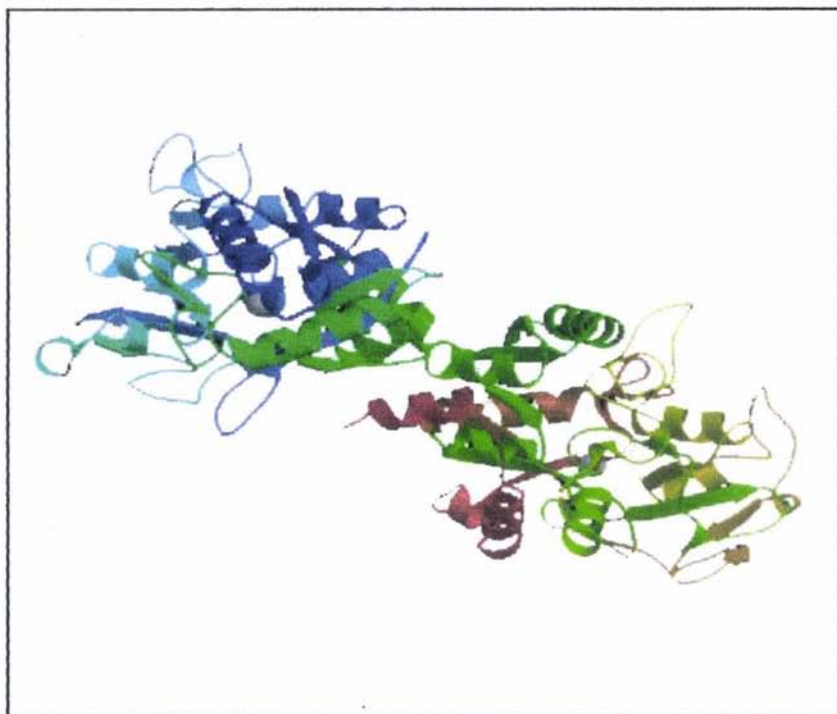


Figura 2 Diagrama esquemático de la molécula de lactoferrina. Las α -hélices están representadas como cilindros, las β como flechas y los átomos de hierro como círculos. Representación tridimensional realizada por el programa MOLSCRIPT, (Moore y col., 1997).

La lactoferrina es denominada la proteína roja de la leche debido a que posee dos sitios activos para ligar a la molécula de Fe^{3+} que es el que le da su color característico; así mismo permite que el hierro sea más asimilable para el humano. Se ha demostrado que los recién nacidos absorben más fácilmente el hierro de la leche humana que de la leche proveniente de bovinos o cualquier otra especie, y la razón es que la leche humana contiene alrededor de diez veces más lactoferrina que la leche de vaca (Blackberg y Hernell, 1980).

3.3.3 Bioactividad de las proteínas del suero de leche.

El suero de leche representa una mezcla muy variada de proteínas, las cuales poseen múltiples funciones, siendo las más importantes las que se mencionan a continuación:

- ✓ Proveen aminoácidos indispensables, los cuales son necesarios para el crecimiento y desarrollo (Tomé y Debbabi 1998; Farnaud y Evans, 2003).
- ✓ La liberación de aminoácidos y nitrógeno depende del intestino del organismo y del funcionamiento en los diferentes procesos intestinales, incluyendo el gástrico y motilidad intestinal (Tomé y Debbabi 1998; Farnaud y Evans, 2003).
- ✓ Se ha observado, una vez que son digeridas parcialmente, contienen una variedad de péptidos bioactivos, los cuáles facilitan la asimilación de nutrientes y regulan la actividad fisiológica. La naturaleza de los péptidos producidos durante la digestión de las proteínas de la leche depende del proceso digestivo, y de los procesos de absorción gastrointestinal (Tomé y Debbabi 1998; Farnaud y Evans, 2003).
- ✓ Las propiedades biológicas de las proteínas del suero de leche y péptidos derivados poseen una actividad antibacteriana específicamente en la lactoferrina (Tomé y Debbabi, 1998; Farnaud y Evans, 2003).
- ✓ Confieren inmunidad del recién nacido contra enfermedades (Farnaud y Evans, 2003).
- ✓ Además, estas proteínas tienen implicado un gran número de efectos biológicos que se han observado en humanos y en animales de estudio, como por ejemplo: una actividad anticancerígena contra el cáncer de colon. Esta última función de las proteínas del suero, es la que ha tomado gran auge entre los científicos, pues ha sido investigada durante un largo tiempo tomando como modelo animales de estudio como las ratas. En 1998 se realizó un estudio, el cual consistía en observar el efecto que poseen las proteínas de la leche en animales que intencionalmente se les produjo tumores en el colon inyectándoles dimetilhidrazina (sustancia que induce cáncer en el colon). Los resultados que se obtuvieron demostraron que las proteínas de la leche, particularmente las del suero, tuvieron efectos benéficos retardando la incidencia del cáncer de colon tanto en ratas jóvenes como en ratas maduras, en comparación con otras proteínas como las de

la carne o las de soya, (Buchhoz y Scheper, 2000). Esto sugiere que las dietas suplementadas con lactoferrina o β -lactoglobulina ejercen una alta protección contra el desarrollo de tumores en el intestino. El mecanismo aparente de ésta actividad anticancerígena se le atribuye a que las proteínas del suero de leche son ricas en aminoácidos sulfurados como cisteína y metionina en lo que corresponde a su estructura primaria. La hipótesis que han establecido es que éstos aminoácidos tienen una actividad potencial enorme, actuando como un sistema protector frente al DNA (Buchhoz y Scheper, 2000).

La tabla 5, resume las funciones más importantes que ejercen las proteínas del suero de leche en el organismo.

Tabla 5. Resumen de la Actividad Biológica de las proteínas del suero de leche (Buchhoz y Scheper, 2000).

Proteína	Actividad Funcional
Proteínas totales del suero de leche	Anticancerígenas Estimuladoras del sistema inmune
β -lactoglobulina	Función digestiva Precursor de péptidos bioactivos Antioxidante
α -lactoalbúmina	Anticancerígeno Inmunomodulación
Lactoferrina	Efecto antimicrobiano Regulación en el transporte de Fe Estimuladora del sistema inmune Anti-inflamatoria Prolifera células para el crecimiento Anticancerígena Antioxidante Antimutagénico Prebiótico
Inmunoglobulinas	Estimula la respuesta inmune
Lisozima	Antimicrobiano

Como se puede observar en la tabla 5, la lactoferrina es la proteína que ejerce más funciones en el organismo, por esta razón los científicos han enfocado su atención en esta proteína y han realizado numerosas investigaciones a cerca de sus propiedades y funcionalidad.

3.3.4 Bioactividad de la lactoferrina.

Experimentos in vitro indican que la lactoferrina es el componente más importante de la leche con un sistema bacteriostático, debido a que en condiciones fisiológicas, tiene muy poco hierro unido, y es capaz de fijar el que se encuentra en el medio, de tal forma que los microorganismos no disponen de él para su proliferación por ello se dice que tiene efectos inhibitorios en el crecimiento de varias bacterias como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Bacillus subtilis* o *Bifidobacterium infantis* (Tomé y Debabbi, 1998). El efecto bacteriostático es aumentado por los anticuerpos anti-bacterianos específicos de la leche debido a que hay una asociación de la lactoferrina con otras proteínas, como la lisozima y la lactoperoxidasa, (Farnaund y Evans, 2003), mientras que es suprimido por la desnaturalización de la proteína o por una saturación del ión ferrico (Blackberg y Hernell, 1980).

En investigaciones recientes se ha visto además que la lactoferrina también puede tener un efecto bactericida al interactuar con la pared de los microorganismos, desestabilizándola y causando su muerte. A través de estos dos mecanismos, y quizá de algún otro, la lactoferrina puede desempeñar un papel esencial en la protección del recién nacido frente a infecciones gastrointestinales (Tomé y Debabbi, 1998).

Así mismo tiene propiedades anticancerígenas, anti-inflamatorias, anti-virales así como también estimula el sistema inmune (Hsiang y Hsiung, 1999).

Además forma parte del sistema que favorece el crecimiento de flora no patógena en el intestino: lactobacilos y bifidobacterias, por lo tanto funciona como prebiótico (Tsuda y col., 2000).

Es además un hecho interesante el que los fragmentos de lactoferrina que se producen durante la digestión son todavía capaces de fijar hierro. Incluso, se ha encontrado lactoferrina íntegra en las heces de niños alimentados con leche materna, lo que indica que puede mantener su actividad biológica a lo largo del tracto gastrointestinal (Farnaund y Evans, 2003)).

La lactoferrina bovina puede recuperarse de subproductos como el lactosuero de quesería, y añadirse a productos para la alimentación animal o humana. Actualmente, en Japón se comercializan ya leches para alimentación infantil enriquecidas con **lactoferrina** bovina, para aprovechar su efecto protector en el intestino del recién nacido. Naturalmente, lo ideal sería que los productos para alimentación infantil contuvieran lactoferrina humana, pero su obtención a partir de leche humana es prácticamente imposible. Este es un objetivo que los avances de la biotecnología han hecho alcanzable (Pedersen y Mollerup, 2003).

3.4 Técnica de Estampado Molecular.

En el estudio e imitación de la naturaleza, un atractivo aprovechamiento de la bioimitación es la tecnología del estampado molecular o "*Molecular Imprinting Polymer*" (MIP), que puede ser descrita, como una manera de fabricación artificial de "cerraduras" para "llaves moleculares" (Armendáriz, 2001).

El primer paso es la selección de la molécula a estampar o plantilla, la cual se mezcla con una variedad de monómeros funcionales para construir un complejo monómero-plantilla (llave-cerradura). Las interacciones entre los monómeros funcionales y la molécula objetivo es lo que permite a ambos atarse entre sí. De esta manera, el complejo formado, es entrecruzado para fijar la posición de los monómeros alrededor de la plantilla. La remoción de la misma da paso a una cavidad que es selectiva para la molécula estampada y que no reconoce a cualquier otra molécula (Takeuchi y Haginaka, 1999; Ulbricht y col., 2002).

La molécula objetivo o plantilla puede ser en principio, cualquier tipo de molécula; desde moléculas sencillas de bajo peso molecular, hasta moléculas grandes como proteínas o ácidos nucleicos. Actualmente se han reportado impresiones moleculares de moléculas como: azúcares, esteroides, drogas o péptidos pequeños, aunque todos los estudios publicados se han realizado en pequeña escala. La dificultad de fabricar materiales estampados se incrementa con el tamaño de la molécula seleccionada (Rachkov y Minoura, 2001; Chen y col., 2001).

En la figura 3, se muestra la representación esquemática del proceso de estampado molecular. Un monómero (o mezcla de monómeros) con funcionalidades químicas complementarias a la plantilla al mezclarse en una solución forman complejos a través de interacciones covalentes reversibles o no covalentes. La polimerización se lleva a cabo con una agente entrecruzante, seguido por la remoción de la plantilla dando paso a la formación de sitios de reconocimiento complementarios en forma y funcionalidad a la molécula plantilla (Nicholls y col., 2001).

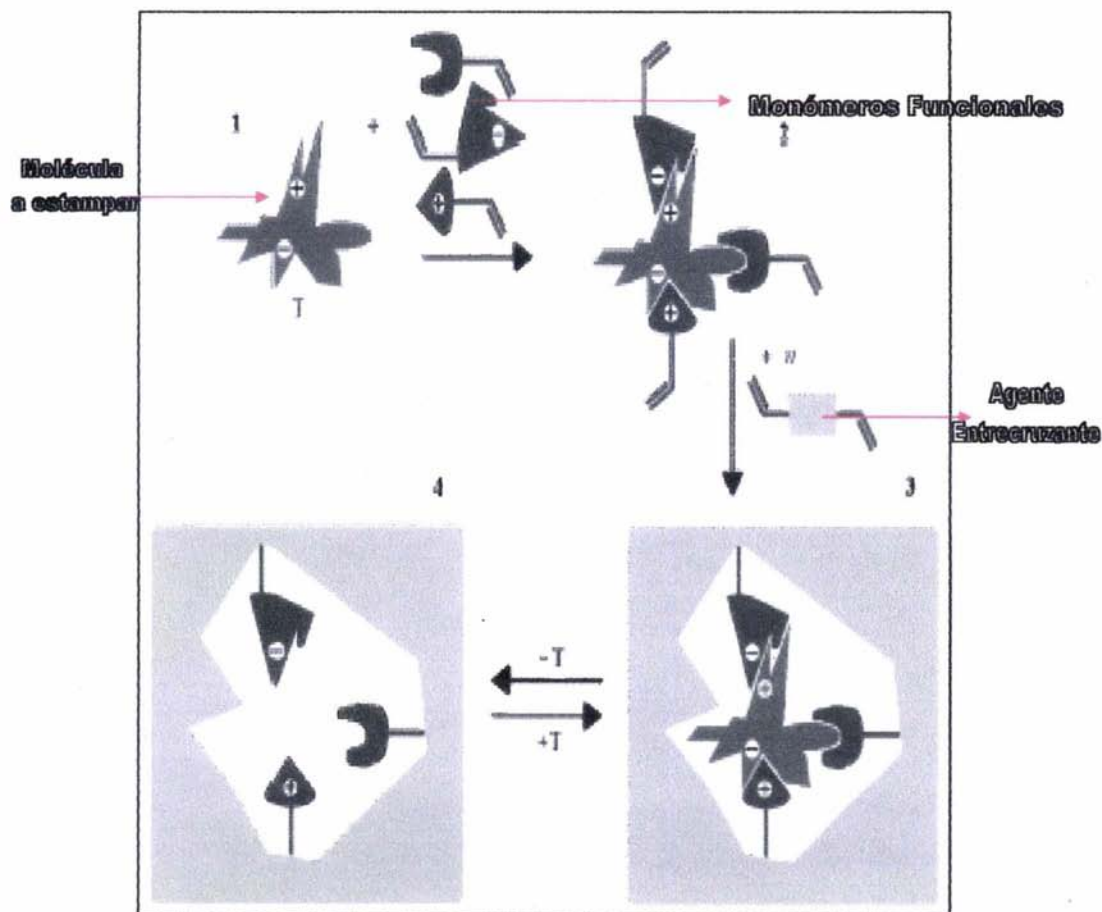
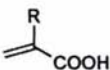
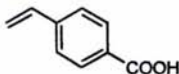
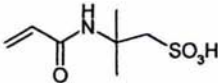
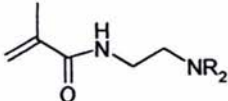

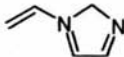
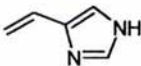
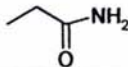


Figura 3. Representación esquemática del proceso de estampado molecular (Nicholls y col., 2001). T= Template (plantilla).

3.4.1 Monómeros Funcionales.

Varios sistemas poliméricos pueden ser desarrollados para usarse en la tecnología de estampado molecular. Por baratos, los sistemas más utilizados son los basados en poliacrilatos o basados en poli(acrilamidas). En la tabla 6 se muestran los monómeros funcionales comúnmente utilizados (Armendáriz, 2001).

Tabla 6. Monómeros funcionales comúnmente utilizados en la preparación de polímeros estampados (Armendáriz, 2001).

Monómeros Funcionales	Tipo de Interacción	
	Acidos acrílicos (R = H, CH ₃ , CF ₃ , CH ₂ COOH)	Cargas Iónicas Enlaces de Hidrogeno
	Acidos vinibenzoicos	Cargas Iónicas Enlaces de Hidrogeno
	Acidos Acrilamidossulfónicos	Cargas Iónicas
	Aminometacrilamidas R= H ₂ , C ₂ H ₅	Cargas Iónicas
	Vinipiridinas	Cargas Iónicas Enlaces de Hidrogeno Transferencia de Carga
	Vinilimidazoles	Cargas Iónicas Enlaces de Hidrogeno Coordinación de Metálica
		
	Acrilamidas	Enlaces de Hidrogeno

3.4.2 Agentes Entrecruzantes.

El grado de entrecruzamiento necesario para lograr especificidad es 70 - 90 % por ello, solo un número limitado de agentes entrecruzantes pueden ser utilizados (figura 4). No obstante, algunas diferencias entre los agentes de entrecruzamiento han sido probadas con diferentes grados de éxito.

Originalmente isómeros de divinilbenceno han sido utilizados para el entrecruzamiento de estireno y otros monómeros funcionales en poli-estireno. Después se encontró que sistemas basados en ácido acrílico o metacrílico pueden ser preparados con mayor especificidad si se utiliza como agente entrecruzante etilenglicol dimetacrilato (EDMA) y trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) (Armendáriz, 2001). En la figura 4 se muestran los agentes entrecruzantes comúnmente utilizados.

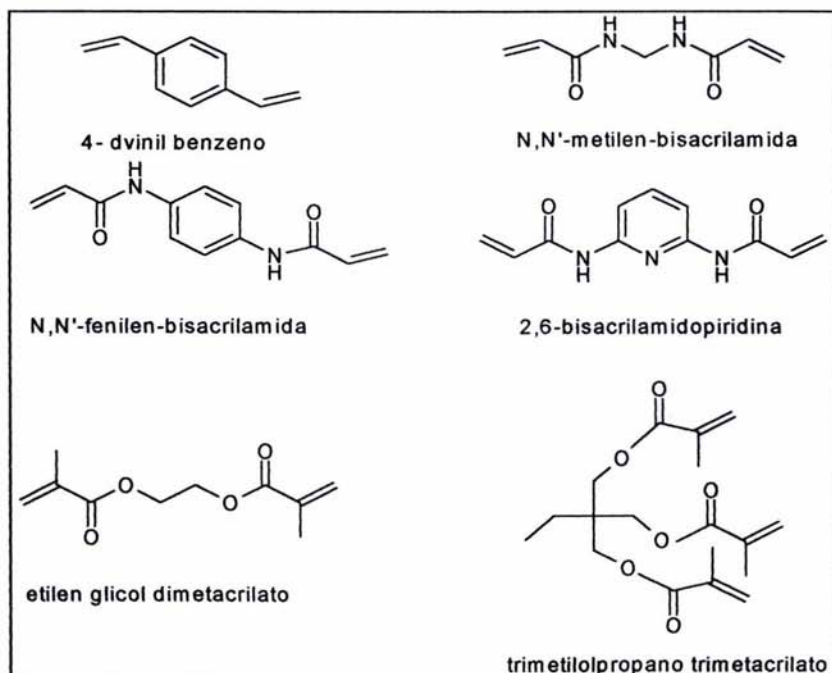
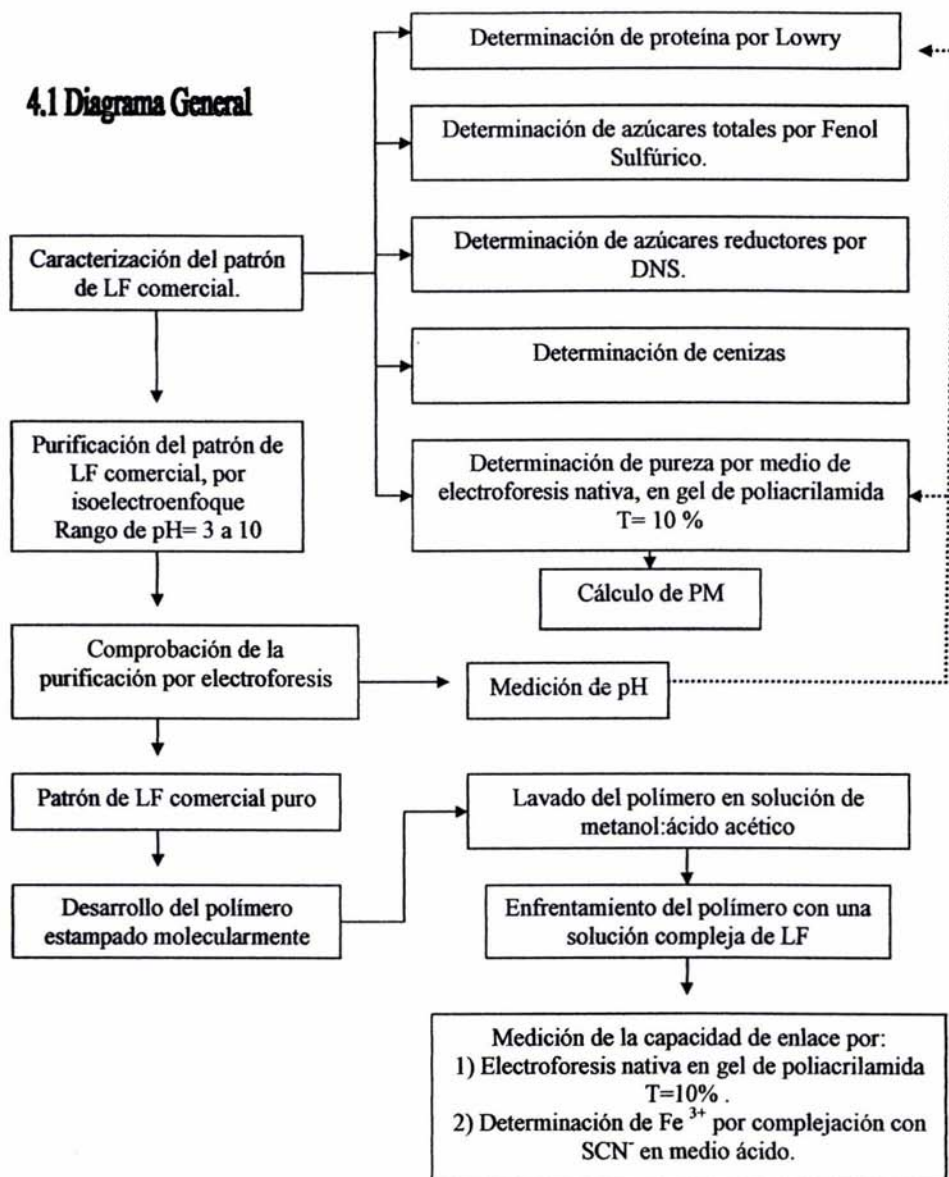


Figura 4. Agentes entrecruzantes comúnmente utilizados en la técnica de Estampado Molecular (Armendáriz, 2001).

METODOLOGÍA

4.1 Diagrama General



4.2 Preparación del patrón de LF comercial.

Se utilizó un patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) como fuente de LF (figura 5). En algunos casos fue necesario realizar diluciones de la preparación en agua desionizada, según lo que cada método requirió.

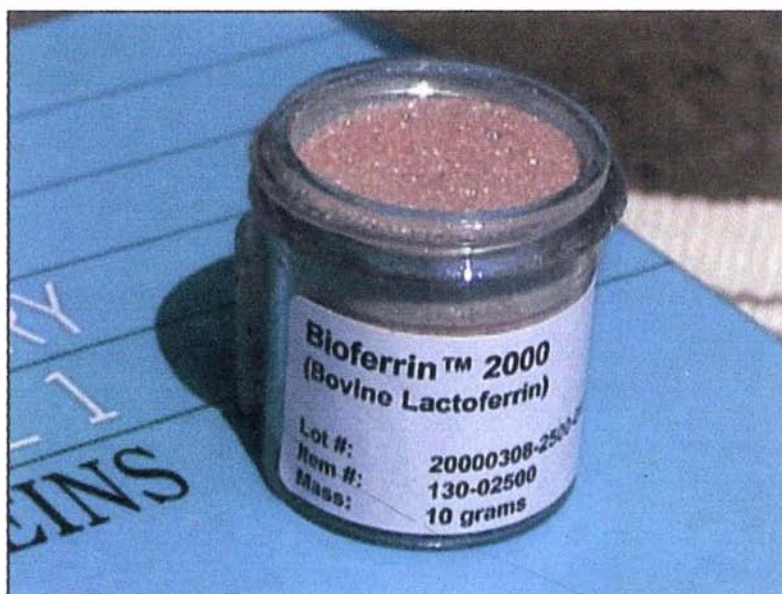


Figura 5. Patrón de lactoferrina comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.).

4.3 Caracterización del patrón de LF comercial.

Para caracterizar el patrón de lactoferrina comercial fue necesario determinar como primer paso la concentración de proteína presente en el mismo mediante el método de Lowry. Así mismo, se realizó una cuantificación de azúcares totales (por fenol sulfúrico), azúcares reductores (por DNS) y cenizas porque generalmente los azúcares así como las sales iónicas al ser moléculas que contienen grupos cargados pueden afectar el campo eléctrico evitando que las proteínas corran de forma adecuada al momento de realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para determinar la pureza del patrón de LF comercial se utilizó la técnica de electroforesis nativa en gel de poliacrilamida T=10%.

4.3.1 Concentración de proteína total por el método de Lowry.

Se basa en el desarrollo de un color azul debido a la reacción de Biuret. Para aumentar la sensibilidad de la reacción del biuret, el complejo proteína-Cu²⁺ se hace reaccionar con el reactivo de Folin. Esta coloración se atribuye a la reducción del ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a azul de heteropolimolibdeno de composición no definida, por medio de los residuos tirosilos, triptofanilos, y en menor grado, cisteinilos e histidilos de las proteínas que forman el complejo con el Cu²⁺. Su rango de sensibilidad es de (0-500 µg/mL) (Lowry y col., 1951).

Reactivos:

A.- Carbonato de sodio (J.T. Baker, México) al 2% en NaOH 0.1 N (Reactivos Analíticos REASOL, México) y agua desionizada.

B.- Sulfato de cobre (J.T. Baker, México) al 1% en agua desionizada, almacenado a temperatura ambiente.

C.- Tartrato de sodio y potasio (J.T. Baker, México) al 2% en agua desionizada, almacenado a temperatura ambiente.

D.- Reactivo de Folin (Aldrich, E.U.A.) 1:1 en agua desionizada, almacenado a temperatura ambiente.

Procedimiento:

1.- Mezclar 50 volúmenes de A + 1 volumen de B + 1 volumen de C. A esta mezcla se le denomina solución de trabajo.

2.- Tomar 5 mL de la solución de Trabajo + 1 mL de muestra.

3.- Reposar 10 min en la oscuridad.

4.- Agregar 0.5 mL de D 1:1 con agua destilada.

5.- Reposar 30 min en la oscuridad.

6.- Leer absorbancia a 590 nm.

La curva patrón de seroalbúmina (SA sigma, E.U.A.) (apéndice I inciso 1) se preparó en un intervalo de 100 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obteniéndose la siguiente ecuación:

$$P (\mu\text{g}/\text{mL}) = (\text{Abs}_{590\text{ nm}} - 0.0497) / 0.001965$$

$$R = 0.9976$$

4.3.2 Determinación de Azúcares reductores por el método de DNS.

La base del método consiste en la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS) por los azúcares reductores formando un compuesto coloreado amarillo cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de azúcares reductores. Su rango de sensibilidad es de 0-2000 µg/mL (Miller, 1959).

Reactivos:

- 1.- Ácido dinitrosalicílico (J.T. Baker, México) almacenado a temperatura ambiente.
- 2.- Tartrato de Sodio y Potasio (J.T. Baker, México) almacenado a temperatura ambiente.
- 3.-Hidróxido de sodio (Reactivos Analíticos REASOL, México) almacenado a temperatura ambiente.

Preparación del reactivo DNS.

Disolver 1.6g de hidróxido de sodio y 30 g de tartrato de sodio y potasio en 50 mL de agua destilada con agitación y calentamiento a 60° C. Posteriormente agregar en forma lenta 1 g de ácido dinitrosalicílico, dejar enfriar y colocar la solución en un matraz aforado de 100 mL añadiendo agua destilada hasta completar el aforo.

Procedimiento

- 1.- Tomar 1 mL de muestra y adicionarlo en un tubo de ensaye.
- 2.- Agregar 1 mL del reactivo DNS y agitar el tubo.
- 3.- Ebulir durante 5 min.
- 4.- Enfriar al chorro de agua.
- 5.- Agregar 10 mL de agua destilada.
- 6.- Reposar 15 min.
- 7.- Leer absorbancia a 540 nm.

La curva patrón de glucosa (Apéndice I inciso 2), se preparó en un intervalo de 300 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obteniéndose la siguiente ecuación:

$$P (\mu\text{g}/\text{mL}) = (\text{Abs}_{540 \text{ nm}} - 0.069019) / 0.00062634$$
$$R = 0.99967$$

4.3.3 Determinación de Azúcares totales por el método de Fenol sulfúrico.

Esta técnica consiste en la determinación de azúcares usando fenol-ácido sulfúrico; esta basado en la adsorción a 490 nm de un complejo aromático coloreado formado entre el fenol y el carbohidrato. Su rango de sensibilidad es de 0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Dubois, y col., 1956).

Reactivos:

- 1.- Solución de Fenol (J.T. Baker, México) al 5% en agua desionizada, almacenada a temperatura ambiente.
- 2.- Ácido Sulfúrico concentrado (J.T. Baker, México) almacenado a temperatura ambiente.

Procedimiento

- 1.- Mezclar 1 mL de muestra + 1 mL de solución de Fenol.
- 2.- Adicionar con precaución 5 mL de ácido sulfúrico por la paredes del tubo.
- 3.- Esperar de 10 a 15 seg y agitar.
- 4.- Leer absorbancia a 490 nm.

La curva patrón de glucosa (Apéndice I inciso 3) se preparó en un intervalo de 20-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obteniéndose la siguiente ecuación:

$$P (\mu\text{g}/\text{mL}) = (\text{Abs}_{490 \text{ nm}} - 0.22415) / 0.0100165$$
$$R = 0.99564$$

4.3.4 Pureza y determinación de PM por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida según Goldenberg (1990).

La determinación de pureza por medio de electroforesis se basa en la separación de proteínas gracias a su tamaño, forma y carga neta, a través de un gel de poliacrilamida con un cierto tamaño de poro y sometido a un campo eléctrico determinado (Scopes, 1986).

Reactivos:

- 1.- Solución Stock de acrilamida al 30 % almacenada a 4 °C en frasco ámbar: N,N-metilen-bis-acrilamida , acrilamida (Bio Rad, Hercules, E.U.A.) y agua desionizada.
- 2.- Solución amortiguadora Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 almacenado en frasco ámbar a 4° C: Tris (Reactivo grado electroforesis) (Bio Rad, Hercules, E.U.A.), agua desionizada, HCl 6 N (J.T. Baker, México).
- 3.- Solución amortiguadora Tris- HCl 0.5 M pH 6.8 almacenado en frasco ámbar a 4° C: Tris (Reactivo grado electroforesis) (Bio Rad, Hercules, E.U.A.), agua desionizada, HCl 6 N (J.T. Baker, México).
- 4.- Persulfato de amonio al 10 % (Bio Rad, Hercules, E.U.A.) conservado en frasco ámbar y dentro de desecador.
- 5.- TEMED, N,N,N',N'- Tetrametilendiamina (Bio Rad, Hercules, E.U.A.) en frasco ámbar a 4° C.
- 6.- Solución amortiguadora de corrida pH 8.3 almacenada a temperaturas de 0°C ó menores: tris y glicina (Reactivo grado electroforesis) (Bio Rad, Hercules, E.U.A.), agua desionizada, HCl 6 N (J.T. Baker, México).
- 7.- Solución amortiguadora de la muestra o colorante mantenida a temperaturas menores de 0° C: solución amortiguadora pH 6.8, glicerol (J.T. Baker, México) y azul de bromofenol (Bio Rad, Hercules, E.U.A.).
- 8.- Solución desteñidora almacenada a temperatura ambiente: metanol y ácido acético glacial (J. T. Baker, México).

- 9.- Azul de Coomassie al 1 % en solución desteñidora a temperatura ambiente: Coomassie Brilliant blue R-250 (Bio Rad, Hercules, E.U.A.).
- 10.- Marcador de peso molecular: SDS-Page estándar de peso molecular de amplio o bajo rango (Bio Rad, Hercules, E.U.A.) almacenado a -20°C .
- 11.- Solución de seroalbúmina 96-99% (Sigma Chemical Co, St. Louis, E.U.A.) de 2 mg/mL almacenada en un vial a temperatura de congelación ($< 0^{\circ}\text{C}$).

Procedimiento:

- 1.- Montar el equipo para electroforesis limpio y seco.
- 2.- Preparar el gel de separación a las proporciones de T y C que requiriera cada experimento; desairear por 15 min en una bomba de vacío y colocar en el equipo de electroforesis.
- 3.- Preparar el gel de concentración T= 4%, C= 1.5, siguiendo el mismo procedimiento que el anterior.
- 4.- Una vez listo el gel, montar el equipo para correr, vaciar la solución amortiguadora de corrida e inyectar las muestras (20 μL de colorante por cada 40 μL de muestra), la seroalbúmina como referencia y el marcador de pesos moleculares, según sea el caso.
- 5.- Correr durante aproximadamente una hora a 200 V, manteniendo la cámara a bajas temperaturas.
- 6.- Colocar los geles en azul de Coomassie por 30 min.
- 7.- Retirar y pasar a 30 mL de solución desteñidora por una hora o hasta que se logren ver las bandas en el gel (se puede cambiar varias veces a solución desteñidora limpia).
- 8.- Identificar las bandas y obtener los pesos moleculares de las proteínas a través de la curva patrón de pesos moleculares (Log PM vs. rf).

4.3.5 Identificación de proteínas en gel de electroforesis utilizando Sypro Orange, Protein Gel Stain de acuerdo al instructivo del reactivo utilizado.

El mecanismo exacto de interacción entre las proteínas y el Sypro Orange no ha sido esclarecido completamente, pero la interacción es dependiente de la unión inicial entre SDS (dodecilsulfato de sodio) y las proteínas; el reactivo se une al SDS y debido a su fluorescencia es posible detectarlo con luz ultravioleta.

En este caso las muestras se corrieron en un gel no desnaturalizante, $T=10\%$, bajo la metodología detallada en el punto hasta el paso 5; la única diferencia es el tipo de tinción en los geles después de la corrida.

Reactivos:

1. Solución de ácido acético glacial (J.T. Baker, México) al 7.5% en agua desionizada conservada a temperatura ambiente.
2. Solución de ácido acético (J.T. Baker, México) al 7.5% con 0.05% de dodecilsulfato de sodio (SDS) (Reactivo grado electroforesis) (Bio Rad, Hercúleas, E.U.A.) conservada a temperatura ambiente.
3. Sypro Orange, Protein Gel Stain (Bio Rad, Hercules, E.U.A.) conservado en frasco ámbar a temperaturas menores a 0°C .

Procedimiento:

- 1.- Después de la corrida, sumergir el gel en solución de ácido acético con SDS por 30 minutos aproximadamente en agitación ligera o hasta eliminar el frente.
- 2.- Enjuagar el gel con solución de ácido acético al 7.5% para eliminar los restos de SDS.
- 3.- Sumergir el gel en 25 mL de solución de ácido acético al 7.5 % con 5 μL de Sypro orange por una hora con agitación ligera.
- 4.- Analizar la imagen por fluorescencia en luz UV y realizar los análisis de volumen y concentración si es necesario.

4.4 Purificación del Patrón de LF comercial por isoelectroenfoque de acuerdo al manual del equipo utilizado.

Este método de purificación utilizando el Rotofor (Bio Rad) se basa en el hecho de que todas las proteínas tienen una carga neta dependiente del pH. Al ser sometidas a un gradiente de pH migrarán hasta llegar a su punto isoeléctrico (carga neta igual a cero), haciendo posible su separación.

Reactivos:

1. Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, 40% sólidos (Bio Rad, Hercules, E.U.A.).
2. Solución de ácido fosfórico 0.1 N conservada a 4 °C: ácido fosfórico 85.6% (J.T. Baker) y agua desionizada.
3. Solución de hidróxido de sodio 0.1 N conservada a 4°C: Hidróxido de sodio lentejas industrial (Reactivos Analíticos REASOL, México) y agua desionizada.

Procedimiento:

- 1.- Montar el equipo en el siguiente orden: preparar cámaras, montarlas en el ensamblador junto con la celda y asegurar bien con los tornillos; colocar el ensamblador en el Rotofor y tapar.
- 2.- Inyectar 20 mL de la muestra que constará del patrón de LF comercial (con una concentración de 5 mg/mL de LF y un total de proteína de 10 mg/mL a inyectar), anfolito al 2 % y el resto agua desionizada.
- 3.- Tapar la celda y después el Rotofor.
- 4.- Conectar las mangueras del refrigerante y prender.
- 5.- Conectar el Rotofor a la fuente de poder y correr a 15 W (constante) por 4-6 horas.
- 6.- Inyectar las fracciones obtenidas en tubos limpios y secos.

4.5 Técnica para desarrollar el polímero estampado molecularmente (MIP).

Para desarrollar el polímero estampado molecularmente se decidió utilizar como monómeros funcionales ácido metacrílico y 4-vinilpiridina y etilen glicol dimetacrilato como agente entrecruzante porque se ha demostrado que los sistemas basados en este tipo de moléculas producen polímeros con mayor especificidad.

Reactivos:

1. Ácido Metacrílico (MAA) (Mallinckrodt Organic Reagent, E.U.A.) almacenado en refrigeración.
2. 4-Vinilpiridina (VYP) (Aldrich, E.U.A.) almacenada en frasco ámbar y en refrigeración.
3. Acetonitrilo (J.T. Baker, México) almacenado en frasco ámbar y en refrigeración.
4. Etilen glicol dimetacrilato (EGDMA) (Aldrich, E.U.A.) conservado en refrigeración.
5. Persulfato de potasio (J.T. Baker, México) conservado en frasco ámbar y dentro de desecador.
6. Azobisisobutironitrilo (AIBN) (Aldrich, E.U.A.) almacenado a temperatura ambiente.
7. Nitrógeno gaseoso (AGA, México), pureza grado industrial.
8. Solución de hidróxido de sodio al 3% conservada a 4°C: Hidróxido de sodio lentejas industrial (Reactivos Analíticos REASOL, México) y agua desionizada.
9. La molécula plantilla en este caso es el patrón de LF (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) purificado por isoelectroenfoque.

Procedimiento:

1. Montar el reactor correspondiente limpio y seco.
2. Preparar dos mezclas de reacción por separado:
La 1ª contiene el medio de reacción (acetonitrilo), el entrecruzante (EDGMA), los monómeros funcionales (VYP o MAA) y la molécula a estampar (Patrón de LF purificado por isoelectroenfoque).
La 2ª mezcla contiene acetonitrilo y el iniciador (persulfato de potasio); la cual se debe mantener en un baño de agua a 60 °C.
3. Burbujear nitrógeno en ambas mezclas durante 5 minutos.
4. Mezclar ambas soluciones; burbujear nitrógeno durante 5 min y dejar reaccionar durante 16 h en un baño de agua a 60 °C.

4.5.1 Remoción de la plantilla.

Después de haber desarrollado el polímero estampado molecularmente fue necesario realizar un lavado del polímero con una solución de metanol:ácido acético, esto con la finalidad de remover la plantilla (patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) purificado por isoelectroenfoque).

Reactivos:

1. Solución de lavado: metanol (J.T. Baker, México):ácido acético (J.T. Baker, México) al 10% del volumen total de metanol, almacenada en refrigeración.

Procedimiento:

1. Adicionar al polímero 12 mL de la solución de lavado.
2. Dejar reposar la mezcla 1 h.
3. Centrifugar la muestra durante 10 min.
4. Recolectar el sobrenadante del lavado.
5. Repetir el procedimiento por lo menos 5 veces.
6. Secar el polímero en un desecador.

4.5.2 Enfrentamiento del polímero estampado molecularmente con una solución compleja de LF (Bioferrin™ 2000, E.U.A.).

Reactivos:

1. Solución del patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) a una concentración de 15 mg/mL.

Procedimiento:

1. Tomar una muestra del MIP y agregar 1 mL de la solución del patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.).
2. Agitar la mezcla en un vortex.
3. Dejar reposar la mezcla durante 48 horas.
4. Medir la concentración de proteína en el sobrenadante del polímero.

4.6 Técnica de complejación del Fe^{3+} y el ión SCN^{-}

Son bien conocidos varios iones complejos de hierro (III). Cuando se adiciona el ión tiocianato a una solución de un hierro (III) acuoso, se forma un complejo color rojo sangre. El ión se ha utilizado en el análisis de hierro (Ebbing, 1997).

Reactivos:

1. Tiocianato de potasio (J.T. Baker, México) 0.05 M en agua desionizada almacenado a temperatura ambiente.
2. Ácido nítrico concentrado (J.T. Baker, México) conservado a temperatura ambiente.

Procedimiento:

- 1.- Agregar 1 mL de muestra + 1 mL de ácido nítrico concentrado.
- 2.- Añadir a la solución 1.5 mL de KSCN 0.05 M.
- 3.- Esperar 160 s, para formar el complejo color rojo sangre
- 4.- Leer absorbancia a 505 nm.

4.7 Equipo utilizado.

En todos los análisis se utilizaron micropipetas de 0.1 -10 μL , 40-200 μL y 200-1000 μL . Las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A y en los casos en los que fue necesario mantener la temperatura constante se utilizó un controlador de temperatura Shimadzu TCC-240 A.

En las electroforesis se utilizó una cámara de electroforesis Mini-Protean III con una fuente de poder Power /Pac 300 (Bio Rad, E.U.A.). Los geles se agitaron e incubaron para lograr la eliminación del frente y la tinción en un Incubador Shaker Series 25 (New Brunswick Scientific Co. Inc, E.U.A.). Para el análisis de los geles se utilizó un equipo Gel Doc 1000, Single Wavelength Mini- Transilluminator (Bio Rad, E.U.A.) con una interfase a una computadora Pentium con el Molecular Analyst Software, versión 1.5.

Para la purificación del patrón de lactoferrina comercial se utilizó un Rotofor con una fuente poder Power / Pac 3000 (Bio Rad, E.U.A.) y un sistema refrigerante a 4 ° C.

Para realizar el polímero estampado molecularmente se utilizó un equipo Semimicro Kem-Kits (Kontes, E.U.A.) y cuando fue necesario realizar la polimerización por UV, se utilizaron 2 lámparas de UV (Blas-Ray, modelo B100 AP, E.U.A.).

4.8 Diseño experimental y modelo estadístico

Las curvas patrón se realizaron por triplicado, utilizando una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y tomando como referencia de confiabilidad el coeficiente de correlación (R) de cada ecuación (con un valor ≥ 0.9).

Cada experimento se realizó por triplicado y los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y en algunos casos a una prueba de comparación de medias de Tukey - Kramer y Duncan, con un rango de error ($\alpha < 0.05$), utilizando el software NCSS para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación, caracterización y purificación del Patrón de LF comercial.

5.1.1 Caracterización e Identificación del patrón de LF comercial.

Para cumplir los objetivos planteados en el presente proyecto de investigación, fue necesario realizar una caracterización sobre el patrón de lactoferrina comercial, determinando los siguientes parámetros: concentración de proteína por el método de Lowry, cuantificación de azúcares reductores por DNS y totales por Fenol Sulfúrico, así como una determinación de cenizas. Es importante mencionar que no se realizó un análisis composicional completo porque solo se quería conocer si el patrón de LF (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) contenía azúcares o sales iónicas. Se sabe que estas moléculas al contener grupos cargados pueden afectar el campo eléctrico evitando que las proteínas corran de forma adecuada al momento de realizar una electroforesis en gel de policacrilamida. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7. Determinaciones realizadas al patrón de LF comercial
(Bioferrin™ 2000, E.U.A.).**

Proteína (%)	Azúcares reductores (%)	Azúcares totales (%)	Cenizas (%)
56.37	3.42	6.21	1.98

Los resultados de estos análisis arrojaron información muy importante acerca del patrón de LF comercial, ya que se encontró que solo el 56.37 % es proteína. Así mismo, el porcentaje de cenizas y azúcares totales fue de 1.98 y 6.21 respectivamente, lo cual significa que el patrón de LF contiene una baja cantidad de estos componentes y por tanto no serán un factor que afecte la electroforesis.

Para la identificación del patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) se realizó una electroforesis nativa en un gel de poliacrilamida T=10%, inyectando las siguientes muestras (fig 6): carril 1.- Patrón de pesos moleculares que iban de 45 a 200 kDa, obteniéndose la siguiente curva patrón de PM, (Apéndice I inciso 4):

$$PM \text{ (kDa)} = 10^{\wedge} (5.4132 - 1.1019 \text{ rf})$$

$$R = 0.9914$$

Así mismo, en el carril 3.- Patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.); carril 5 y 7.- seroalbúmina y β-lactoglobulina como proteínas patrón; carril 9.- WPC 34 (*Whey Protein Concentrate*), con la finalidad de encontrar la banda correspondiente a la LF.

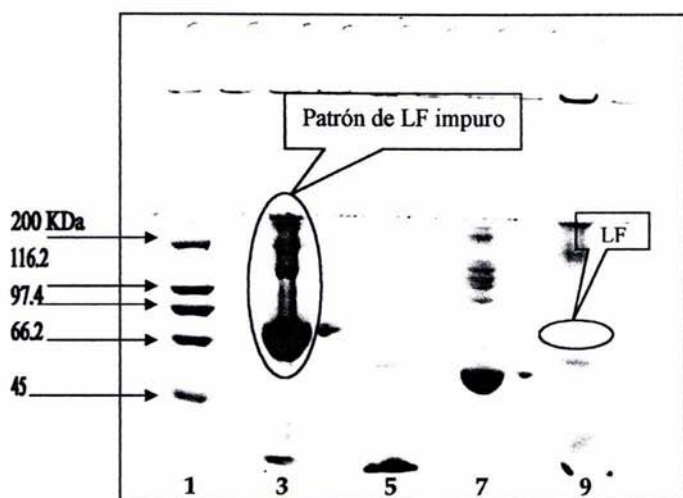


Fig 6. Electroforesis nativa en gel de Poliacrilamida T=10%, teñido con Sypro Orange Protein Stain.

Carriles: 1.- Patrón de PM; 3.- Patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) (5mg/mL); 5.- βLG (3mg/mL); 7.- SA (2mg/mL); 9.- WPC 34.

Se calcularon los pesos moleculares de cada una de las bandas presentes en cada carril (fig 6), con base en sus respectivos rf 's utilizando la ecuación de PM obtenida a partir de la curva patrón (Apéndice I inciso 4). Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Pesos moleculares estimados de cada una de las bandas presentes en cada carril (figura 6).

Muestra	No. Banda	rf	PM estimado (kDa)
Patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.)	1	0.0526	226.589
	2	0.1157	193.028
	3	0.2	155.890
	4	0.4315	86.642
Seroalbúmina	1	0.5789	59.608
WPC 34	1	0.1157	193.0679
	2	0.3789	89.0125
	3	0.4842	75.7983

Con base en los resultados obtenidos en el gel de electroforesis (fig. 6), se puede observar la banda correspondiente a la LF, la cual se identifica como la banda más intensa y ancha del carril 3, que de acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 8, le corresponde un PM de 86.6 kDa, lo cual es un resultado aceptable ya que el PM teórico de la LF es aproximadamente 80 kDa, sin embargo, también se observa que el patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) se encuentra contaminado, ya que se observan otras 3 bandas que por su PM probablemente sean Inmunoglobulinas; de hecho son las proteínas más grandes del suero de leche (Alais, 1998).

Así mismo, también se logró identificar LF en el WPC, la cual se identifica por ser la 2a. banda del carril 9, con un PM de 89.01 kDa. Este es un resultado interesante ya que el WPC podría ser la fuente de donde se recupere posteriormente la lactoferrina.

5.1.2 Purificación del Patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.).

El Estampado molecular es una técnica basada en la especificidad, por lo que requiere que la molécula a estampar posea un alto grado de pureza, por ello, se realizó una purificación del patrón de lactoferrina comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.); de esta manera sería más fácil formar el complejo entre la molécula a estampar y los monómeros funcionales, para posteriormente remover la molécula objetivo y dar paso a una cavidad específica que reconozca únicamente a la lactoferrina cuando se realicen las pruebas correspondientes.

Todas las proteínas presentan una carga neta que es dependiente del pH. Esta carga está determinada por la secuencia de aminoácidos de la proteína y por el pH del ambiente en el que se encuentra. El isoelectroenfoque es una técnica que aprovecha esta propiedad de las proteínas para separarlas.

En el isoelectroenfoque, las proteínas son sometidas a un gradiente de pH al que se le aplica cierto voltaje, provocando la migración de las proteínas hasta alcanzar el pH en donde la carga neta es cero, en este punto las proteínas dejan de migrar y se dice que se han centrado o concentrado en su punto isoeléctrico (pI).

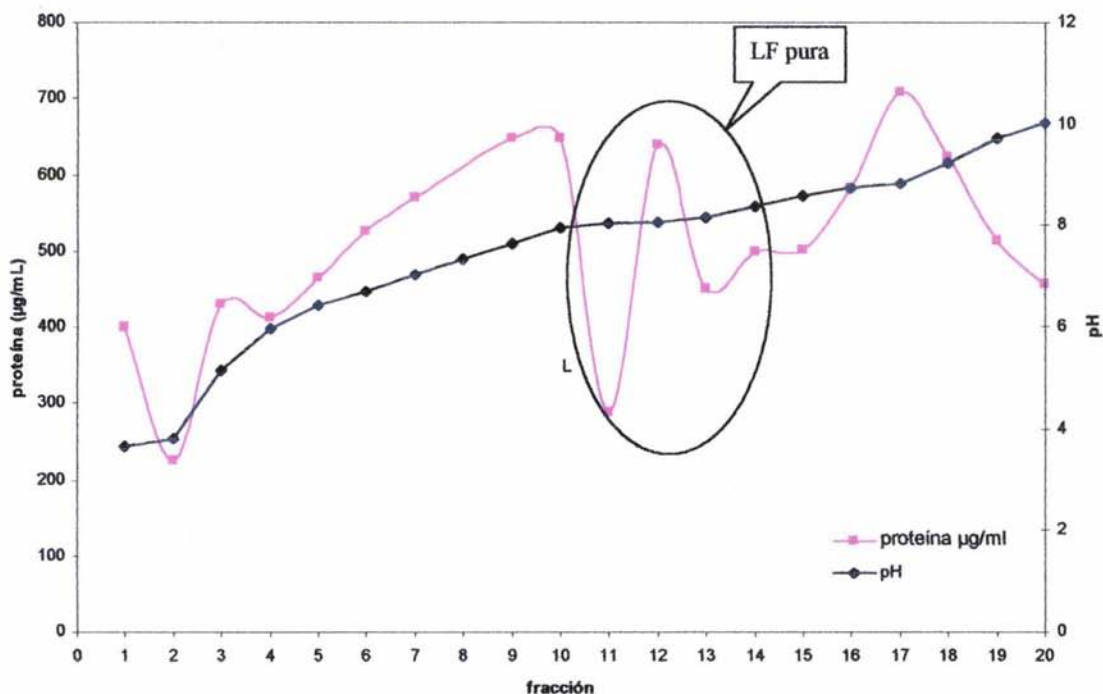
El Rotofor utiliza el isoelectroenfoque para la separación de las proteínas en una determinada muestra, junto con un anfolito que tienen la función de estabilizar el gradiente de pH.

Se corrió la muestra en el Rotofor y se obtuvieron 20 fracciones de aproximadamente un mL. Primero se les determinó el pH a las fracciones obtenidas por medio de un potenciómetro para saber el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas presentes, y como segundo paso fue la cuantificación de proteína por el método de Lowry con la finalidad de calcular la concentración presente de proteína en cada una de las fracciones, haciendo uso de la curva patrón de proteína anteriormente descrita.

En la tabla 9 y la gráfica 1 se muestran los resultados de la purificación del patrón de lactoferrina (Bioferrin™ 2000, E.U.A.), donde se observan los valores de pH, así como la concentración de proteína en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las 20 fracciones recolectadas.

Tabla 9. Valores de pH y concentración de proteína de las 20 fracciones obtenidas después de someter el patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) a una purificación por isoelectroenfoque.

Fracción	pH	Concentración promedio de proteína $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	3.66	399.54
2	3.8	226.06
3	5.14	431.35
4	5.97	412.645
5	6.42	463.995
6	6.69	526.615
7	7.04	570.665
8	7.34	-----
9	7.65	648.55
10	7.96	647.66
11	8.05	289.01
12	8.06	640.255
13	8.15	450.915
14	8.39	499.59
15	8.6	502.515
16	8.74	582.825
17	8.82	708.7
18	9.23	624.3
19	9.73	512.975
20	10.03	457.225



Gráfica 1. Purificación del patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.) por la técnica de isoelectroenfoque. Número de Fracción contra concentración de proteína (µg/mL) y pH.

En la gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos de la purificación del patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.), al graficar el número de fracción contra pH (línea azul), se observa un comportamiento lineal, lo cual significa que la corrida del rotofor se realizó correctamente. Así mismo, se observa que a diferentes valores de pH, se tiene una concentración de proteína distinta (línea rosa). Las fracciones 11 a 14 con pH de 8.05 a 8.39 son las más cercanas al pI de la LF (pI=8) por lo que se observa un pico en sus concentraciones, lo que sugiere presencia de LF en dichos valores de pH.

Posteriormente, para comprobar el proceso de purificación fue necesario realizar una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida T=10% para determinar la pureza de las fracciones. Es importante mencionar que para la realización del gel de electroforesis, se tomaron en cuenta aquellas fracciones en las que el pH fuera cercano al punto isoeléctrico de la LF pI= 8. Así mismo, otro factor para la elección de las muestras fue la coloración rojiza que presentaban las fracciones 15 - 20. Se sabe que la lactoferrina es la proteína roja de la leche debido a que posee dos átomos de Fe^{3+} que son los que le dan el color característico, por lo que se intuyó presencia de esta proteína en las fracciones coloridas.

Por lo tanto, las fracciones utilizadas para la realización del gel fueron: 11 a 14 basadas en un pH cercano al pI de la LF y las fracciones 15 a 20 basadas en la presencia de un color rojo. Así mismo, se inyectaron las proteínas patrón seroalbúmina y β -Lactoglobulina así como un patrón de pesos moleculares que iban de 45 a 200 kDa (fig 7), obteniéndose la siguiente curva patrón de PM (Apéndice I inciso 5).

$$PM \text{ (kDa)} = 10^{(5.38 - 1.3371 \text{ rf})}$$

$$R = 0.9836$$

En la figura 7 se muestran los resultados del gel de electroforesis.

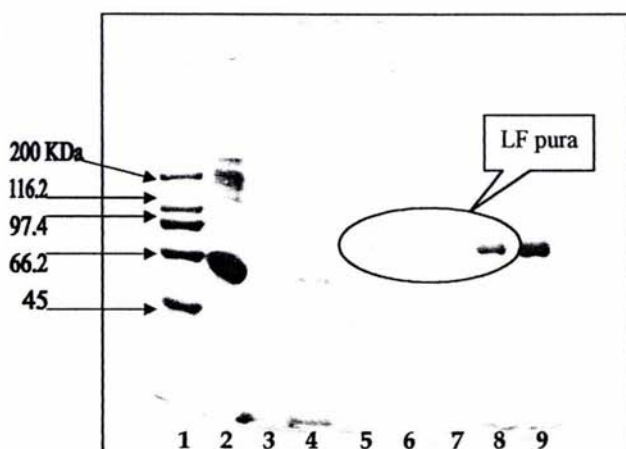


Fig 7.- Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida T=10% teñido con azul de coomassie.

Carriles: 1.-Patrón de PM; 2.-SA (2mg/mL); 3 y 4.-BLG (3mg/mL); 5.-Fracción 11; 6.-Fracción 12; 7.-Fracción 13; 8.-Fracción 14; 9.- Fracción 15.

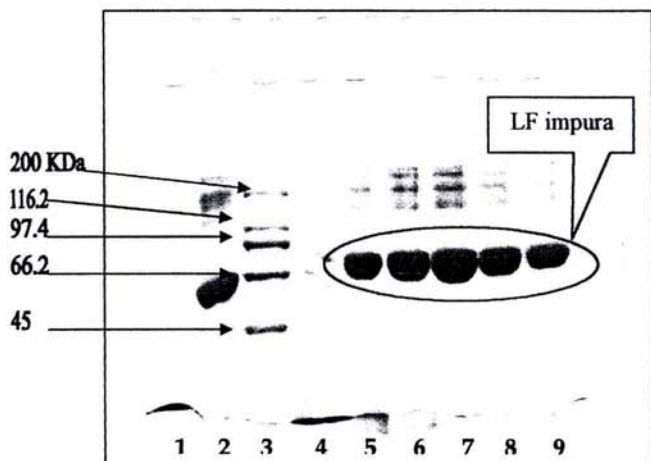


Fig 8.- Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida T=10% teñido con azul de coomassie.

Carriles: 1.- βLG (3mg/mL); 2.- SA (2 mg/mL); 3.- Patrón de PM; 4.- βLG (3mg/mL); 5.-Fracción 16; 6.-Fracción 17; 7.- Fracción 18; 8.- Fracción 19; 9.- Fracción 20.

En el gel de electroforesis (figura 7) se observa que las fracciones 11-14 con un pH cercano al pI de la LF son las únicas que presentan una sola banda, lo cual sugiere que la LF se encuentra pura en dichas fracciones, aunque existe la posibilidad de que se encuentre diluida ya que es una banda tenue y delgada y por tanto no se perciben la presencia de otras bandas. En la figura 8 se puede observar que las fracciones 15-20 (muestras coloridas) efectivamente contienen LF incluso en mayor concentración sin embargo, estas muestras no se encuentran puras ya que se observa la presencia de otras tres bandas lo que indica que las fracciones se encuentran contaminadas con otras tres proteínas.

Se calcularon los pesos moleculares de cada una de las bandas presentes en el gel de acuerdo con los r_f 's de cada muestra (es importante mencionar que únicamente se les calculó el PM a las fracciones puras 11 a 14) (Tabla 10), mediante la ecuación de PM obtenida a partir de la curva patrón (Apéndice I inciso 5). Es importante mencionar que cada vez que se realiza un gel de electroforesis con un marcador de PM, se debe realizar una gráfica de r_f del estándar de PM contra el \log PM, debido a que no todos los geles son iguales, ni corren de la misma forma; existen muchos parámetros que pueden contribuir a que las muestras corran diferente, como por ejemplo: el campo eléctrico, o las cargas de las proteínas.

Tabla 10. Pesos moleculares estimados de las bandas correspondientes a las fracciones 11 -14 (figura 7).

Muestra	No. Bandas	Rf	PM estimado (kDa)
SA ¹	1	0.429	64.030
Fracción 11	1	0.339	84.474
Fracción 12	1	0.339	84.474
Fracción 13	1	0.339	84.474
Fracción 14	1	0.339	84.474

¹SA= Albúmina sérica bovina

Al realizar los cálculos correspondientes, efectivamente se comprobó que las fracciones de la 11 a la 14 corresponden a la lactoferrina ya que tienen un PM que coincide con el PM teórico (80kDa); con ello se comprueba la pureza de las muestras; además estas fracciones son las que poseen el pH más cercano al punto isoeléctrico de la LF ($pI= 8$).

Haciendo uso de la cuantificación de proteína de cada una de las fracciones recolectadas del rotofor según la tabla 9 y tomando en cuenta el factor de dilución y el volumen final de cada muestra, se determinó la concentración total de LF purificada por isoelectroenfoque, (fracciones 11-14). El resultado obtenido fue de 9.32 mg cantidad de LF que se utilizó como plantilla para realizar el estampado molecular.

5.2 Desarrollo del Polímero estampado molecularmente (MIP).

Para desarrollar el estampado molecular se utilizó como plantilla a la LF pura, y se sintetizaron tres polímeros diferentes con los siguientes monómeros funcionales:

El 1º se realizó utilizando VYP y se le denominó MIP₁.

El 2º fue una combinación de monómeros MAA y VYP denominándolo MIP₂.

En ambas polimerizaciones se utilizó como agente entrecruzante EDMA y como catalizador de la reacción $K_2S_2O_8$. Las condiciones de polimerización en cuanto a tiempo y temperatura fueron de 60 °C durante 16 h. Los dos polímeros estampados molecularmente se observan en la figura 9.

El 3º se realizó utilizando los mismos monómeros funcionales, así como el mismo entrecruzante que en el 2º polímero, sin embargo, las condiciones de trabajo fueron diferentes: se polimerizó con luz ultravioleta en tubos de cuarzo durante 16 h y se utilizó como catalizador de la reacción AIBN. A este polímero se le denominó MIP₃.

A cada polímero estampado molecularmente (MIP₁, MIP₂, y MIP₃) se le sintetizó su respectivo blanco (B), el cual consiste de los mismos monómeros funcionales que componen a cada MIP, pero no contiene la molécula plantilla (LF pura), denominándolos B₁, B₂ y B₃ respectivamente. Esto se realizó con la finalidad de comparar la capacidad de sorción de cada MIP con la de sus blancos. En teoría se sabe que los blancos al no tener plantilla que estampar, no poseen una cavidad específica capaz de ligar LF, a diferencia de los MIP's que si la tienen, por tanto se esperaba que la capacidad de sorción de los B's fuera menor que la de los MIP's.

5.2.1 Remoción de la plantilla (patrón de LF comercial purificado por isoelectroenfoque).

De acuerdo a la literatura y por las condiciones de trabajo utilizadas al momento de realizar el estampado molecular las interacciones que se producen entre el polímero y la plantilla son de carácter débil como lo son: los puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas entre otras. Por tanto es posible remover la plantilla del polímero realizando lavados extremos con una solución metanol:ácido acético.

Para comprobar la remoción de la plantilla se recuperó el sobrenadante de cada lavado y se le determinó concentración de proteína por los métodos de Bradford y Lowry, los cuales se basan en la presencia de grupos amino y anillos aromáticos respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos después de realizar numerosos experimentos incluso hasta agotar las muestras, eran bastante ilógicos por lo que se llegó a la conclusión de que probablemente el anillo aromático así como el grupo amino que compone a la vinilpiridina interfirieron en las determinaciones evitando así comprobar la remoción de la plantilla de los polímeros estampados molecularmente. Sin embargo, como se verá mas adelante existe evidencia de que éste suceso sí ocurrió, ya que uno de los tres polímeros es capaz de ligar específicamente LF a partir de una mezcla compleja de proteínas.

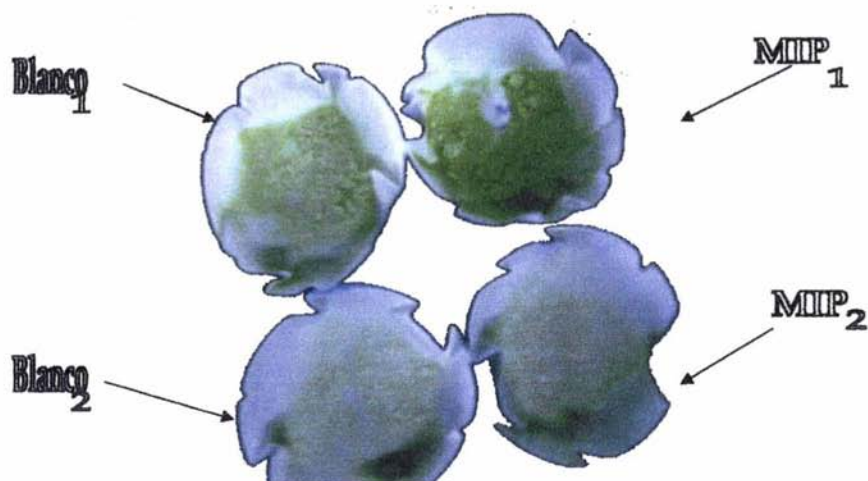
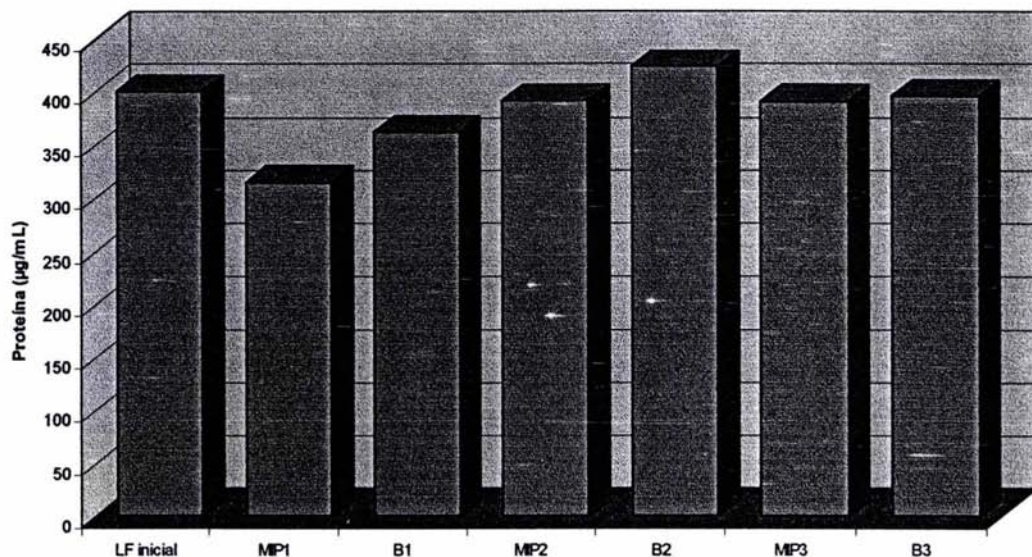


Figura 9. Polímeros Estampados Molecularmente MIP₁, MIP₂ así como sus respectivos Blancos.

5.2.2 Enfrentamiento del polímero estampado molecularmente con una solución compleja de LF.

Los MIP's (MIP₁, MIP₂ y MIP₃) así como sus respectivos blancos (B₁, B₂ y B₃), fueron enfrentados a una solución compleja de concentración conocida (patrón de LF comercial Bioferrin™ 2000, E.U.A. a 15 mg/mL), para determinar la capacidad de sorción de los polímeros sintetizados mediante una disminución de proteína libre. Es importante mencionar que para la determinación de este parámetro fue necesario centrifugar los polímeros para después tomar una alícuota de los sobrenadantes (SN) restantes, determinando en ellos la disminución de proteína por medio de una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida, analizando los resultados mediante el programa Molecular Analyst Software, versión 1.5.

Los resultados en cuanto a la capacidad de sorción de los MIP's y sus B's se presentan en la gráfica 2.



Gráfica 2.- Concentración de proteína (determinada por electroforesis nativa utilizando el programa Molecular Analyst Software, versión 1.5) ($\mu\text{g/mL}$) presente en los SN de los polímeros estampados molecularmente (MIP_1 , MIP_2 y MIP_3) así como la de sus respectivos blancos (B_1 , B_2 y B_3) después de haber sido enfrentados al patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.).

Al observar la gráfica 2, aparentemente la concentración de proteína en los SN's de cada MIP, así como la de sus blancos, es diferente en comparación con la del patrón inicial de LF; sin embargo, el análisis estadístico aplicado a estos datos arrojó que solo la concentración del SN perteneciente al MIP₁ era diferente ($\alpha=0.006$), por tanto no existe diferencia significativa en las demás concentraciones, incluyendo la de su propio blanco (B₁) con respecto al patrón inicial.

Por tanto la disminución de proteína en el SN del MIP₁ demuestra que solo éste polímero es el único que posee la capacidad de absorber proteína después de enfrentarse a una solución compleja de LF, por lo cual para el resto de la investigación solo se utilizó el MIP₁.

Se utilizó la técnica de electroforesis nativa (EFN) con la finalidad de evaluar la especificidad del MIP₁, ya que por medio de su uso se puede conocer si el MIP₁ liga específicamente LF o bien, a cualquier otra proteína. Además permite conocer la proporción en que lo hace.

5.2.3 Eficiencia en la capacidad de sorción del MIP₁ y B₁ sobre el patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.). Determinada por Electroforesis nativa.

Para comprobar el efecto del MIP₁ después de haber sido enfrentado al patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.), se realizó una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida T= 10 %, inyectando solo los SN's pertenecientes al MIP₁ y B₁ así como una solución del patrón de LF a una concentración de 1.5mg/mL (hay que recordar que ésta consta de 4 proteínas distintas), por lo tanto, con este ensayo se comprobaría la funcionalidad del polímero así como su especificidad. Los resultados se presentan en la figura 10.

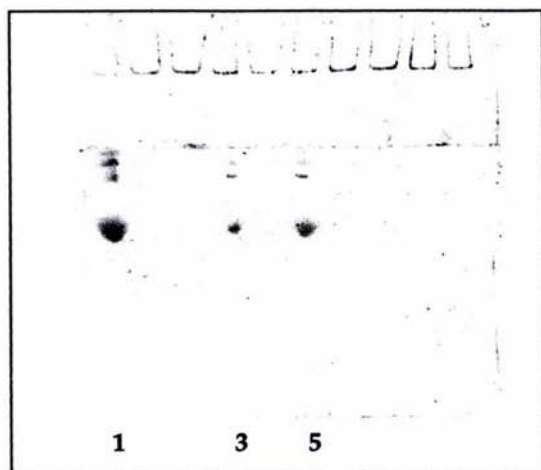


Fig 10. Electroforesis nativa en gel de Poliacrilamida T=10% teñido con Sypro Orange Protein Stain.

Carriles: 1.-Patrón de LF inicial (Bioferrin™ 2000, E.U.A. 1.5mg/mL); 3.- SN del MIP₁; 5.- SN del B₁.

Se pueden observar en el gel de electroforesis (fig 10) las bandas correspondientes a los SN's del B₁ y MIP₁; éstas se observan menos intensas que las bandas del patrón de LF, lo cual indica que hay una disminución en la concentración de proteína en los sobrenadantes de los polímeros enfrentados, y por tanto, ambos polímeros absorbieron proteína.

Si comparamos entre sí las bandas de LF de los SN B₁ y MIP₁, se observa que en éste último la banda de LF es menos intensa, por tanto el polímero estampado molecularmente MIP₁ absorbió mayor cantidad de LF. Probablemente este resultado se debe a que el MIP₁ posee una cavidad que liga específicamente LF a diferencia de su blanco, por lo que al momento de haber sido enfrentado a la solución compleja de proteínas, éste absorbió mayor cantidad de LF.

Para realizar un estudio cuantitativo sobre las concentraciones de los sobrenadantes de los polímeros, se utilizó el programa Molecular Analyst Software versión 1.5, donde se tomó en cuenta cada una de las bandas presentes en cada carril, obteniéndose así la concentración total de cada muestra; así mismo, se calcularon las proporciones de cada una de las proteínas presentes. La comparación de los resultados se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Concentración de proteína presente en cada una de las bandas observadas en el gel de electroforesis (figura 10).

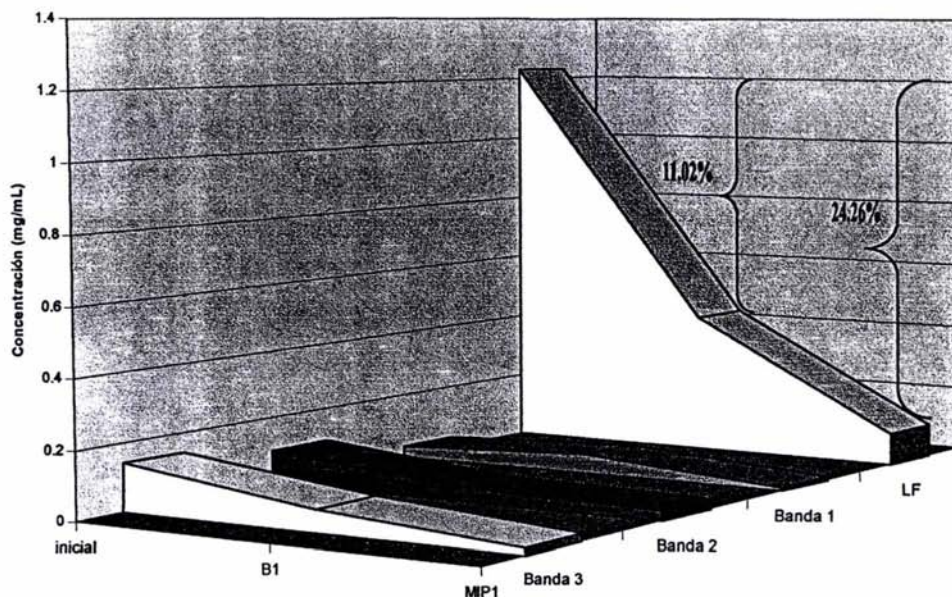
Muestra	No. Bandas	Concentración (mg/mL)	Proporciones %
Patrón de LF inicial	1	0.031382598	2.092173214
	2	0.099455431	6.630362069
	3	0.140138373	9.342558185
	4 (LF)	<u>1.229023598</u>	81.93490653
		Total= 1.5	
SN MIP ₁	1	0.011007755	6.85127531
	2	0.029193712	18.17029509
	3	0.020769607	12.92709533
	4(LF)	<u>0.099696169</u>	62.05133581
		Total=0.160667	
SN B ₁	1	0.056670884	9.619317476
	2	0.037469494	6.360072985
	3	0.065498888	11.11778173
	4(LF)	<u>0.429496973</u>	72.90282801
		Total=0.589136	

Con los resultados de la tabla 11 se observa que ambos polímeros absorbieron proteína, sin embargo, el MIP₁ fue el que absorbió mayor cantidad de proteína. Comparando las concentraciones de cada una de las bandas, se obtiene que la banda de LF perteneciente al patrón de LF tiene una concentración de 1.23 mg/mL, lo que representa el 82% de la concentración inicial de proteínas, mientras que la del SN del MIP₁ tiene 0.01 mg/mL lo que representa el 62%, esto significa que hubo una disminución del 24.26 % con respecto a la concentración original.

La concentración de LF en el SN del B₁ es de 0.43 mg/mL, lo que representa el 73% por tanto, se obtiene una disminución del 11.02%.

Con los resultados de la tabla 11, se comprueba que efectivamente el MIP₁ posee mayor capacidad de sorción frente a la lactoferrina, y se confirma también que tiene especificidad por la misma, ya que al observar la columna de proporciones solo el valor correspondiente a la LF en el MIP₁ disminuye, mientras que los otros valores aumentan. Este comportamiento también se observa en el B₁ sin embargo, la diferencia entre estos dos polímeros en cuanto a su capacidad de sorción frente a la LF es considerable.

Para observar mejor este comportamiento se graficaron los resultados como se muestra en la gráfica 3, tratando de ilustrar la disminución de proteína en cada una de las bandas de los SN del MIP₁ y B₁, con respecto a las del patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.), después de haber sido enfrentados.



Gráfica 3.- Disminución de proteína de cada una de las bandas de los SN del MIP₁ y B₁ después de haber sido enfrentados a una solución del patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.).

Como se puede observar en la grafica 3, en general hay un comportamiento decreciente de la concentración de proteína de cada una de las bandas, incluyendo la LF de los SN's pertenecientes al B₁ y MIP₁, con respecto a la concentración inicial.

Sin embargo, si comparamos entre si la banda correspondiente a la LF del SN del B₁ con la del SN del MIP₁, se observa que existe una diferencia significativa en la concentración de LF, lo que comprueba la especificidad del MIP₁ para ligar LF a diferencia de su propio blanco, que también absorbe, pero es notorio que su funcionalidad es baja, pues no absorbe la misma cantidad de LF.

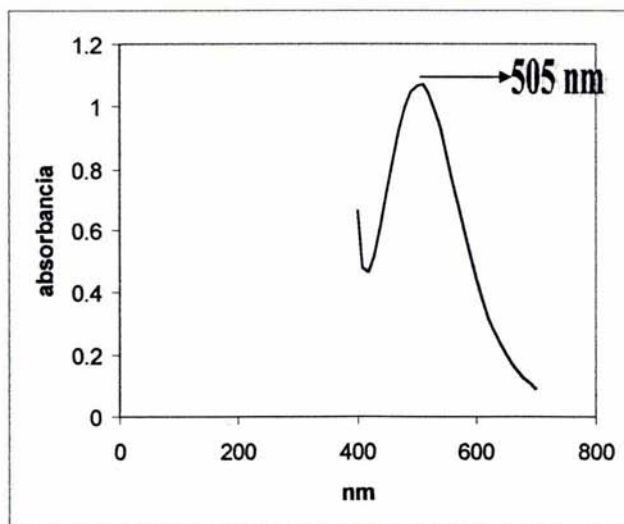
5.2.4 Eficiencia en la capacidad de sorción del MIP₁ y B₁ sobre el patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.). Determinada por complejación del Fe³⁺ con el ión SCN⁻.

La lactoferrina es la única proteína del suero de leche que posee dos átomos de Fe³⁺ dentro de su estructura, por ello se decidió aprovechar esta propiedad para cuantificar de manera indirecta la cantidad de LF presente, utilizando una reacción muy común en la industria de alimentos:



Cuando se adiciona el ión tiocianato a una solución de un hierro (III) acuoso, se forma un complejo de color rojo sangre.

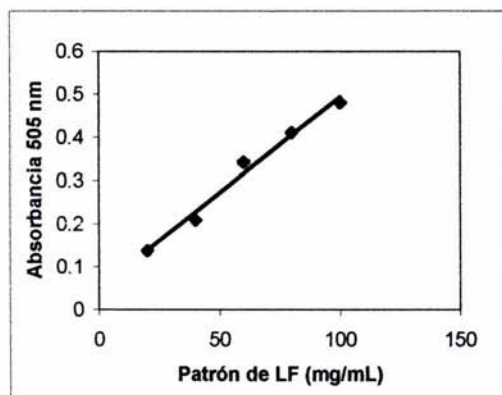
Como primer paso se determinó el espectro de absorción del complejo [FeSCN]²⁺ para encontrar la longitud de onda a la cual presentaba la máxima absorbancia, el cual se presenta en la gráfica 4.



Gráfica 4 .Espectro de absorción del complejo [FeSCN]²⁺.

La longitud de onda donde se observó la máxima absorción fue de 505 nm, longitud a la cual se midieron todas las determinaciones posteriores.

Se sabe que el color rojo absorbe a una longitud de onda alrededor de 500-515nm, sin embargo, en este experimento no se sabía si la intensidad del color rojo del complejo formado era proporcional a la concentración; por tanto se realizó una curva patrón de LF para observar si efectivamente el comportamiento era de forma lineal. La curva patrón obtenida se muestra en la gráfica 5.



Gráfica 5.- Curva patrón de LF

Patrón de LF (mg/mL)	Abs ₁ 505 nm	Abs ₂ 505nm	Abs ₃ 505 nm
20	0.1375	0.1422	0.1350
40	0.2107	0.2103	0.2036
60	0.4058	0.3230	0.2993
80	0.4165	0.4203	0.3960
100	0.4412	0.5029	0.4982

$$P \text{ (mg/mL)} = (\text{Abs}_{505} - 0.0498) / 0.0044$$

$$R = 0.9920$$

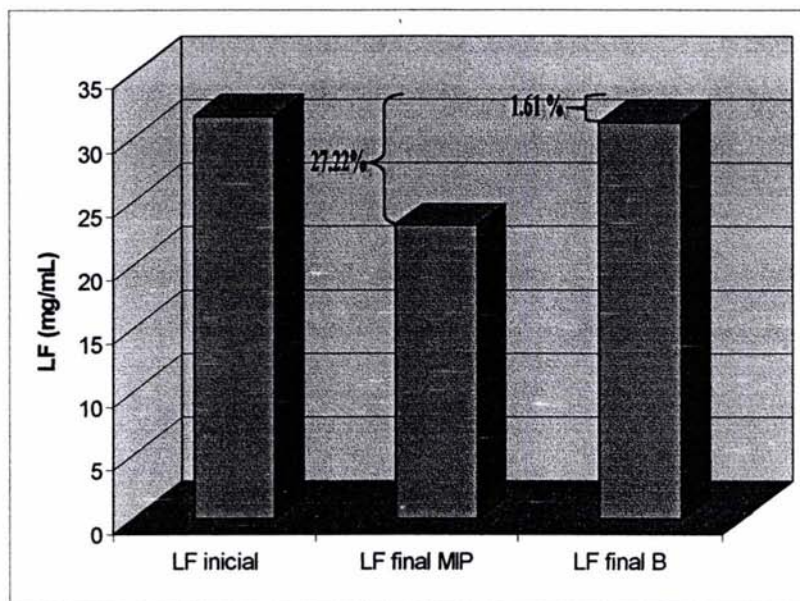
Como se muestra en la gráfica 5, la intensidad del color rojo es proporcional a la concentración de LF, por tanto a los sobrenadantes del MIP₁ y B₁, así como a una solución que contenía al patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.), se les aplicó la técnica de complejación anteriormente descrita; los valores de absorbancia obtenidos del complejo formado se interpolaron en la curva patrón de LF, obteniéndose indirectamente la cantidad de lactoferrina presente en los sobrenadantes del MIP₁ y B₁. Los resultados de estas determinaciones se presentan a la tabla 12.

Tabla 12. Concentración de LF presente en los sobrenadantes del MIP₁, B₁ y patrón de LF comercial. Valores determinados por complejación del Fe³⁺ y el ión SCN⁻.

Muestra	X Lactoferrina (mg/mL)	Disminución de proteína %
Patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.)	31.66	-----
MIP ₁	23.04	27.22
B ₁	31.15	1.61

El análisis estadístico aplicado a los resultados anteriores arroja que la concentración de LF en el SN del MIP₁ es significativamente menor ($\alpha= 0.07285$) a la del patrón inicial de LF. Así mismo, la concentración de LF en el B₁ es igual a la del patrón de LF.

Analizando gráficamente los resultados, se observa claramente el efecto del MIP₁ y B₁ con respecto a la concentración inicial de LF (gráfica 6).



Gráfica 6. Efecto del MIP₁ y B₁ sobre el patrón de LF comercial (Bioferrin™ 2000, E.U.A.). Comparación de lactoferrina presente en los sobrenadantes del MIP₁ y B₁ con respecto a la del patrón de LF. Determinada por complejación Fe³⁺ y el ión SCN⁻.

Observando el efecto del MIP₁ sobre el patrón de LF comercial, se encuentra que la concentración de lactoferrina disminuyó el 27% con respecto a la concentración inicial de LF, aunque en el B₁ se observa una disminución del 1.06%, estadísticamente, éste último es igual al patrón de LF comercial ($\alpha > 0.1$), lo que significa que el MIP₁ posee la capacidad de absorber específicamente lactoferrina.

Realizando una comparación de los resultados obtenidos por la técnica de electroforesis nativa (gráfica 3) con los obtenidos en la gráfica 6, se obtienen los datos de la tabla 13.

Tabla 13. Comparación porcentual de los valores obtenidos por electroforesis y por complejación del Fe^{3+} y el ión SCN^- .

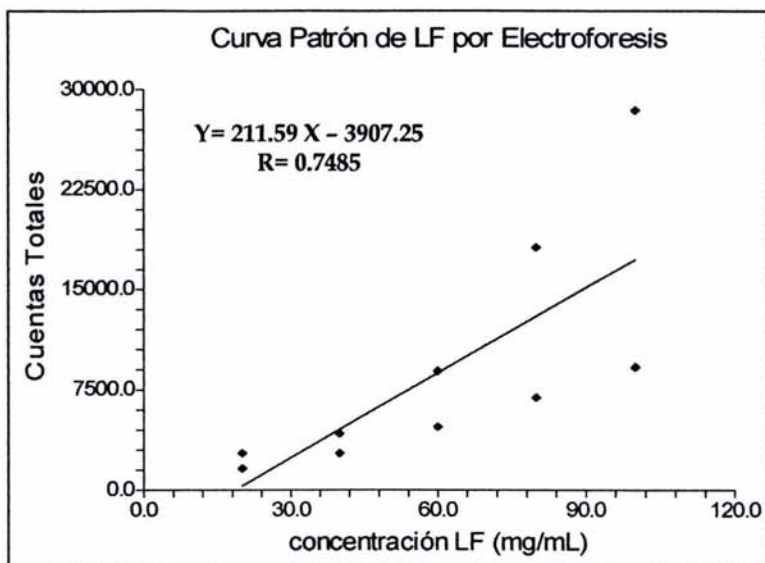
Técnica	Disminución de LF en los SN's %.	
	MIP ₁	B ₁
Electroforesis nativa	24.26	11.02
Reacción del Fe^{3+} con SCN^-	27.22	1.61

Como se puede observar en la tabla 13, los resultados obtenidos por ambas técnicas en cuanto a la disminución de lactoferrina del SN MIP₁ coinciden; no existe diferencia significativa entre ambos; sin embargo, hay una discrepancia con los obtenidos en el B₁, ya que el valor obtenido por EFN es 11 veces menor que el obtenido por la técnica del Fe^{3+} .

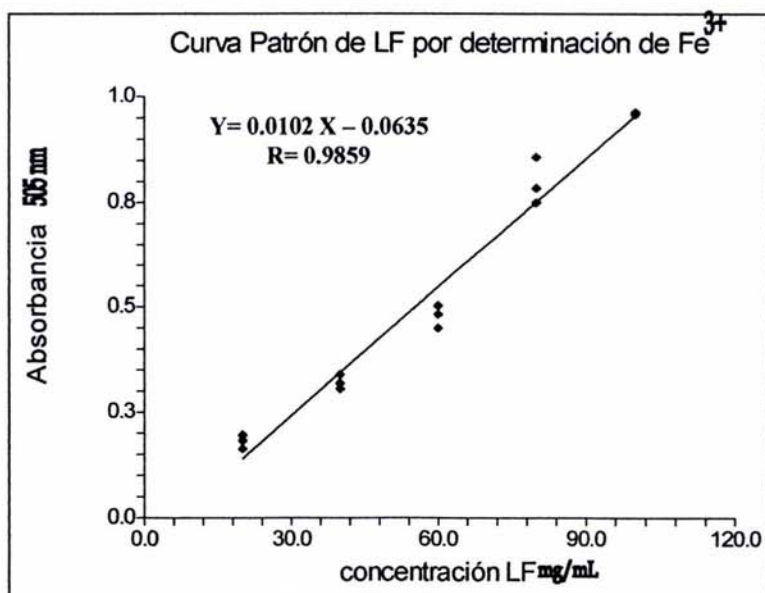
Por ello fue necesario realizar un estudio que permitiera analizar estas dos técnicas, con la finalidad de conocer cuál de ellas es la que arroja resultados más confiables.

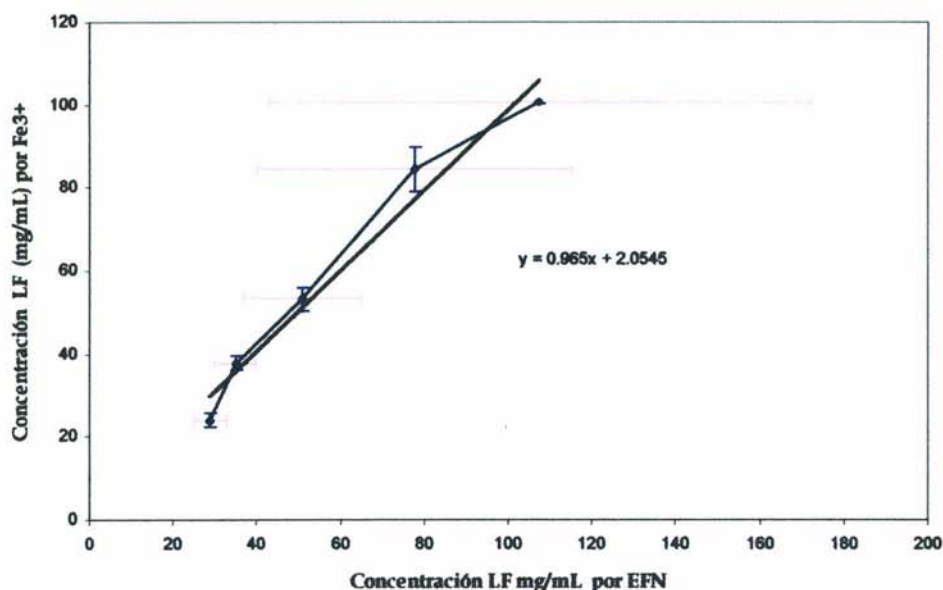
El estudio consistió en realizar una curva patrón de LF por las técnicas de EFN y por la del Fe^{3+} con el ión SCN^- , con el fin de comparar los coeficientes de correlación, ya que éstos arrojarían información sobre cuál de estas dos técnicas es la que presenta una mejor linealidad.

Posteriormente fue necesario graficar la concentración de LF determinada por EFN contra la concentración de LF determinada por la técnica del Fe^{3+} , así como sus respectivas desviaciones estándar, para así poder determinar cuál de estas dos técnicas es la que presenta mayor dispersión. Los resultados se presentan en las gráficas 7, 8 y 9.



Gráfica 7.- Curva patrón de LF determinada por la técnica de EFN.

Gráfica 8.- Curva patrón de LF determinada por la técnica del Fe³⁺ con el ión SCN⁻.



Gráfica 9.- Relación gráfica de la concentración de LF obtenida por la técnica de EFN y la obtenida por la técnica del Fe³⁺ con el ión SCN⁻ así como sus respectivas desviaciones estándar..

Si comparamos entre sí las curvas patrón (gráficas 7 y 8), se puede observar que la curva obtenida por EFN presenta una gran dispersión en los datos, a diferencia de la gráfica 8, donde la dispersión es muy pequeña; así mismo, los coeficientes de correlación nos indican que existe una mejor linearidad en los datos obtenidos por la técnica del Fe³⁺, lo que significa que esta técnica es mucho más precisa y confiable en los resultados que arroja, que la técnica de EFN.

En la gráfica 9, se demuestra que efectivamente la técnica menos precisa es la de EFN, debido a que presenta desviaciones estándar muy grandes (líneas rosas), en comparación con las del Fe³⁺ (líneas azules), lo que indica que existe una alta probabilidad de error en los resultados que arroja. Así mismo se observa que, a concentraciones altas de proteína, la técnica de EFN se vuelve más imprecisa, ya que no distingue diferencias entre concentraciones mayores a 50 mg/mL.

CONCLUSIONES

En esta investigación se obtuvieron tres polímeros estampados molecularmente, donde solo uno demostró poseer la capacidad de absorber lactoferrina.

Con los resultados obtenidos se demostró que el MIP₁ es el único capaz de ligar LF de una solución compleja de proteínas, en una proporción del 27%, mientras que su blanco solo es capaz de ligar el 1.02% de LF respecto a la concentración original, lo cual es un resultado importante pues se demuestra que la técnica de Estampado Molecular podría servir para la recuperación de la lactoferrina por lo que se comprueba la hipótesis planteada. Se tiene claro que a las condiciones a las que fueron sintetizados los MIP's son condiciones de desnaturalización para la LF por lo tanto, no se podría obtener un estampado molecular completo de la molécula de LF. Sin embargo, estos resultados sugieren que probablemente solo una parte de la LF es la que fue estampada, tal vez sea un péptido pequeño, un dominio, los azúcares que la componen o el mismo Fe³⁺ son los que esta reconociendo específicamente el polímero (MIP₁) al momento de enfrentarlo con una solución compleja de LF.

Por otra parte, se sugiere que se logró la remoción de la plantilla del MIP₁ debido a que las interacciones que se producen entre el polímero y la plantilla son de carácter débil así mismo, el grado de entrecruzamiento de las moléculas del polímero formado probablemente no era muy grande, ya que permitió remover la molécula plantilla (LF pura) al momento del lavado; esto puede ser porque la vinilpiridina es una molécula grande que al momento de enlazarse con otras moléculas deja espacio entre las mismas, permitiendo que sea más flexible la remoción de la plantilla, dando así lugar a que se forme la cavidad que solo reconoce a la LF. Posteriormente, al enfrentar el polímero a una solución que contenía la molécula estampada, éste tuvo la capacidad de absorberla específicamente debido que a tenía libre la cavidad formada. Probablemente en los otros dos polímeros: MIP₂ y MIP₃, el grado de entrecruzamiento de las moléculas fue tan grande que atraparon a la plantilla (LF pura) y no permitieron removerla al momento del lavado, una razón de ello podría ser, que estos dos polímeros fueron hechos con vinilpiridina y

ácido metacrílico, donde éste último es una molécula muy pequeña que al unirse a otras moléculas formó una red muy compacta evitando la remoción de la plantilla; por lo tanto, cuando se enfrentaron a la solución patrón, la cavidad se encontraba ocupada y por eso no fue posible la sorción.

El presente estudio sirvió para abrir puertas a otras investigaciones que tengan el fin de mejorar la técnica establecida para así obtener mejores resultados en la recuperación de la lactoferrina u otras moléculas complejas.

PERSPECTIVAS

El grado de complejidad para lograr el objetivo general del presente estudio de investigación era muy alto: lograr desarrollar un polímero estampado molecularmente que sorbiera una molécula de gran tamaño no es nada sencillo, debido a que este campo falta mucho por investigar sobre la técnica de estampado molecular; sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio son muy buenos y satisfactorios, además de que son el comienzo de otra investigación posterior, porque demuestran que realmente la técnica funciona, y si se perfecciona se pueden llegar a obtener mejores resultados.

Para lograrlo, propongo realizar diferentes polimerizaciones variando la cantidad de entrecruzante, así como probar distintos medios de reacción (solventes); lo importante es que todos los compuestos utilizados sean solubles en el solvente, sin embargo, entre más polar sea el medio, menos específico será el polímero. Así mismo, se puede variar la cantidad de la molécula a estampar: obviamente entre más grande sea, mayor será la probabilidad de interacción con los monómeros funcionales.

Si se llega a mejorar el resultado obtenido y se logra recuperar la lactoferrina a partir del suero de leche, entonces existirán un sinnúmero de metas por cumplir, por ejemplo: se puede diseñar una leche enriquecida con lactoferrina para aquellos bebés que sus madres no pueden proporcionarles leche materna.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah F. y Chahine J. (2000). *Transferrins : Iron release from lactoferrin*. Journal of Molecular Biology 303, 255-266.
- Alais C. (1998). *Ciencia de la leche. Principios de la técnica lechera*. Continental, SA de CV. México, pp 40-50, 70-90.
- Alais C. (1985). *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. 4ª edición. Reverte, SA de CV. España, pp 122-149.
- Amiot J., Bergeron L., Blais A., Bonin G. y Boudreaw A. (1992). *Ciencia y Tecnología de la leche. Principios y Aplicaciones*. Acribia, SA. de CV. España, Zaragoza, pp 1-3, 20-25, 31-32.
- Armendáriz M. (2001). *Molecularly imprinted polymers; new molecular recognition, materials for selective solid-phase extraction of organic compounds*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 370, 795-802.
- Badui D. (1993). *Química de los Alimentos*. 3ª edición. Alhambra. México, pp 321-340.
- Blackberg L. y Hernell O. (1980). *Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step*. FEBS Letters 109, 180-184.
- Buchhoz H. y Scheper T. (2000). *Whey Proteins of milk; components functional in foods*. International Dairy Journal 9, 226-231.
- Chen W., Sung C. y Lin F. (2001). *Molecular recognition in imprinted polymers; thermodynamic investigation of an analyte binding using microcalorimetry*. Journal of Chromatography A 923, 1-6.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. y Smith F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugar relates substances*. Analytical Chemistry 28 (3), 350-356.
- Ebbing D.(1997). *Química General*. 5ª edición. McGraw-Hill. México, DF., pp 979.
- Farnaud S. y Evans R. (2003). *Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties*. Molecular Immunology 40, 395-405.
- Fox P. y McSweeney P. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic and Professional. Reino Unido, pp 1,21-40, 56-62.

- ☞ García-Garibay M., Quintero R. y López M. (1993). *Biotecnología Alimentaria*. Limusa. México, DF., pp 153-156, 196-198.
- ☞ Goldenberg D. (1990). *Analysis of protein conformation by gel electrophoresis en Protein Structure: a Practical Approach*. Creighton. T. E. Oxford University Press. Inglaterra, pp 225-250.
- ☞ Hsiang S. y Hsiung Y. (1999). *Various forms of mouse lactoferrins, purification and characterization*. Journal of Chromatography B 726, 45-52.
- ☞ Lowry O., Rosebrough N., Farr A. y Randall R. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
- ☞ Miller G. (1959). *Use the Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry 31, 426-428.
- ☞ Moore S., Anderson B., Groom C., Haridas M. y Baker E. (1997). *Three-dimensional Structure of diferric bovine Lactoferrin at 2.8 Å Resolution*. Journal of Molecular Biology 274, 222-236.
- ☞ Nicholls I., Adbo K., Andersson H., Ankarloo J. (2001). *Can we rationally design molecularly imprinted polymers?*. Analytica Chimica Acta 435, 9-18.
- ☞ Ohashi A., Murata E., Yamamoto K., Majita E. y Sano E. (2003). *New functions of lactoferrin and β -casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors*. Biochemical and Biophysical Research Communications 306, 98-103.
- ☞ Pedersen L. y Mollerup J. (2003). *Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins*. Journal of Chromatography B 790, 161-173.
- ☞ Piletsky S., Alcock S. y Turner A. (2001). *Molecular imprinting: at the edge of the third millennium*. TRENDS in Biotechnology 19 (1), 9-12.
- ☞ Rachkov A. y Minoura N. (2001). *Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach*. Biochimica et Biophysica Acta 1544, 255-266.
- ☞ Riechel P., Weiss T., Weiss M. y Ulber R. (1998). *Determination of the minor whey protein bovine Lactoferrin in cheese whey concentrates with capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A 817, 187-193.

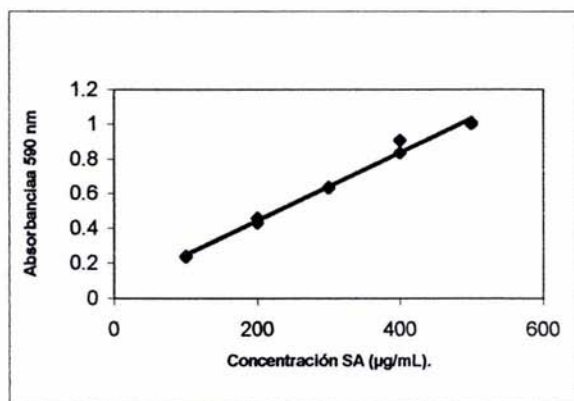
- ☞ Sawyer L., Kontopidis G. y Wu S. (1999). *β -lactoglobulin a three dimensional perspective*. International Journal of Food Science and Technology 39, 409-418.
- ☞ Scopes R. (1986). *Protein Purification. Principles and practice*. E.U.A., pp 240-243, 245-253.
- ☞ Sharma A., Paramasivam M., Srinivasan a., Yadav M. y Singh T. (1998). *Three-dimensional Structure of Mare Diferric Lactoferrin at 2.6 Å Resolution*. Journal of Molecular Biology 289, 303-317.
- ☞ Sharma S., Kumar P., Betzel C. y Tej P. (2001). *Structure and function of proteins involved in milk allergies*. Journal of Chromatography B 756, 183-187.
- ☞ Spreer. (1992). *Lactología Industrial*. 6ª edición. Acribia, SA. de CV. España, Zaragoza, pp. 527-530.
- ☞ Takeuchi T. y Haginaka J. (1999). *Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers*. Journal of Chromatography B 728, 1-20.
- ☞ Timasheff S., Townsend R. y Weinberger L. (1960). *Molecular interactions in β -lactoglobulin IV. The Dissociation of β -lactoglobulin below pH 3.5*. Journal of the American Chemical Society 82, 3175-3179.
- ☞ Tomé D. y Debabbi H. (1998). *Physiological Effects of Milk Protein Components*. International Dairy Journal 8, 383-392.
- ☞ Tsuda H., Sekine K., Kuhara T. y Takasuka N. (2000). *Milk and dairy products in cancer prevention; focus on bovine Lactoferrin*. Mutation Research 462, 227-233.
- ☞ Ulbricht M., Belter M., Langenhangen U. y Weigel W. (2002). *Novel molecularly imprinted polymer MIP, composite membranes via controlled surface and pore functionalizations*. Desalination 142, 293-295.
- ☞ Varnam A. y Sutherland J. (1994). *Milk and milk products. Technology, chemistry and microbiology*. Chapman and Hall. Gran Bretaña, pp 10-15.
- ☞ Walstra P. y Jenness R. (1987). *Química y Física Lactológica*. Acribia, SA de CV. España, pp 24-30, 90-102.
- ☞ Walstra P., Geurts T., Noomen A., Jellema A. y Boekel M. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Acribia, SA de C.V. España, pp 39-43, 108-114.

APÉNDICE**9.1 Curvas Patrón**

1) Curva Patrón de proteína (Lowry).

$$P (\mu\text{g/mL}) = (\text{Abs}_{590} - 0.0497) / 0.001965$$

$$R = 0.9976$$



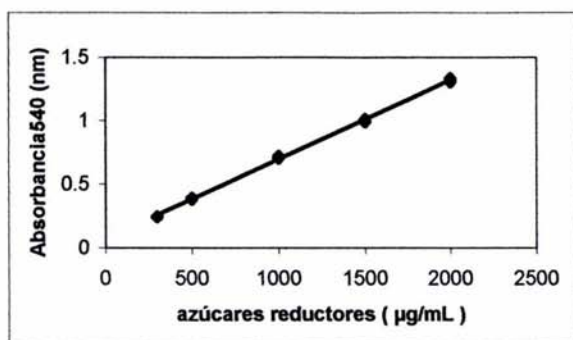
SA (μg/mL)	Abs ₁ 590 nm	Abs ₂ 590 nm
100	0.2378	0.2379
200	0.4603	0.4296
300	0.6357	0.6339
400	0.8348	0.9087
500	1.0042	1.0010

SA= Albúmina sérica bovina

2) Curva Patrón de Azúcares Reductores (DNS).

$$P (\mu\text{g/mL}) = (\text{Abs}_{540} - 0.069019) / 0.00062634$$

$$R = 0.9997$$

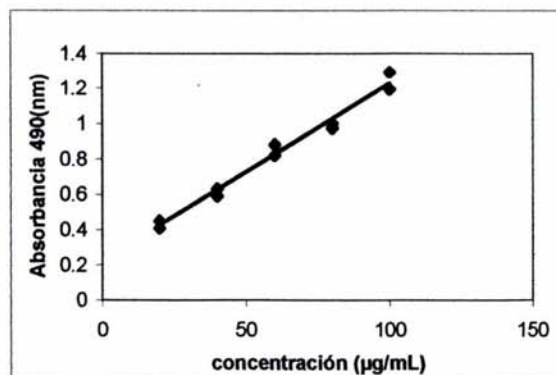


glucosa (μg/mL)	Abs ₁ 540 nm	Abs ₂ 540 nm
300	0.2444	0.2446
500	0.3921	0.3821
1000	0.7205	0.7061
1500	0.9897	1.0106
2000	1.3347	1.3046

3) Curva Patrón de Azúcares Totales (Fenol-Sulfúrico).

$$P (\mu\text{g/mL}) = (\text{Abs}_{490} - 0.22415) / 0.0100165$$

$$R = 0.9956$$

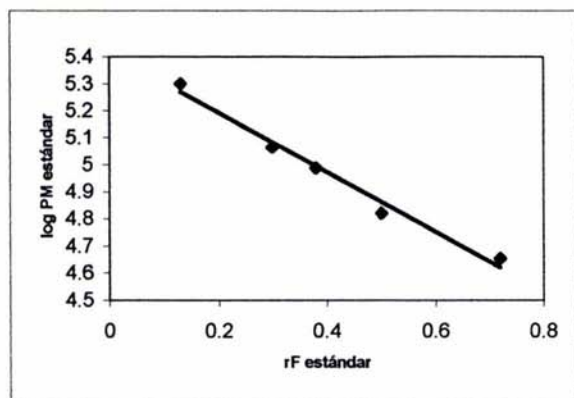


glucosa (μg/mL)	Abs ₁ 490 nm	Abs ₂ 490 nm
20	0.4511	0.4089
40	0.5916	0.6334
60	0.8201	0.8816
80	0.9749	1.0029
100	1.193	1.2939

4) Curva patrón de peso molecular 1 (alto rango, T= 10%).

$$PM \text{ (kDa)} = 10^{(5.4132 - 1.1019 \text{ rf})}$$

$$R = 0.9914$$

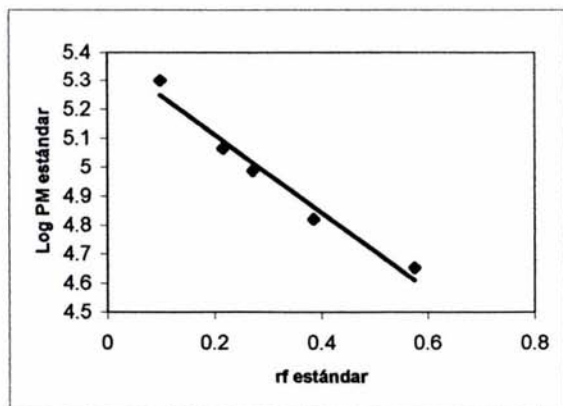


Proteína	PM kDa	rf
Miosina	200	0.13
β-Galactosidasa	116.25	0.3
Fosforilasa b	97.4	0.38
Seroalbúmina	66.2	0.5
Ovoalbúmina	45	0.72

5) Curva patrón de peso molecular 2 (alto rango, T= 10%).

$$PM \text{ (kDa)} = 10^{(5.38 - 1.3371 \text{ rf})}$$

$$R = 0.9836$$



Proteína	PM kDa	rf
Miosina	200	0.099
β-Galactosidasa	116.25	0.216
Fosforilasa b	97.4	0.273
Seroalbúmina	66.2	0.386
Ovoalbúmina	45	0.575

9.2 Espectro de Absorción del complejo [Fe SCN]²⁺

nm	Abs
700	0.091
690	0.107
680	0.124
670	0.147
660	0.176
650	0.206
640	0.243
630	0.283
620	0.316
610	0.376
600	0.448
590	0.522
580	0.602
570	0.687
560	0.763
550	0.855
540	0.939
530	0.996
520	1.047
510	1.072
500	1.067
490	1.045
480	0.999
470	0.922
460	0.829
450	0.722
440	0.615
430	0.522
420	0.467
410	0.479
400	0.663

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**