



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETENCCION, CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE LA LECHE ASI COMO POSIBLES ADULTERANTES POR ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL SDS-PAGE, ELECTROFORESIS CAPILAR Y ELECTROFORESIS EN MICROCHIP PARA EL MONITOREO DE SU CALIDAD

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

MIGUEL ANGEL BATA-COURT MIER Y TERAN



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



MEXICO, D. F.

2005

0350612



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miguel Angel Betancourt

México, D.F.

FECHA: 30 - Noviembre - 2005

FIRMA: [Signature]

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO:

Presidente: MARIA ELENA CAÑIZO SUÁREZ

Vocal: FRANCISCA ITURBE CHINAS

Secretario: AMELIA MA. DE GPE. FARRÉS GONZALES SARAVIA

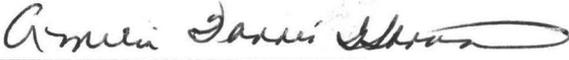
1er sup. MIGUEL ANGEL HIDALGO TORRES

2do. sup. RAFAEL CARLOS MARFIL RIVERA

Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del conjunto E de la Facultad de Química U. N. A. M (Ciudad Universitaria)

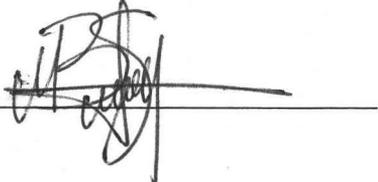
Asesor del tema:

Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Saravia



Sustentante:

Miguel Ángel Betancourt Mier y Terán



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Esta obra es el resultado de la suma del esfuerzo individual y colectivo de muchas personas, en ella se involucraron de forma directa e indirectamente. La lista sería muy grande por lo que realmente no sería correcto olvidar a alguno. Es por ello que realmente no voy a agradecer a nadie en particular.

Sin embargo me gustaría destacar la oportunidad que me fue dada de participar de los estudios universitarios así como de la formación académica e individual que recibí a lo largo de estos cinco años por los profesores de nuestra máxima casa de estudios que me otorgaron su enseñanza.

Con esta obra termina un ciclo más de mi vida y muy pronto comenzará otro en donde seguramente tendré la necesidad de compartir mis experiencias y conocimientos con gente no sólo de piel azul y oro sino de todas las razas, idiomas y culturas posibles.

A mis familiares Betancourt y Mier y Terán les agradezco el apoyo brindado desde mi hogar y su participación como un soporte eficaz y real. Gracias a ellos no sólo he recibido muchas oportunidades sino que me ayudaron a formarme como individuo responsable de mis actos.

“Mejor es adquirir sabiduría que oro preciado;

Y adquirir inteligencia vale más que la plata” Proverbios 16:16

“El temor de Jehová es el principio de la sabiduría.

Y el conocimiento del Santísimo es la inteligencia” Proverbios 9:10

INDICE GENERAL

Introducción.....	11
Objetivos.....	15
➤ General.....	15
➤ Particulares.....	15
Antecedentes.....	17
Proteínas de la leche.....	17
➤ Caseínas.....	18
➤ Caseína α s.....	21
➤ Caseína β	24
➤ Caseína γ	26
➤ Caseína κ	27
➤ Fosforilación de la Caseína.....	29
➤ Micelas de Caseína.....	31
➤ Propiedades de las Caseínas.....	35
➤ Proteínas del suero.....	37
➤ Fracciones nitrogenadas no proteicas.....	38
Producción de leche.....	38
Leche en polvo.....	38
Principales características fisicoquímicas de la leche en polvo.....	39
➤ Solubilidad.....	39
➤ Viscosidad.....	40
➤ Color.....	40
➤ Acidez.....	41
Usos de la leche en polvo en la industria.....	41
Calidad de la leche.....	41

Electroforesis capilar.....	44
➤ Instrumentación.....	44
➤ Detección.....	46
➤ Modos de separación.....	48
➤ Eficiencia y resolución.....	52
➤ Aplicaciones de la electroforesis capilar.....	54
Electroforesis capilar en microchip.....	58
➤ Materiales y tecnologías de fabricación.....	59
➤ Procedimientos de fabricación para materiales de vidrio.....	59
➤ Procedimientos de fabricación para materiales de polímeros.....	60
➤ Formato del microchip.....	60
➤ Largo del canal de separación.....	60
➤ Geometría de canales.....	60
➤ Manipulación y derivatización de la muestra.....	61
➤ Inyección de la muestra.....	61
➤ Derivatización de la muestra en línea.....	61
➤ Detección óptica.....	62
➤ Espectrometría de masas.....	62
➤ Detección electroquímica.....	62
➤ Otros métodos de detección.....	63
➤ Aplicaciones.....	63
➤ Determinación electroforética del tamaño y análisis de la concentración de proteínas utilizando el Labchip90.....	63

➤ Fundamentos del ensayo proteico.....	64
➤ Función del chip microfluídico.....	65
➤ Perspectivas a futuro.....	68
Metodología.....	70
➤ Determinación de caseína en leche (NOM 155-SCFI-2002).....	71
➤ Electroforesis SDS-PAGE.....	73
➤ Electroforesis capilar (NOM 155-SCFI-2002).....	76
➤ Electroforesis capilar en microchip.....	80
Resultados y discusión.....	83
➤ Determinación del contenido proteico.....	83
➤ Resultados y Discusión del Análisis de muestras por electroforesis unidimensional en gel SDS-PAGE.....	84
➤ Implementación de la técnica de determinación de las fracciones proteicas por EC.....	105
➤ Análisis de muestras por electroforesis en microchip.....	112
➤ Análisis de aislados proteicos por SDS-PAGE y LC-90.....	145
Conclusiones.....	153
Bibliografía.....	160
Apéndice.....	165

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1. Distribución y propiedades de las caseínas.....	18
Figura 1. Modelo tridimensional para las α s-caseína.....	19
Figura 2. Modelo tridimensional para la κ caseína.	20
Figura 3. Secuencia primaria de la caseína bovina α s1- B.....	23
Figura 4. Secuencia primaria de la caseína bovina α s2, variante A.....	24
Figura 5. Secuencia primaria de la β -caseína A de bovino.....	25
Figura 6. La relación de las γ -caseínas y las proteosa peptonas 8 y 5 para la β caseína.....	27
Figura 7. Secuencia primaria de la κ -caseína B de bovino.....	29
Figura 8. Modelo de las micelas de caseína propuesto por Waugh.....	33
Figura 9. Modelo para las micelas de caseína propuesto por Morr.....	34
Figura 10. Modelo conceptual de una micela de caseína conteniendo 40 subunidades.....	35
Figura 11. Diagrama de un sistema de electroforesis capilar.....	45
Figura 12. Técnicas para incrementar el ancho de celda del paso de la luz en el capilar.....	47
Figura 13. Diagrama de la separación de analitos neutros y cargados.....	50
Figura 14. Descripción del interior del capilar de gel de sílice fundida en solución buffer.....	52
Figura 15. Perfiles de los flujos laminar y electroosmótico.....	53
Tabla 3. Principales métodos electroforéticos capilares para el análisis de leche.....	55
Figura 16. Un diagrama detallado del Chip proteico del LabChip 90.....	66
Figura 17. Una vista detallada del desteñido y región de detección del Chip del LC 90.....	67

Tabla 2 Resultados del análisis proteico.....	83
Electroferograma 1. PM.....	87
Electroferograma 2. % parcial.....	88
Variación para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en la prot. de soya..	90
Variación para la Concentración Rel. de las fracciones proteica en la prot. de soya.....	91
Variación para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en la prot. de suero.	92
Variación para la Concentración Rel. de las fracciones proteica en la prot. de suero.....	93
Electroferograma 3. PM en las mezclas de caseínas marca Hammerstein y Sigma.....	94
Electroferograma 4. % parcial en las mezclas de caseína marca Hammerstein y Sigma.....	95
Variación para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en la mezc. Ham....	99
Variación para la Concentración Rel. de las fracciones proteica en la mezc. Ham.....	100
Variación para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en la mezc. Sig....	103
Variación para la Concentración Rel. de las fracciones proteica en la mezc. Sig.....	105
Figura 18 Caseína Sigma.....	106
Figura 19 Caseína Hammarsten.....	107
Figura 20. Proteína de suero lácteo bovino.....	109
Figura 21. Muestra de leche pasteurizada.....	110
Figura 22. Caseína sigma y muestra de leche pasteurizada.....	111
Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la prot. soya...	119
Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la prot. suero...	122
Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la leche en pol.	125
Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la mezc. Ham..	128
Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la mezc. Sig....	131

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la muestra Caseinato de Sodio.....	134
Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la cas. Ac.....	137
Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la leche fluida.	140
Variación establecida para el tamaño de la fracción proteica analizada.....	144
Variación establecida para la Concentración de la fracción proteica analizada.....	144
Figura 23 El gel del LabChip 90 del análisis de la muestra 1 (soya) vs gel SDS-PAGE.....	146
Figura 24 El gel del LabChip 90 del análisis de la muestra 2 (suero) vs gel SDS-PAGE.....	147
Figura 25 El gel del LabChip 90 del análisis de la muestra 4 (Cas. H) vs gel SDS-PAGE.....	148
Figura 26 El gel del LabChip 90 del análisis de la muestra 5 (Cas. S) vs gel SDS-PAGE.....	149

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La producción de leche a nivel mundial se concentra en países desarrollados como son Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Japón, Canadá, Noruega y Suiza que generan el 65% a nivel mundial. Sus excedentes son exportados a los países cuya producción local es limitada y los niveles de producción tienen una variación ligera de entre el 1 y el 2%.

La producción nacional de leche (fresca y deshidratada) resulta insuficiente ante la demanda que diariamente se consume en el país y se presentan serias carencias en el sector lechero. Además resulta muy heterogénea en cuanto a materia prima e infraestructura para el procesamiento de la leche fluida y diversos productos lácteos.

El monitoreo de la calidad en diversos productos alimenticios es un tema sujeto a una seria y verdadera discusión. Existe una gran diversidad en cuanto a normatividad y legislación en torno a leche y productos lácteos en distintos países. En el caso de México, la calidad se rige por la NOM-155-SCFI-2002. No obstante, algunos aspectos de la misma no han sido implementados por las autoridades, lo que ha llevado a una relajación por parte de los productores y a la industria láctea en general para en torno al cumplimiento con los estándares de calidad; peor aún, son todavía frecuentes prácticas tramposas que van desde la adición de agua para aumentar el volumen de producto y las ventas, hasta la de agregar complementos proteínicos (de origen animal o vegetal), lo que lleva a una serie de relaciones comerciales injustas y muy subjetivas en cuanto al verdadero contenido de lo que se comercializa como leche de vaca. Incluso han emergido algunos productos, como la leche orgánica, en los que la falta de claridad en la normatividad, así como de mecanismos de supervisión de ejecución de la norma, realmente no garantizan la autenticidad del producto para ser comercializado como tal.

En lo que se refiere a las proteínas, los estándares requieren que su contenido sean exclusivamente proteínas de leche, pero los precios bajos de algunas proteínas de origen vegetal (como la soya), pueden volverse atractivos para cometer fraude.

La proteína de soya es probablemente la más común en la adición a diversos productos de origen lácteo, aunque no se descarta el uso de otras fracciones proteicas de la propia leche, como las proteínas de suero y caseínas.

Se han desarrollado diversas metodologías para la detección de proteínas de origen vegetal en alimentos de origen animal, principalmente métodos inmunológicos (ELISA) que podrían adaptarse a la industria de los productos lácteos, sin embargo la selección de los antígenos adecuados parece ser el mayor problema. La detección de proteínas lácteas en leche también presenta dificultades.

En la actualidad, la electroforesis se ha convertido en una técnica analítica con muchas aplicaciones en el estudio de proteínas y péptidos en alimentos.

La electroforesis capilar (EC) y ahora la electroforesis en microchip, han resultado del desarrollo de análisis rápidos y automáticos, con una gran resolución, requiriendo de muy pequeñas cantidades de muestra y volúmenes de soluciones amortiguadoras (para CE volúmenes de muestra del orden de nanolitros y para la electroforesis en microchip son picolitros), además de proveer una exacta cuantificación de la información resultante. En la actualidad usando un capilar con una cubierta hidrofílica y una solución amortiguadora de pH 2.5 se aplica la CE al análisis de proteína de soya y se sugiere que las adulteraciones con proteína de soya de los productos de uso común pueden ser potencialmente detectadas. Si se cuenta con un mayor presupuesto se pueden obtener análisis de muestras en menos de un minuto con la nueva tecnología microfluidica que proporcionan los microchips.

Las autoridades deben implementar metodologías eficaces para el control y monitoreo de la calidad.

En este trabajo se aplicó la metodología descrita en la Norma Oficial Mexicana-NOM-155-SCFI-2002 para obtener perfiles electroforéticos de proteínas lácteas y leche pasteurizada.

Algunas de las pruebas mencionadas en esta norma con carácter obligatorio para el monitoreo y control de la calidad de la leche son: para la determinación del porcentaje de proteína el método Kjeldahl (que aunque determina el contenido porcentual de proteína que contiene la leche no tiene la selectividad para discriminar de entre las fracciones proteicas que aportan ese porcentaje); para la determinación de grasa butírica se menciona el método de Gerber, que aunque efectivo es un método de antaño, muy poco utilizado ya por la industria láctea nacional. Estos métodos han sido sustituidos por métodos con mayor eficacia y mucho más rápidos, como son los que basan su análisis (previa carga de curvas de calibración) en un escaneo a la muestra y arrojan todo un análisis proximal en segundos; equipos con tecnología NIR (un muy buen ejemplo es FOSS Analytical).

Para la caracterización de las fracciones proteicas normalmente se recurriría a la electroforesis unidimensional de poliacrilamida (SDS-PAGE); que aunque es una metodología eficiente y de bajo costo representa un verdadero problema en cuanto a tiempos y en la producción de material verdaderamente tóxico.

La NOM-155-SCFI-2002 menciona a la electroforesis capilar como la metodología oficial para realizar este monitoreo; pero además de ser poco clara e inespecífica (sin mencionar la del análisis de carbohidratos por HPLC) no ha entrado en vigor ni ha sido normalizada por no contar con por lo menos tres laboratorios con la metodología implementada, y es el laboratorio de la PROFECO el encargado de supervisar que esta se lleve a cabo.

Una alternativa reciente se ha presentado en el mercado y viene a revolucionar el análisis de proteínas en cuanto a costos y tiempos de análisis: La electroforesis en microchip junto con la automatización, en donde se ve a su máximo exponente Caliper Lifesciences son una alternativa real y eficaz. Aunque la inversión inicial es realmente fuerte, el costo promedio de análisis es de aproximadamente \$10 USD. En este trabajo se presentan las ventajas y desventajas que tienen las tres metodologías electroforéticas (SDS-PAGE, Electroforesis Capilar de alta resolución y LabChip 90) como una opción para la resolución a esta problemática real.

OBJETIVOS

GENERAL

Presentar y proponer la estandarización de la instrumentación y metodología para determinar, caracterizar y cuantificar las proteínas presentes en muestras de leche y diversos aislados proteicos, por las tres diferentes técnicas analíticas de Electroforesis (SDS-PAGE, capilar y en microchip), disponibles en el mercado cómo un método de monitoreo de la calidad de estos productos.

PARTICULARES

Revisar la normatividad existente con respecto de la industria láctea.

Obtener y estandarizar diversas muestras de proteína de leche y posibles adulterantes.

Realizar el análisis de las muestras con las tres diferentes técnicas analíticas disponibles y presentar sus fortalezas e inconvenientes.

Comparar el comportamiento de leche fluida comercial, leche en polvo comercial, aislado de suero, preparación alimenticia adicionada con caseinato de sodio, mezclas de caseínas y un aislado de proteína de soya.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

La leche se define como el producto que se obtiene de la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos. En términos normativos se conoce como tal a la leche de vaca, sin calostro y sin sustracción alguna de sus componentes naturales. Esta constituida por proteínas (caseína y proteínas del suero), carbohidratos (lactosa), lípidos y sales minerales (Alais, 1990).

Proteínas de la leche

La contribución de las proteínas de leche bovina a la nutrición humana puede ser apreciada cuando se observa que en una base *per capita*, alrededor del 25 % del consumo proteico diario de los norteamericanos proviene de productos lácteos. En la leche las proteínas se encuentran en forma de micelas dispersas en suspensión coloidal. La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 g / l) y depende de la raza de la vaca y la alimentación. Las proteínas de leche también son responsables de la estabilidad del 3.5 % de la grasa que se encuentra en la leche. Algunas interacciones muy específicas de estas proteínas son también responsables de la baja viscosidad de la leche a pesar de contener una cantidad ligeramente alta de grasa. Las principales proteínas de leche pueden ser divididas en dos clases basándonos en su estructura y comportamiento fisicoquímico. Estas clases son, la caseína y las proteínas de suero que se pueden separar por precipitación de las primeras a pH 4.5-4.6 a 20C (Spreer, 1991). Serán consideradas separadamente debido a las grandes diferencias en sus comportamientos.

Caseínas

"Toda la caseína" ha sido operacionalmente definida como un grupo heterogéneo de fosfoproteínas precipitadas de leche bronca desengrasada a pH 4.6 y 20C. La caseína constituye alrededor del 83% de la proteína total de la leche y en la leche bovina de 2.5 a 3.2%. Las caseínas son fosfoproteínas (0.85% P) asociadas al Calcio que forman un coágulo cuando precipitan a partir de la leche descremada o entera. Las proteínas de suero no presentan enlaces éster fosfato (Walstra y Jenness, 1987). Casi toda la caseína de la leche se encuentra en las micelas, estructuras supramoleculares que adoptan una forma globular en el espacio y se estabilizan por la k-caseína y la interacción con iones calcio.

Los diversos tipos de caseínas se distinguen por sus pesos moleculares, su capacidad de ligar fósforo y calcio, punto isoeléctrico, entre otras propiedades.

Las caseínas pueden ser clasificadas en cuatro fracciones principales con las propiedades indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución y propiedades de las caseínas.

Componente	%	P por mol	SH por mol	S-S por mol	Peso Mol	pKa
Caseína	75-85					
α_{s1} Caseína	45-55	8	0	0	23,500	4.6
β - caseína	25-35	5	0	0	24,000	5.0
κ Caseína	8-15	1	0	1	19,000	3.7-4.2
γ Caseína	3-7	1	0	0	20,000	5.8

Las caseínas se comportan diferente a la mayoría de las proteínas. Tienen estructuras extremadamente flexibles y por algún tiempo se han descrito como esencialmente aleatorias. No existe información sobre los cristales de caseína porque las moléculas no forman cristales. Esto se ha citado como evidencia de que no tienen estructuras tridimensionales bien definidas. La mejor evidencia de estructura secundaria y terciaria se obtiene de estudios de difracción de rayos-x de moléculas cristalinas. Es posible realizar estimaciones de la estructura secundaria de las moléculas en solución.

Recientemente, trabajadores del Centro de Investigación regional Este de la USDA en Filadelfia han estudiado a las caseínas usando espectroscopia Raman, y han sido capaces de estimar la cantidad de estructura secundaria en varias caseínas.

La estructura resuelta para las α s-caseína se presenta en la figura 1.

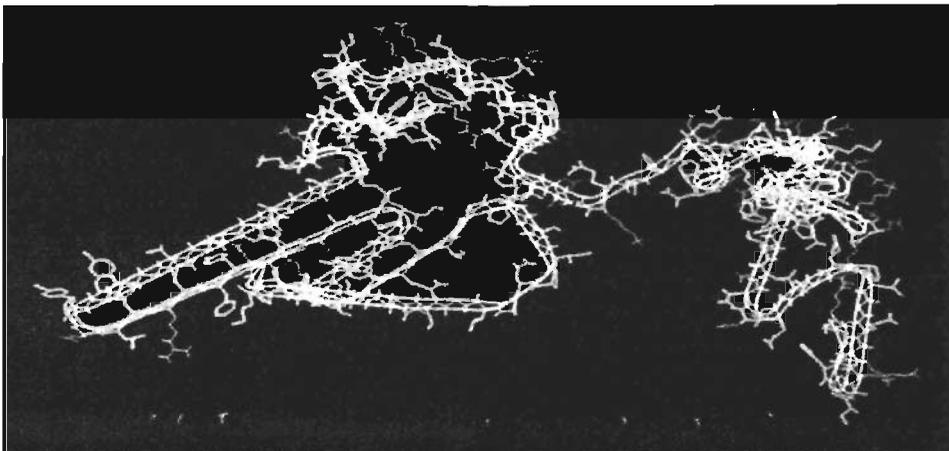


Figura 1. Modelo tridimensional para las α s-caseína.

Estos investigadores describen a la estructura como un segmento hidrofílico corto a la derecha de la molécula conectado a una región de hojas β hidrofóbica. Esto está conectado a la región que contiene los grupos fosfato que a su vez está conectado a un pequeño segmento alfa-hélice. Unidos a un dominio carboxi-terminal muy hidrofóbico que contiene ramales beta extendidos. Este modelo sugiere que las α s-caseínas contienen aproximadamente 15% de estructura alfa helicoidal, 22% estructura beta, 45% giros y 18% que no puede ser especificado. Esto es probablemente una aproximación razonable de la conformación de la molécula en solución y está razonablemente de acuerdo con aproximaciones realizadas por otros métodos.

El hecho de que es imposible obtener cristales de la molécula sugiere que esta estructura secundaria no es tan permanente como en una proteína más típica y que son posibles considerables variaciones.

La estructura propuesta para la κ -caseína se presenta en la figura 2.

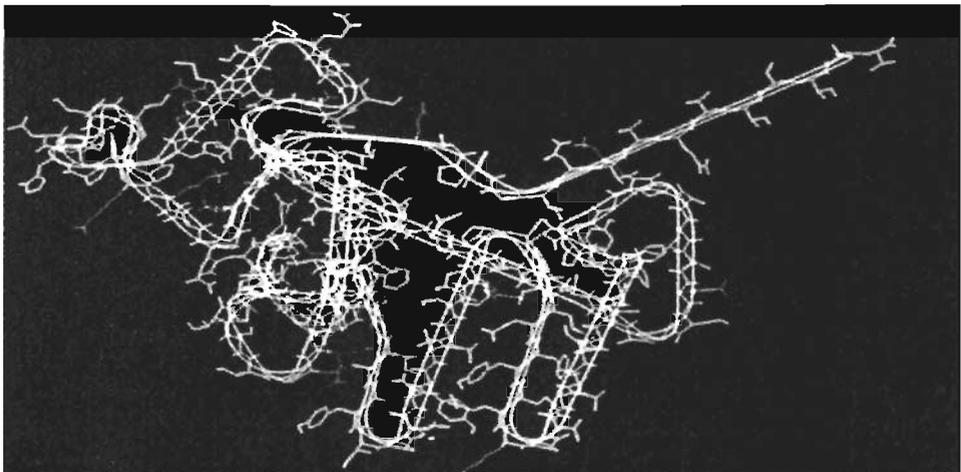


Figura 2. Modelo tridimensional para la kappa caseína.

Los autores han descrito esto como el modelo “jinete y su caballo”. La sección amino terminal de la molécula forma el “caballo” y la sección C-terminal al “jinete”. Las dos patas del caballo están formadas por las estructuras β . Este modelo sugiere que la κ -caseína contiene aproximadamente 16% de estructura alfa hélice, 27% de estructura beta, 37% giros y 20% que no puede ser especificada. Las secciones de las patas son muy hidrofóbicas y los autores han postulado que esta podría ser el área de interacción con otras caseínas.

Caseína Alfa “s”

En 1956, la fracción de caseína conocida hasta ese tiempo como α -caseína estaba constituida por dos proteínas, α y κ caseína. Fue definida como toda la α -s caseína precipitada en CaCl_2 0.4M a pH 7 y 0.4C. El aislado de α s - caseína es muy sensible al Calcio $^{++}$ y comenzará a precipitar a una concentración de 0.007M. La precipitación esta virtualmente completa a una concentración de 0.02M.

La secuencia de aminoácidos de la α s-caseína ha sido determinada y se presenta en la figura 1. De esta información se puede observar que la molécula contiene 199 aminoácidos y 8 grupos fosfato que están esterificados a grupos Serina. La molécula tiene una carga neta de alrededor de -24 a pH 6.7 y no contiene residuos de Cisteína.

El peso molecular de la α s-caseína B es 23, 644 y la molécula tiene una hidrofobicidad promedio de 1170. Un segmento de la molécula (aminoácidos 45-89) está altamente cargada. Este segmento contiene 7 de los 8 grupos fosfatos, 12 grupos carboxilos y 2 grupos epsilon amino y tiene una carga neta cercana a -23 a pH 6.7. Esto significa que el resto de la molécula sólo puede tener una carga neta negativa de -1 al pH de la leche.

La caseína Alfa s1 tiene tres regiones muy hidrofóbicas que incluyen los residuos 1-44, 90-113 y 132-199. La molécula contiene 17 residuos de prolina los cuales son casi aleatoriamente distribuidos dentro de la porción hidrofóbica de la molécula. La distribución de esta estructura de residuos rotos evita efectivamente la presencia de la estructura secundaria en la molécula.

La molécula natural precipitara cuando ocho iones Ca^{++} sean ligados a esta. El enlace con el Calcio reduce la carga de las moléculas de -24 a -8 y esta carga residual aparentemente no es suficiente para prevenir la agregación. Evidencia reciente indica que el enlace entre el Ca^{++} y la caseína α s1 causa un cambio conformacional en la proteína lo que provoca que más grupos hidrofóbicos se expongan al solvente.

Existen cuatro variantes genéticas conocidas de la caseína alfa s-1 siendo la variante B la más conocida. Las variantes C y D difieren sólo por un aminoácido de la B y probablemente vengan de mutaciones puntuales. La variante A contiene 13 aminoácidos menos que las otras variantes (aminoácidos 14-26) por lo que debió ocurrir la supresión genética.

La caseína Alfa constituye del 44 al 55% del total de la caseína y la caseína α s1 constituye aproximadamente el 80% del total de las α s caseínas. La distribución inusual de los aminoácidos con carga e hidrofóbicos deben tener un efecto en la forma de las moléculas de las caseínas α s. Las largas regiones hidrofóbicas tenderán a minimizar tanto como les sea posible su contacto con el agua. Esto probablemente conlleve a una gran estructura globular que es tan compacta como le sea posible. La ausencia de grupos cargados y la presencia de un gran número de residuos de prolina previenen efectivamente que esta porción de la molécula adquiera una estructura secundaria.

El segmento de 46 aminoácidos altamente cargados de la molécula intentarán maximizar su contacto con el agua. A pesar de esto la molécula tiene una parte final que está altamente cargada (carga negativa) y otra parte final que contiene poca carga, pero es altamente apolar.

La secuencia de la caseína α variante B se presenta a continuación:

arg	pro	lys	his	pro	ile	lys	his	gln	gly	leu	pro	gln	(glu	val	leu	Asn	glu	asn	leu
(Ausente en Variante A)										30									40
leu	arg	phe	phe	val	ala	pro	phe	pro	gln	val	phe	gly	lys	glu	lys	Val	asn	glu	leu
					P		P		50			Thr P en variante D)							60
ser	lys	asp	ile	gly	ser	glu	ser	thr	glu	asp	gln	ala	met	glu	asp	ile	lys	glu	met
			P		P	P	P		70					P					80
glu	ala	glu	ser	ile	ser	ser	ser	glu	glu	ile	val	pro	asn	ser	val	Glu	gln	lys	his
									90										100
ile	gln	lys	glu	asp	val	pro	ser	glu	arg	tyr	leu	gly	tyr	leu	glu	Gln	leu	leu	arg
									110					P					120
leu	lys	lys	tyr	lys	val	pro	gln	leu	glu	ile	val	pro	asn	ser	ala	Glu	glu	arg	leu
									130										140
his	ser	met	lys	gln	gly	ile	his	ala	gln	gln	lys	glu	pro	met	gly	Val	asn	asn	gln
									150										160
glu	leu	ala	typ	phe	tyr	pro	glu	leu	phe	arg	gln	phe	tyr	gln	leu	Asp	ala	tyr	pro
									170										180
ser	gly	ala	trp	tyr	tyr	val	pro	leu	gly	thr	gln	tyr	thr	asp	ala	Pro	ser	phe	ser
									190					gly en variante C					199
asp	ile	pro	asn	pro	ile	giy	ser	glu	asn	ser	glu	lys	thr	thre	met	Pro	leu	trp	OH

Figura 3. Secuencia primaria de la caseína bovina α s1- B. Los aminoácidos en paréntesis son los sitios que son diferentes en las variantes genéticas A, C y D.

Aislada con las caseínas α s1 están las caseínas de la familia α s2. Estas caseínas contienen 8 aminoácidos más, tiene de 10 a 13 fosfatos y también 2 cisteínas. Las caseínas α s2 tienen un peso molecular promedio de alrededor de 25,100 Da. La secuencia primaria para la caseína α s2 variante A se da a continuación.

1								P	P	P	11					P				
Lys	Asn	Thr	Met	Glu	His	Val	Ser	Ser	Ser	31	Glu	Glu	Ser	Ile	Ile	Ser	Gln	Gln	Thr	Thr
21																				
Lys	Glu	Glu	Lys	Asn	Met	Ala	Ile	Asn	Pro	51	Ser	Lys	Glu	Asn	Leu	Cys	Ser	Thr	Phe	Cys
41																P	P	P		
Lys	Glu	Val	Val	Arg	Asn	Ala	Asn	Glu	Glu	71	Glu	Tyr	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu
P	62																			
Ser	Ala	Glu	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Val	Lys	91	Ile	Thr	Val	Asp	Asp	Lys	His	Tyr	Gln	Lys
81																				
Ala	Leu	Asn	Glu	Ile	Asn	Gli	Phr	Tyr	Gln	111	Lys	Phe	Pro	Gln	Tyr	Leu	Gln	Tyr	Lue	Tyr
101																				
Gln	Gly	Pro	Ile	Val	Leu	Asn	Pro	Trp	Asp	131	Gln	Val	Lys	Arg	Asn	Ala	Val	Pro	Ile	Thr
121								P												
Pro	Thr	Leu	Asn	Agr	Glu	Gln	Lue	Ser	Thr	151	Ser	Glu	Glu	Asn	Ser	Lys	Lys	Thr	Val	Asp
141		P																		
Met	Glu	Ser	Thr	Glu	Val	Phe	Thr	Lys	Lys	171	Thr	Lys	Leu	Thr	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Arg
161																				
Leu	Asn	Phe	Leu	Lsu	Lsy	Ile	Ser	Gln	Agr	191	Thr	Gln	Lys	Phe	Ala	Leu	Pro	Gln	Tyr	Leu
181																				
Lsy	Thr	Val	Tyr	Gln	His	Gln	Lys	Ala	Met	211	Lys	Pro	Trp	Ile	Gln	Pro	Lys	Thr	Lys	Val
201						207														
Ile	Pro	Tyr	Val	Arg	Tr	Leu	OH													

Figura 4. Secuencia primaria de la caseína bovina α s2, variante A.

Caseína Beta

La Beta-Caseína constituye del 25-35% del total de la caseína. Esta formada por 209 aminoácidos y su secuencia primaria se da en la figura 3. La molécula contiene 5 fosfatos cada uno como enlace ester serina fosfato. La β -caseína no contiene residuos de cisteína pero tiene 17% de prolina la cual se distribuye aleatoriamente a través de toda la molécula. La proteína tiene un peso molecular de 23,980 Da y una carga neta de -13 a pH 6.7. El segmento N terminal de la molécula, residuos 1-42, contiene todos los grupos fosfato y toda la carga neta de la molécula. El 80% restante de la molécula no contiene carga neta y es muy hidrofóbica. Toda la molécula tiene una hidrofobicidad promedio de 1335. La molécula es aún más asimétrica que la caseína alfa s1 y por ello se pueden postular comportamientos similares. La β -caseína también precipitará con la presencia de Calcio, pero el fenómeno es altamente dependiente a la temperatura. La remoción del tripéptido terminal C altamente hidrofóbico -ILE-ILE-VAL prevendrá la asociación de la beta-caseína.

A 4 °C y en el ambiente iónico de la leche, la β -caseína es soluble, contrario a las α s-caseínas que precipitarán por la presencia del Calcio. Al aumentar la temperatura, la β -caseína se volverá menos soluble y tenderá por asociarse con otras moléculas de caseína. Datos de viscosidad intrínseca sugieren que a 4 °C, la β -caseína es altamente asimétrica y posiblemente exista como un serpentín aleatorio. La viscosidad no incrementa cuando la molécula es colocada en guanidina 6M y HCl lo que sugiere la falta de estructura secundaria. A temperaturas por encima de 13 C, existe evidencia de la presencia de pequeñas cantidades de una hélice (10%) en la estructura de la beta-caseína. Hay cinco variantes genéticas de la β -caseína, todas son resultado de un cambio de un aminoácido. La secuencia primaria de la β -caseína se presenta en la figura 3.

arg	glu	leu	glu	glu	leu	asn	val	pro	gly	glu	ile	val	glu	ser	leu	ser	ser	ser	glu	20	
En Caseína γ 1, se divide aquí										30	P lys en variante E										40
glu	ser	ile	thr	arg	ile	asn	lys	lys	ile	glu	lys	phe	gln	ser	glu	glu	gln	gln	gln	60	
										50	Variante C, lys										60
thr	glu	asp	glu	leu	gln	asp	lys	ile	his	pro	phe	ala	gln	thr	gln	ser	leu	val	tyr	80	
En variantes B, A1 & C his										70											80
pro	phe	pro	gly	pro	ile	pro	asn	ser	leu	pro	gln	asn	ile	pro	pro	leu	thr	gln	pro	90	
										90											100
pro	val	val	val	pro	pro	phe	leu	gln	pro	glu	val	met	lys	val	ser	lys	val	lys	glu	120	
En Cas. γ 3, se divide										Se divide aquí en Cas. γ 2										120	
ala	met	ala	pro	lys	his	lys	glu	met	pro	phe	pro	lys	tyr	pro	val	gln	pro	phe	thr	140	
arg en variante B										130											140
glu	ser	gln	ser	leu	thr	leu	thr	asp	val	glu	asn	leu	his	leu	pro	pro	leu	leu	leu	160	
										150											160
gln	ser	trp	met	his	gln	pro	his	gln	pro	leu	pro	pro	thr	val	met	phe	pro	pro	gln	180	
										170											180
ser	val	leu	ser	ieu	ser	gln	ser	lys	val	ieu	pro	val	pro	glu	lys	ala	val	pro	tyr	200	
										190											200
pro	gln	arg	asp	met	pro	ile	gln	ala	phe	leu	leu	tyr	gln	gln	pro	va:	leu	gly	pro	209	
										209											
val	arg	gly	pro	phe	pro	ile	ile	val	OH												

Figura 5. Secuencia primaria de la β -caseína A de bovino. Sustituciones de aminoácidos son indicadas para las variantes genéticas B, C y E. Los puntos de hidrólisis para producir las γ -caseínas son indicados.

Caseína Gamma

Alrededor del 5% de la caseína esta formada de un grupo heterogéneo de proteínas anteriormente conocidas como γ -caseínas. Ahora se ha demostrado que la gamma-caseína resulta de la proteólisis limitada de la β -caseína. La proteólisis resulta de la actividad de la enzima plasmina que aparentemente es transmitida de la sangre a la leche en pequeñas cantidades.

La figura 4 muestra la relación entre la γ -caseína y las β -caseínas. El comité en nomenclatura de la Asociación Científica Americana de los Productos Lácteos (American Dairy Science Association) ha recomendado la siguiente nomenclatura para las γ -caseínas: γ -1 caseína (segmento 29-209 de la β -caseína, \sim 20,600 daltons); γ -2 caseína (segmento 106-209 de la β -caseína \sim 11,800 daltons); γ -3 caseína (segmento 108-206 de la β -caseína \sim 11,600 daltons).

Las γ -caseínas, derivadas de la porción del C terminal de la β -caseína, tienen muy poca carga neta y son extremadamente hidrofóbicas. Estas moléculas pueden ser solubilizadas con alcohol etílico y otros solventes de baja constante dieléctrica. La porción N terminal de la beta-caseína es la fuente de las proteosa-peptonas 5, 8-rápida y 8-lenta (ver figura 4).

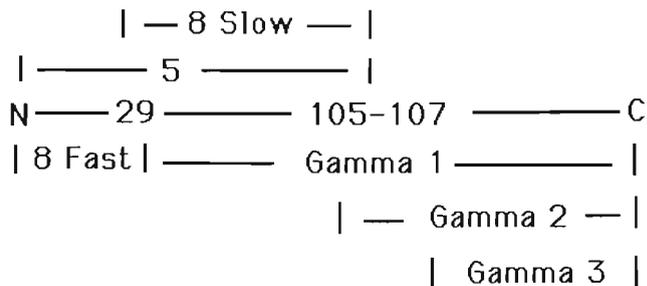


Figura 6. La relación de las γ -caseínas y las proteasa peptonas 8 y 5 para la β caseína.

Caseína Kappa

La Kappa-caseína está constituida de 169 aminoácidos y tiene un peso molecular de 19,005 Da. La proteína puede contener de 0 a 5 trisacáridos compuestos de N-acetilneuraminil (2-->6) b-galactosil (1-->3 o 6) N-acetilgalactosamina. Contiene además un grupo serina fosfato y dos residuos de cisteína. Existen dos variantes genéticas de la kappa-caseína. La secuencia primaria de la kappa-caseína se presenta en la Figura 5.

La hidrofobicidad promedio de la κ -caseína es 1205. La κ -caseína tiene secciones cargadas en ambos extremos de la molécula diferente a las α s y β -caseínas. Los 53 aminoácidos C-terminales tienen una carga neta de -11, contienen el grupo fosfato y todos los carbohidratos asociados con la κ -caseína. Estos carbohidratos incrementan todavía más la carga neta negativa de esta porción de la molécula. El resto de la molécula es muy hidrofóbica y contiene carga neta positiva a pH 6.7.

La mayoría de la carga neta de la molécula no se deriva de los grupos serina fosfato por lo que la κ -caseína es soluble en presencia de Ca^{++} . También puede interactuar con las α s y

β -caseínas y estabilizarlas en presencia de los iones Calcio. Estudios extensos con modelos del sistema han demostrado que el complejo es estable en la presencia de Ca^{++} . De hecho, el Ca^{++} debe estar presente para que se forme el complejo.

También se ha observado que existe una relación entre la cantidad de κ -caseína presente y el tamaño de las micelas de caseína. Micelas grandes tienden a tener menos κ -caseína que la que tienen las micelas pequeñas y cuando se adiciona κ -caseína a la suspensión de micelas, el diámetro promedio de las micelas decrece. Esto sugiere que la κ -caseína limita el tamaño de las micelas de caseína interactuando en la superficie de estas unidades.

Cuando la leche es expuesta a la enzima renina, las micelas de caseína son desestabilizadas y precipitadas. Se ha demostrado que la renina rompe un enlace entre PHE 105 y MET 106 en la molécula de κ -caseína. Esto resulta en la libertación de la porción soluble del C terminal de la molécula. Este (glico) macropéptido tiene un peso molecular de $\sim 6,800$ Da y contiene los grupos carbohidrato y serina fosfato de la molécula. El resto de la molécula de la κ -caseína es llamada para-kappa-caseína. Y tiene un peso molecular de 12, 271 Da y una carga neta positiva a pH 6.7. Esta molécula es extremadamente hidrofóbica y es insoluble. La estructura de la κ caseína se presenta en la figura 5.

I										11										
Glu	Glu	Gln	Asn	Gln	Glu	Gln	Pro	Ile	Arg	Cys	Glu	Lys	Asp	Glu	Arg	Phe	Phe	Ser	Asp	
21										31										
Lys	Ile	Ala	Lys	Tyr	Ile	Pro	Ile	Gln	Tyr	Val	Leu	Ser	Arg	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Gly	Leu	
41										51										
Asn	Tyr	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Val	Ala	Leu	Ile	Asn	Asn	Gln	Phe	Lue	Pro	Tyr	Pro	Tyr	
61										61										
Tyr	Ala	Lys	Pro	Ala	Ala	Val	Arg	Ser	Pro	Ala	Gln	Ile	Leu	Gln	Trp	Gln	Val	Leu	Ser	
81										81										
Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Lys	Ser	Cys	Gln	Ala	Gln	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Arg	His	Pro	His	
101				105	106					111										
Pro	His	Leu	Ser	Phe	Met	Ala	Ile	Pro	Pro	Lys	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	Thr	Glu	Ile	Pro	
121										131										
Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile en Variante A	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Glu
141										151										
Ser	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Glu	Ser	Pro	Pro	Glu	Ile	Asn	
161										169										
Thr	Val	Gln	Val	Thr	Ser	Thr	Ala	Val												

Figura 7. Secuencia primaria de la κ -caseína B de bovino. Se indican además las sustituciones para la variante genética A y el punto de ataque de la renina.

Fosforilación de la Caseína

Muchas de las propiedades importantes de la caseína se relacionan a su habilidad de existir en forma de micela. Las micelas existen, en parte, debido a la sensibilidad al Calcio de las α s y β -caseínas. Esta sensibilidad a la precipitación debido al enlace con el Calcio en gran medida se debe a la presencia de los residuos serina fosfato en estas moléculas.

El código genético no provee la incorporación de los residuos serina fosfato directamente a las proteínas, así que las serinas regulares deben ser modificadas después de la síntesis de la proteína. Esta modificación ocurre en el aparato de Golgi y es mediada por la acción de una caseína kinasa

El examen de la secuencia de las α s y β -caseínas así como la localización de los grupos serina fosfato ha llevado a sugerir que la caseína kinasa reconoce la siguiente secuencia:

1	2	3
Ser o Thr	X	Glu o Ser P

Donde 1 es la serina o en una variante genética treonina que será fosforilada. El residuo dos, designado como X puede ser cualquier aminoácido y el tercer residuo pareciera ser el sitio de reconocimiento para la enzima.

Si la enzima encuentra un ácido glutámico o un residuo serina fosfato, que se encuentra removido dos residuos del residuo de serina o treonina, la serina o treonina será fosforilada. Estas reglas son sugeridas en todos los casos para las alfa-caseínas, no tanto para la kappa-caseína y la mayoría de la beta-caseína de la leche.

A temperaturas reducidas tanto como el 30% de la β -caseína y una cantidad menor de la κ -caseína pueden encontrarse en estado libre en el suero de la leche. Las micelas permanecen intactas, sin embargo la leche contiene mucho más fosfato de calcio que el que podría estar soluble en agua a pH 6.7. Mucho de esto se debe a una forma sin disociación de las micelas de caseína. Las micelas en la leche pueden desestabilizarse por la acción de la enzima renina, la adición de ácido hasta pH 4.6 o por la adición de iones Calcio.

La renina causa el rompimiento de las moléculas de kappa-caseína y por consecuencia remueve el factor que protege a las alfa s-caseínas de la precipitación por Calcio. El Calcio ionico adicional parece sobrecargar la estabilización de la kappa-caseína sobre las alfa s-caseínas y provoca la precipitación.

La reducción del pH a 4.6 tiene dos efectos que conducen a la inestabilidad. Tan pronto como decrece el pH, hay un cambio en la constante de equilibrio para la disociación del fosfato de

calcio coloidal de las especies iónicas. Esto provoca que la actividad del ion calcio se incremente lo que conlleva a la insolubilidad. Más importante, la caseína tiene su punto isoeléctrico a pH 4.6 y estas proteínas son insolubles en este pH. Desde el descubrimiento de la κ -caseína, se han preparado muchos modelos para describir la estructura de las micelas de caseína.

Micelas de Caseína

En la leche, las caseínas existen en grandes partículas coloidales llamadas micelas. Estos son grandes agregados con diámetros de 90 a 150 nm. Evidencia de microscopía electrónica y otros medios, sugieren que las micelas están compuestas de pequeñas unidades llamadas submicelas teniendo diámetros de entre 10 a 20 nm. Se han realizado observaciones con respecto a las propiedades de las micelas de caseína. Cualquier modelo que proponga la estructura de estas micelas debe ser probado sobre que tan bien puede explicar estas observaciones. Las características de las micelas incluyen:

1. Precipitación con la enzima renina. La renina es conocida por cortar específicamente el enlace entre los residuos fenilalanina 105 y metionina 106 de la κ caseína. La κ caseína debe ser accesible a la enzima.
2. El contenido de Calcio y fósforo en la leche es mucho mayor que la solubilidad del fosfato de calcio a pH 6.7. Mucho de este fosfato presente en un estado coloidal insoluble precipitará con las micelas incluso sobre la centrifugación en altas velocidades.
3. Las leches que contienen una cantidad relativamente mayor de κ caseína tienen micelas de menor diámetro que las leches con menor cantidad de κ caseína.

4. Si las micelas de caseína son desestabilizadas y después reformadas, la distribución del tamaño de las micelas finales será muy similar a aquellas micelas iniciales. Las micelas reformadas de la leche que originalmente tenían un diámetro promedio mayor serán más grandes que aquellas reformadas de leche que tenía micelas de diámetro promedio menor. Esta propiedad ha sido llamada memoria.
5. Las micelas son altamente solvatadas y contienen aproximadamente 3.7 g de agua por gramo de proteína.
6. La adición de κ caseína extra a una mezcla de micelas de caseína resultará en el decremento en el diámetro promedio de las micelas de la mezcla.
7. La Kappa caseína estabilizará a las α s-caseínas de la precipitación por Calcio. Existe una completa estabilización en una proporción (alfa s/kappa) de 10 y algo de estabilidad en proporciones mayores.
8. La formación de micelas requiere de la presencia de Calcio a concentraciones mayores que las requeridas para precipitar a las α s-caseínas.
9. A bajas temperaturas, algo de la β caseína es capaz de dejar a la micela y volverse soluble. Conforme se aumenta la temperatura, la beta caseína regresa a la micela.

El primer modelo generalmente aceptado para la estructura de la micela de caseína fue propuesto por Waugh a mediados de 1960s. Los elementos esenciales de este modelo son una asociación hidrofóbica de las α s y β caseínas que son burdamente esféricas. Estos agregados están recubiertos por una monocapa de κ caseína. Este modelo ha sido descrito como un modelo de núcleo-recubierto debido a su núcleo hidrofóbico que es estabilizado por el

recubrimiento de la κ caseína. Una representación esquemática de este modelo se presenta en la figura 3.

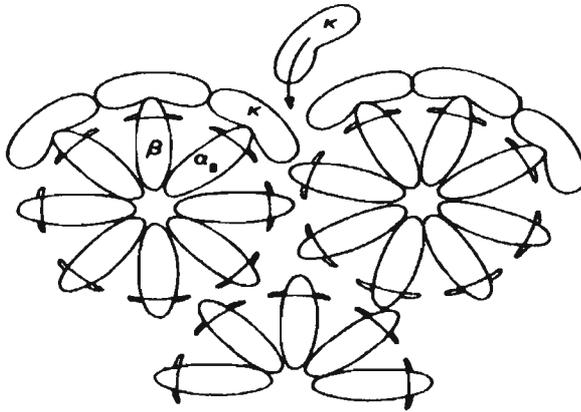


Figura 8. Modelo de las micelas de caseína propuesto por Waugh.

Este modelo es capaz de explicar un número de observaciones enlistadas previamente. La accesibilidad de la κ caseína a la renina es obvia. El tamaño final de las micelas será presumiblemente dependiente de la cantidad de κ caseína disponible para formar la cubierta. Si existiera relativamente menos cantidad de κ caseína, el diámetro promedio de las micelas tendría que incrementarse para asegurara una cobertura completa. El modelo no direcciona directamente la posición del Calcio y los fosfatos, pero la disposición coloidal sería presumiblemente asociada con los grupos fosfatos en las alfas y betas caseínas

Estos son indicados por los anillos en el final de la molécula.

Siguiendo un número de observaciones de la composición de la caseína por fraccionación ultracentrifugal, Morr propuso unos años después el modelo mostrado en la figura 4.

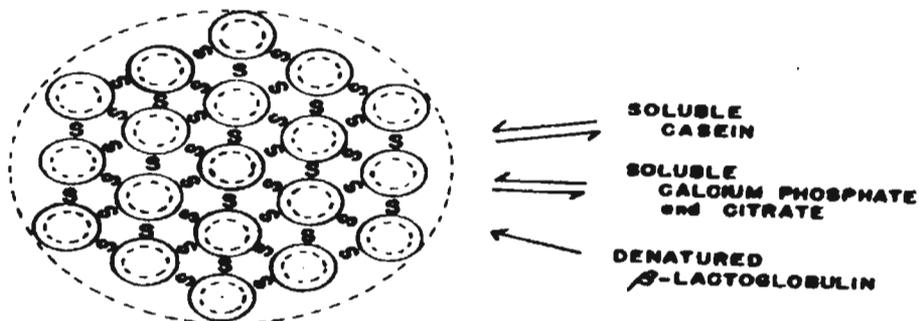


Figura 9. Modelo para las micelas de caseína propuesto por Morr.

Este modelo se observa mas como una variación del modelo propuesto por Waugh. Las caseínas hidrofóbicas α y β están localizadas en los círculos punteados y están cubiertas por una capa de β caseína. El fosfato de calcio coloidal es representado por la S en el diagrama que conecta las submicelas. Esta es una molécula con muchos poros y acomodaría una gran cantidad de agua. El diagrama sugiere que la caseína soluble podría entrar y dejar la micela, pero la naturaleza de la interacción no se especifica. El tamaño relativamente uniforme de las submicelas realmente no explica las diferencias en tamaño de las micelas con contenidos de β caseína diferentes.

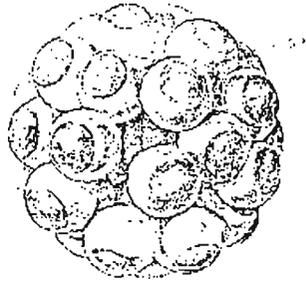


Figura 10. Modelo conceptual de una micela de caseína conteniendo alrededor de 40 subunidades. Adaptado de Slattery y Evard.

En este modelo la superficie tenue representa a los polímeros de las alfas y betas caseínas (área hidrofóbica) Los parches oscuros cubren alrededor del 20% del área superficial y representa la sociación de polímeros de k caseína (área hidrofílica). El modelo contempla canales abiertos a través de la micela. El crecimiento es impedido por la extensa superficie periférica hidrofílica periférica.

Propiedades de las Caseínas

La naturaleza abierta y flexible de las caseínas las hace inusuales. Mientras estas podrían preferir a las estructuras secundaria y terciaria, generalmente se encuentran en otras conformaciones. Estas otras estructuras deben exponer a los grupos hidrofóbicos al contacto con el agua. Las estructuras alcanzadas por las caseínas pueden acomodar este contacto. Para la mayoría de las proteínas, el desdoblamiento y exposición de sus grupos hidrofóbicos al agua resulta en estructuras inestables. Las proteínas deben redoblarse para minimizar el contacto con el agua y generalmente ocurre la precipitación, ya que las caseínas para empezar existen en estructuras abiertas, no son sensibles a alteraciones estructurales.

Por ejemplo, las caseínas son muy estables al calentamiento. Estas podrían exponerse al calor por períodos prolongados de tiempo y permanecer totalmente solubles. Esta es una propiedad extremadamente útil para productos alimenticios que serán sujetos a tratamiento térmico severo tal como el procesamiento UHT. Las caseínas también encuentran aplicaciones donde la flexibilidad es requerida por funcionalidad.

La mayoría de las proteínas que contienen cantidades significativas de fuertes estructuras secundarias y terciarias requieren tiempo para desdoblarse en interfaces aire o aceite. El tiempo requerido depende de la flexibilidad de la proteína. Las celdas de aire y gotas de lípidos más estables resultan de proteínas que son capaces de reorganizar rápidamente sus estructuras y de minimizar su energía libre interfacial. Las caseínas funcionan muy bien en estas aplicaciones y existe muy poco retraso entre el tiempo en el que las moléculas arriban a la interfase y emplean su influencia funcional.

Soluciones de alta viscosidad es un resultado de las estructuras muy abiertas, casi aleatorias de las moléculas de las caseínas. El caseinato de sodio encuentra su aplicación en productos donde se requiere alta viscosidad. La falta de solubilidad, además de la presencia de Calcio, cambia el comportamiento de la caseína. Conforme se adiciona Calcio a una solución de caseinato de sodio, son evidentes una serie de cambios. El Calcio causará la agregación de la caseína en estructuras que asemejan micelas. Tan pronto como estos agregados se incrementan en tamaño y número, la viscosidad de la solución decrecerá. La solución también se tornará turbia tan pronto las partículas se vuelvan lo suficientemente grandes para dispersar la luz. Esto, si una solución clara con alta viscosidad es requerida, el caseinato de sodio es una buena opción. El caseinato de Calcio debería ser seleccionado cuando se desea una solución de viscosidad relativamente baja y una alta turbidez (de apariencia lechosa).

La caseína también exhibe propiedades de fusión que son únicas entre las proteínas. Seguida

la proteólisis limitada, la caseína se volverá termoplástica y fluirá sobre el calentamiento. Un efecto similar puede lograrse por quelación de algunos iones de Calcio presentes. Estos fenómenos son la base de la fundición de quesos naturales y la producción del queso procesado de imitación. La estructura debe existir antes que la sustancia se ponga a fundirse. Con las caseínas esta estructura puede ser obtenida por precipitación con Calcio, ácido o la adición de renina. La caseína no forma geles térmicos y tiene muy poca funcionalidad en aplicaciones que requieren programación de temperatura. La estabilidad a altas temperaturas, y la habilidad para fundirse son las dos propiedades de los caseinatos que los hacen difíciles de reemplazarlos en muchas aplicaciones alimenticias.

Proteínas del suero

Estas proteínas son compactas, globulares y solubles en un intervalo de pH muy amplio (incluso a pH ácidos, cuando se han desnaturalizado por el calor). Constan por lo menos con ocho fracciones diferentes, entre las cuales destacan la alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina, las inmunoglobulinas, la albúmina sérica bovina y fracciones proteosa-peptona. Son sensibles a altas temperaturas y en menor grado al pH ácido (condiciones inversas a 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 desnaturalizarse y su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reducen el potencial de óxido-reducción, lo que puede llegar a inhibir parcialmente las reacciones de oxidación.

Fraciones Nitrogenadas no proteicas

Constituyen una pequeña proporción de la leche, con una gran cantidad de sustancias de peso molecular aproximado a 5KDa; son dializables y permanecen solubles a pH 4.5-4.6 (Fox y

McSweeney, 1998).

Producción de leche

A nivel mundial, en los últimos años, la Unión Europea (UE) ocupa el primer lugar de producción de leche de vaca (SAGAR, 2001), debido a su alto grado de industrialización y a los avances en el área de genética y zootecnia. El incremento global en la producción hacia el año de 1999 es de un 2% anual; Norte América ocupa el segundo lugar al registrar el mayor crecimiento (4%).

En años recientes, el incremento en la producción de leche en Asia, Latinoamérica y Oceanía ha sido favorecido por una declinación de la producción lechera de Europa Oriental y Rusia. Se espera que estas regiones presenten un crecimiento importante en producción local a mediano plazo (próximos 10 años) (FAO, 2001).

La producción de leche de vaca en México se ha incrementado desde 1989. En el año 2000, la SAGAR reportó la cifra preliminar de 9.304 millones de toneladas, lo que representó un alza significativa de 3 700 millones de toneladas en comparación a lo producido en 1989, cuando se obtuvieron 5 577 millones de toneladas. En la República Mexicana el 70% de la producción se da en los estados del norte, bajío, golfo y centro del país.

Leche en polvo

La obtención de leche en polvo se ha incrementado por ser la mejor forma de conservación, especialmente en lugares donde la producción no es uniforme todo el año. Además, ocupa menos espacio para su almacenamiento y transporte. El mayor volumen de producción le corresponde a la leche descremada en polvo, debido a las múltiples aplicaciones industriales

y en la alimentación animal. La leche en polvo entera se utiliza fundamentalmente para la alimentación infantil y leches rehidratadas de consumo. La leche en polvo se elabora de acuerdo a la clasificación que hace referencia al tratamiento térmico que ha recibido, establecida por el American Dry Milk Institute (ADMI, 1971)

Principales características fisicoquímicas de la leche en polvo

El control de la temperatura determina el grado de desnaturalización de las estructuras terciarias que definen las propiedades funcionales de las proteínas, lo que hace que la leche en polvo sea multifuncional y factible de adecuar al producto a las necesidades industriales.

Solubilidad

Es una característica fundamental de las leches en polvo, los factores más importantes que pueden modificar la solubilidad de la leche en polvo son los siguientes:

La presencia de ácido láctico en la leche (produce desestabilización de las caseínas)

El tratamiento térmico de la leche (cuando hay ácido láctico desnaturaliza reversiblemente las proteínas)

El sistema de desecación (el secado en rodillos genera un mayor grado de insolubilidad que el proceso de aspersión)

Viscosidad

La viscosidad de la leche en polvo depende de la leche cruda como materia prima. Se mide por el tiempo que tarda en pasar el flujo por un capilar. La viscosidad determina el tamaño de partículas primarias lo que, a su vez, incide en el contenido de humedad final del polvo. Los principales factores que influyen sobre la viscosidad del producto final son:

- Temperatura de pasteurización/ precalentamiento
- Desnaturalización de las proteínas del suero
- Homogeneización
- Contenido de sólidos totales del concentrado
- Variaciones estacionales en la proporción proteína/lactosa
- pH final del producto

Color

El color de la leche fluida y en especial de los productos lácteos, varía mucho debido al diferente contenido de caroteno en la grasa, lo que depende de los piensos, por lo que en la época de invierno tiene efecto marcado. Además depende de la capacidad de la vaca de convertir al caroteno en vitamina A, lo que varía mucho entre razas. Sin embargo un color muy amarillo en leche en polvo indica que ha sufrido un proceso de enranciamiento (Noble P, 1999).

Acidez

La acidez titulable de la leche se define como los mililitros de hidróxido de sodio 0.1 N necesarios para neutralizar 10 mililitros de leche y es expresada como ácido láctico. La normatividad especifica valores que van de 0.13-0.17% de ácido para leche fluida y en polvo. Valores superiores a la normatividad pueden indicar un deterioro microbiológico, que revelan alteraciones de las propiedades sensoriales y/o de la composición de la leche (Spreer, 1991).

Usos de la leche en polvo en la industria

Del total de las importaciones mexicanas de leche en polvo, el 30% es destinado para programas de abasto social, que apoyan a 4.2 millones de beneficiados por día en 1 754 municipios marginados del país.

Para lograrlo se debe rehidratar el producto y, además, producir los suplementos alimenticios para el Programa de Educación, Salud y Alimentación. El 70% restante se destina a la industria, debido a las propiedades funcionales que proporcionan las proteínas de la leche (Trujillo et al 2000).

Calidad de la leche

El concepto de calidad se define como el acatamiento de normas que permiten la idoneidad para el uso de un producto o servicio determinado. Estos requerimientos corresponden a un

grupo de especificaciones ya establecidas que se relacionan directamente con las diferentes propiedades de cada producto en particular (Manual de Calidad SS, 1999). La calidad fisicoquímica y comercial de la leche debe ser garantizada, por lo que se han establecido denominaciones, especificaciones comerciales y métodos estándares de prueba, que incluyen métodos microbiológicos y fisicoquímicos para evaluar productos lácteos y sustitutos. El AOAC (The Association of Official Analytical Chemists) establece métodos validados que incluyen pruebas de plataforma (acidez, densidad, grasa) y análisis rutinario.

Se han realizado diversas investigaciones con el objeto de monitorear la calidad de la leche y los subproductos lácteos mediante diferentes técnicas. Existen propuestos métodos tanto presuntivos como confirmativos. Los principales métodos presuntivos se basan en la comparación de resultados experimentales obtenidos con respecto a valores preestablecidos a partir de normas nacionales o internacionales.

El monitoreo de la adulteración de la leche se puede realizar separando las diferentes proteínas presentes en el suero y la grasa. El perfil de proteínas obtenido es característico del origen de la leche. Generando tal perfil, se puede determinar si existe una adulteración y cual es el origen y la proporción de esta. El método que se puede usar exitosamente para este tipo de prueba es la técnica de Electroforesis Capilar. Esta técnica permite la separación simultánea de las proteínas del suero (lactoalbúmina y lactoglobulina) y las de la grasa (caseínas). Esta técnica se aplica para cualquier tipo de adulteración proteica.

Los métodos confirmativos abarcan diversas prácticas que permiten concluir acerca de la calidad y origen de la leche y sus diversos subproductos. Entre ellos pueden citarse los siguientes trabajos:

- ★ Millares y Ramos (2001) Electroforesis capilar: Técnica para determinar la concentración de proteína de leche de vaca fluida, suero de leche y caseína láctica mediante degradación de la k-caseína.

- ★ Guzmán- González y col. (2000) Electroforesis: Caracterización de las proteínas presentes en productos lácteos como el yogurth enriquecidos con caseinatos y concentrados de leche en polvo.

- ★ García, Amigo y Molina (2000) Electroforesis: Método propuesto que permite determinar la calidad y composición de los productos de proteína de soya.

- ★ López, Tapia y col. (1999) Electroforesis. Determinan la presencia de proteína de soya en productos lácteos mediante electroforesis SDS-PAGE.

- ★ Molina etal (1998) Métodos inmunológicos: detección de proteínas de leche y de soya con anticuerpos de alfa-lactoalbumina beta-lactoglobulina en fórmulas lácteas.

- ★ Lynch etal (1997) Electroforesis: Determinación de perfiles cromatográficos de elusión y propiedades electroforéticas de los aminoácidos libres, el contenido de grupos, sulfhidrilo en los caseinatos de sodio comerciales.

- ★ Schagger y Von Jagow (1997) Electroforesis SDS: Técnica de separación de proteínas de bajo peso molecular, en el rango de 1-100 KDa y determinación de

secuenciación de aminoácidos de diferentes proteínas y orígenes, incluyendo las lácticas.

- ★ Pardo y Natalucci (2002) Electroforesis: Análisis electroforéticos de caseína bovina (tricina-SDS-PAGE).

- ★ Veloso Teixeira. Ferreira (2002) Electroforesis: separación y cuantificación de las fracciones mayores de caseína por HPLC de fase reversa y electroforesis en gel de urea-poliacrilamida. Detección de alteraciones en leche.

Electroforesis Capilar

La Electroforesis Capilar (CE) puede ser usada para separar especies iónicas por sus cargas y fuerzas de fricción. En la electroforesis tradicional, analitos cargados eléctricamente se mueven en un medio líquido conductivo bajo la influencia de un campo eléctrico. Introducida en 1960's, la técnica de electroforesis capilar (CE) fue diseñada para separar especies basadas en su relación masa / carga en el interior de un capilar pequeño lleno de un electrolito.

Instrumentación

La instrumentación necesaria para realizar una separación por electroforesis capilar es relativamente simple. Un esquema básico de un sistema de electroforesis capilar se muestra en la figura 1. Los principales componentes del sistema son un vial para muestras, viales fuente y destino, un capilar, electrodos, una fuente de poder de alto-voltaje, un detector, un registrador de datos y un mecanismo de procesamiento. El vial fuente, vial destino y el capilar se llenan con un electrolito como una solución acuosa amortiguada. Para introducir la

muestra, la entrada del capilar se coloca en un vial conteniendo la muestra y luego se regresa al vial fuente (la muestra es introducida en el capilar por la acción capilar, presión o sifoneo). Después se inicia la migración de los analitos por la acción de un campo eléctrico que es aplicado entre los viales fuente y destino y es provista a los electrodos por la fuente de poder de alto voltaje. Es importante mencionar que todos los iones, positivos o negativos, son atraídos a través del capilar en la misma dirección por el flujo electroosmótico, como se explicará. Los analitos se separan conforme migran debido a su movilidad electroforética, como será explicado, y son detectados cerca de la salida del capilar. La salida del detector se envía a un registrador de datos y un mecanismo de procesamiento como un integrador o una computadora. La información es luego desplegada como un electroferograma, el cual muestra la respuesta del detector como función del tiempo. Los compuestos químicos separados aparecen como picos con diferentes tiempos de retención en un electroferograma (Baker 1995).

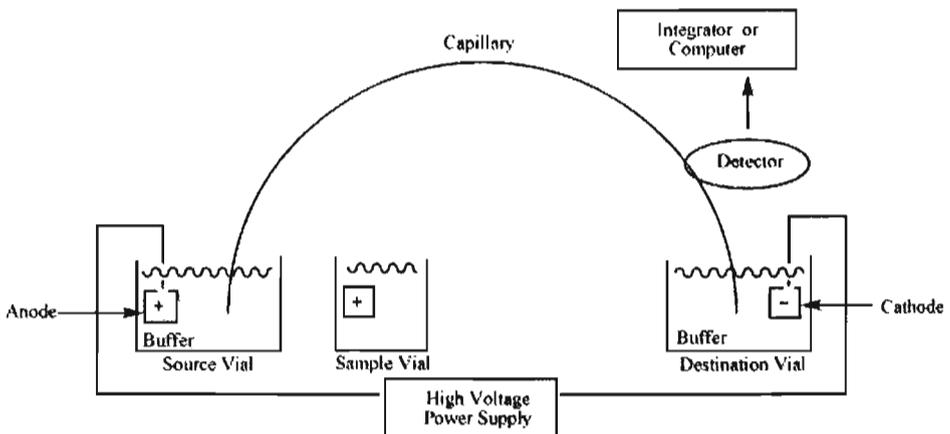


Figura 11: Diagrama de un sistema de electroforesis capilar.

Detección

La separación por electroforesis capilar puede ser detectada por varios mecanismos de detección. La mayoría de los sistemas comerciales utilizan detectores de absorbancia UV o UV-Vis como el modo primario de detección. En estos sistemas, una sección del mismo capilar se utiliza como celda de detección. El uso de una detección en el tubo permite la detección de los analitos separados sin pérdida de resolución. En general, los capilares utilizados en la electroforesis capilar son recubiertos con un polímero para incrementar su estabilidad. La porción del capilar utilizada para la detección UV, debe ser ópticamente transparente. Los capilares descubiertos pueden romperse fácilmente y, como resultado, capilares con recubrimientos transparentes están disponibles para incrementar la estabilidad de la ventana celda. El ancho de la celda de detección en la electroforesis capilar (~ 50 micrómetros) es mucho menor que una celda UV tradicional (~ 1cm). De acuerdo con la ley de Lambert-Beer, la sensibilidad del detector es proporcional al paso de la luz en la celda. Para mejorar la sensibilidad, el ancho de celda puede ser incrementado, sin embargo esto resulta en una pérdida de resolución. El tubo capilar por si mismo puede ser expandido en el punto de detección, creando una "celda burbuja" con un paso de luz mayor o se puede agregar tubo adicional en el punto de detección como se muestra en la figura 2. Sin embargo, estos dos métodos decrementarán la resolución de la separación (Cunico et al 1998).

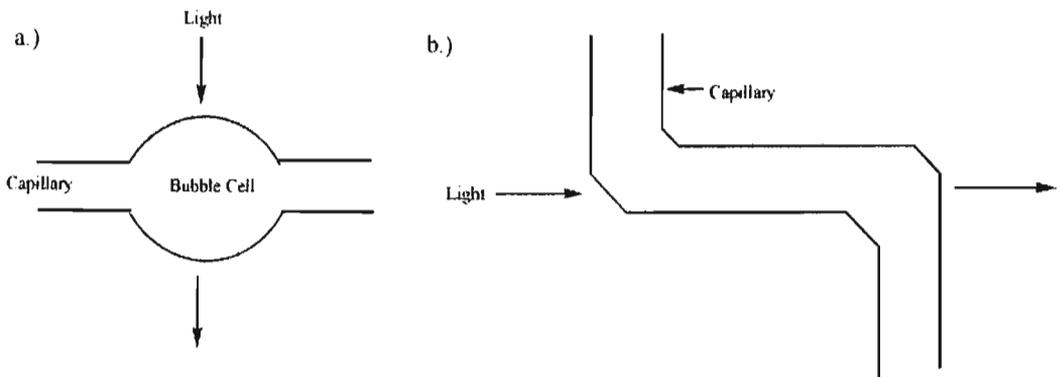


Figura 12: Técnicas para incrementar el ancho de celda del paso de la luz en el capilar:
 a.) Una celda burbuja y b.) Una celda-z (adición de tubo), (Baker 1995).

La detección por fluorescencia también puede utilizarse en la electroforesis capilar para muestras que naturalmente fluorescen o que son químicamente modificadas para contener marcadores fluorescentes. Esta forma de detección ofrece mayor sensibilidad y mejora la selectividad de estas muestras, pero no puede ser utilizada para muestras que no fluorescen. El acomodo de la detección por fluorescencia en un sistema de electroforesis capilar puede ser complicado. El método requiere que el haz de luz sea concentrado en el capilar, lo que puede resultar difícil para muchas fuentes de luz (Cunico et al, 1998). La fluorescencia inducida por laser ha sido utilizada en los sistemas de CE con límites de detección tan bajos como 10^{-18} a 10^{-21} moles. La sensibilidad de la técnica se atribuye a la alta sensibilidad de la luz incidente y la habilidad para concentrar exactamente la luz en el capilar (Baker, 1995). Para obtener la identidad de los componentes de la muestra, la electroforesis capilar puede ser acoplada directamente con espectrometría de masas. En la mayoría de los sistemas, la salida del capilar es introducida en una fuente de iones que utiliza ionización por electrospray

(ESI). Los iones resultantes después son analizados por espectrometría de masas. Este acomodo requiere soluciones amortiguadas volátiles, lo cual afectara el rango de los modos de separación que pueden emplearse y el grado de resolución que se puede alcanzar (Cunico et al, 1998).

Modos de separación

La separación de compuestos por electroforesis capilar es dependiente de la migración diferencial de los analitos en un campo eléctrico aplicado. La migración electroforética velocidad (u_p) de un analito hacia el electrodo de carga positiva es:

$$u_p = \mu_p E$$

Donde μ_p es la movilidad electroforética y E es la fuerza del campo eléctrico. La movilidad electroforética es proporcional a la carga iónica de la muestra e inversamente proporcional a cualquier fuerza de fricción presente en el buffer. Cuando dos especies en una muestra tienen diferentes cargas o experimentan diferentes fuerzas de fricción, se separaran la una de la otra conforme migran a través de la solución buffer. Las fuerzas de fricción experimentadas por los iones analitos dependen de la viscosidad (η) del medio y del tamaño y forma del ión (Cunico et al 1998). En concordancia, la movilidad electroforética de un analito a un pH determinado esta dada por:

$$\mu_p = \frac{z}{6\pi\eta r}$$

Donde z es la carga neta del analito y r es el radio Stokes del analito. El radio Stokes está dado por:

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta}$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, y T es la temperatura. Estas ecuaciones indican que la movilidad electroforética del analito es proporcional a la carga del analito e inversamente proporcional a su peso molecular. La movilidad electroforética puede ser determinada experimentalmente del tiempo de migración y la fuerza del campo.

$$\mu_p = \left(\frac{L}{t_r}\right) \left(\frac{L_t}{V}\right)$$

Donde L es la distancia de la entrada al punto de detección, t_r es el tiempo requerido por el analito para alcanzar el punto de detección (tiempo de migración), V es el voltaje aplicado (la fuerza del campo), y L_t es la longitud total del capilar (Cunico et al 1998). Como sólo iones cargados son afectados por el campo eléctrico, los analitos neutros son separados pobremente por la electroforesis capilar.

La velocidad de migración de un analito en electroforesis capilar también dependerá de la velocidad del flujo electroosmótico (EOF) de la solución buffer. En un sistema típico, el flujo electroosmótico es dirigido hacia el electrodo de carga negativa “cátodo” así que el buffer fluye a través del capilar del vial fuente al vial destino. Separados por diferencias en su movilidad electroforética, los analitos migran hacia el electrodo de carga opuesta (Baker

1995). Como resultado, analitos negativamente cargados son atraídos al ánodo cargado positivamente, contrario al EOF, mientras los analitos cargados positivamente son atraídos al cátodo, en concordancia con el EOF como se describe en la *figura 13*.

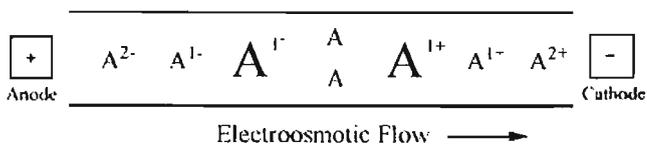


Figura 13: Diagrama de la separación de analitos neutros y cargados (A) de acuerdo con su respectiva movilidad electroforética y flujo electroosmótico.

La velocidad del flujo electroosmótico, u_o puede ser escrita como:

$$u_o = \mu_o E$$

Donde μ_o es la movilidad electroosmótica, que se define como:

$$\mu_o = \frac{\epsilon_r \zeta}{\eta}$$

Donde ζ es el potencial zeta de la pared capilar, y ϵ_r es la constante dieléctrica de la solución buffer. Experimentalmente, la movilidad electroosmótica puede ser determinada midiendo el tiempo de retención de un analito neutro (Cunico et al 1998). La velocidad (u) de un analito en un campo eléctrico puede ser definida como:

$$u_p + u_o = (\mu_p + \mu_o)E$$

Como el flujo electroosmótico de una solución buffer es en general mayor que el flujo electroforético de los analitos, todos los analitos son acarreados con la solución buffer hacia el cátodo. Incluso pequeños aniones cargados por triplicado pueden ser redireccionados al cátodo por el relativamente poderoso EOF de la solución buffer. Analitos cargados negativamente se retienen por más tiempo en el capilar debido a sus movibilidades electroforéticas conflictivas (Baker 1995). El orden de migración visto por el detector es mostrado en la "figura 3": cationes pequeños con carga múltiple migran rápidamente y aniones pequeños con carga múltiple son retenidos fuertemente (Cunico et al, 1998).

El flujo electroosmótico se observa cuando un campo eléctrico es aplicado a una solución en un capilar que tiene cargas estables en su pared interior. La carga es acumulada en la superficie interna del capilar cuando una solución buffer es colocada dentro del capilar. En un capilar de sílice fundida, los grupos silanol (Si-OH) adheridos a la pared interior del capilar son ionizados a grupos silanoato cargados negativamente (Si-O⁻) a valores de pH mayores que tres. La ionización de la pared del capilar puede ser mejorada primero corriendo una solución básica, como NaOH o KOH a través del capilar antes de introducir la solución buffer. Atraídos a los grupos Silanoato cargados negativamente, los cationes cargados positivamente de la solución buffer formarán dos capas internas de cationes (llamada la capa doble difusa) en la pared del capilar como se muestra en la *figura 4*. A la primera capa se le refiere como la capa estable porque es atraída fuertemente a los grupos silanoato. La capa externa, llamada la capa móvil, está más lejana de los grupos silanoato. La capa móvil catiónica es arrastrada hacia el cátodo cargado negativamente cuando un campo eléctrico es

aplicado. Como estos cationes son solvatados, la mayoría de la solución buffer emigra con la fase móvil, causando el flujo electroosmótico de la solución buffer. Otros capilares incluyendo capilares de Teflon también exhiben el flujo electroosmótico. El EOF de estos capilares es muy probable que sea el resultado de la adsorción de los iones cargados eléctricamente del buffer en las paredes del capilar (Baker 1995). La proporción de EOF es dependiente de la fuerza del campo y la densidad de carga de la pared del capilar. La densidad de carga de la pared es proporcional al pH de la solución buffer. El flujo electroosmótico incrementará con el pH hasta que todos los grupos silanoles disponibles a lo largo de la pared del capilar estén totalmente ionizados (Cunico et al, 1998).

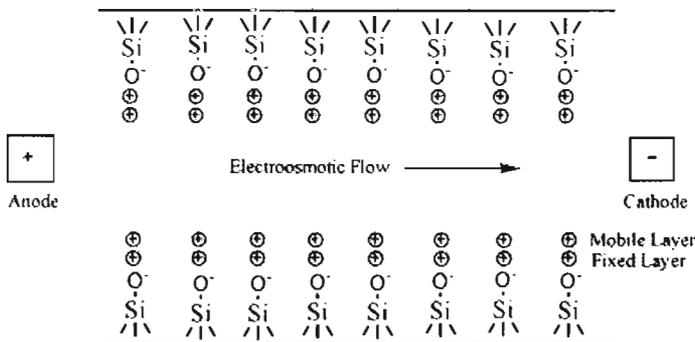


Figura 14: Descripción del interior del capilar de gel de sílice fundida en la presencia de una solución buffer.

Eficiencia y resolución

El número de platos teóricos, o eficiencia de la separación, en electroforesis capilar está dada

por:

$$N = \frac{\mu V}{2D_m}$$

Donde N es el número de platos teóricos, μ es la movilidad aparente en el medio de separación y D_m es el coeficiente de difusión del analito. De acuerdo con esta ecuación, la eficiencia de la separación sólo está limitada por la difusión y es proporcional a la fuerza del campo eléctrico. La eficiencia de las separaciones por electroforesis capilar es típicamente mucho mayor que la eficiencia de otras técnicas de separación como HPLC.

Diferente al HPLC, en electroforesis capilar no existe transferencia de masas entre las fases (Cunico et al 1998). Además, el perfil del flujo EOF dado en el sistema es plano, al contrario del perfil redondeado del flujo laminar característico de la presión del flujo manejado en las columnas cromatográficas como se muestra en la *figura 5*. Como resultado, EOF no contribuye de manera significativa al incremento del ancho de banda como en la cromatografía con presión manejada.

Las separaciones por electroforesis capilar pueden tener muchos cientos de miles de platos teóricos (Skoog 1998).

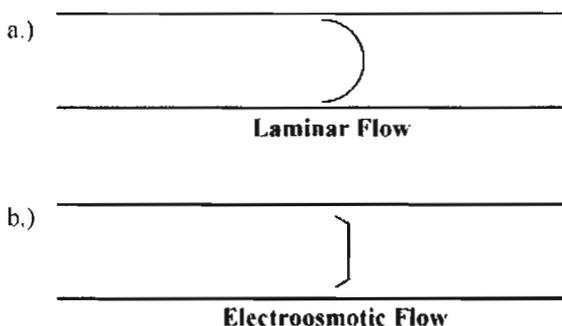


Figura 15: Perfiles de los flujos laminar y electroosmótico.

La resolución (R_s) de las separaciones por electroforesis capilar pueden ser escritas como:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\Delta\mu_p \sqrt{N}}{\mu_p + \mu_o} \right)$$

De acuerdo con esta ecuación, la máxima resolución es alcanzada cuando las movilidades electroforética y electrosmótica son similares en magnitud y opuestas en signo. Además, puede observarse que una alta resolución requiere menor velocidad y, en correspondencia se incrementa el tiempo de análisis (Cunico et al 1998).

Aplicaciones de la electroforesis capilar

Debido a su alta eficiencia y capacidad con respecto de su alta resolución, la electroforesis capilar puede ser utilizada para separar y determinar una amplia variedad de compuestos incluyendo iones inorgánicos simples, iones metálicos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, y proteínas. CE es usada muy en común, para analizar grandes biomoléculas solubles en agua (Baker 1995). CE es en particular una técnica atractiva porque requiere pequeñas cantidades de buffer y muestra para realizar muchos análisis. En la mayoría de las aplicaciones, CE es utilizada en conjunto con otras técnicas, ofreciendo diferente selectividad de separación o una cuantificación mejorada (Cunico et al, 1998). En general, la electroforesis capilar es capaz de separar compuestos con diferente proporción masa / carga. En concordancia, la mayor limitación de la electroforesis capilar es que resulta ineficiente para separar compuestos neutros (Simas et al 2001).

Tabla 3.

Principales métodos electroforéticos capilares para el análisis de proteínas de leche. [Z]

Proteínas	Metodología de	Análisis	Condiciones	Aplicaciones	Referencias
	CE	Cuantitativo			
α -La, β Lg Ay B, α_s -CN y β -CN	CZE	Áreas de los picos	Capilar de Sílice fundida RB: 0.5M buffers de fosfato (pH 6.0-9.0) con y sin Urea 4M SB: PBS (pH 7.0) (estándares). Leche inyectada sin tratamiento de la muestra.	La relación β -CN / α -La sirve para detectar adulteración de leche fluida con leche en polvo.	[a]
α -La, β Lg Ay B, BSA y fracciones de caseína principales	CZE	Sin resultados cuantitativos	Capilar con cubierta neutra RB: buffer de fosfato de sodio 10mM MHEC al 0.05%, Urea 6M (pH 2.45) SB: citrato de sodio 5mM, DTT 5mM,	Separación de proteínas de leche de vaca, cabra y oveja y sus variantes genéticas. Caseínas dañadas térmicamente. Análisis cualitativo de	[b]

				Urea 6M (pH 8.0)	leche humana, de vaca, cabra y oveja. Análisis de proteínas de soya.	
α -La, β Lg, BSA y fracciones de caseína principales	CZE	Repetibilidad del área: <4% Sensibilidad: 0.5mg/100ml de α -La 6.5mg/100ml de β Lg Recobro: 89-107% α -La, β Lg y BSA	Capilar con cubierta neutra RB: buffer de citrato de sodio 20mM MHEC al 0.05%, Urea 6M (pH 3) SB: TRIS al 167mM, MOPS al 42mM, EDTA al 67mM, DTT 17mM, Urea 10M (pH 8)	Medición de bajos niveles de BSA desnaturalizada térmicamente, α -La y β Lg en presencia de un exceso de caseínas. Identificación de las fracciones de caseína y variantes genéticas en leche de vaca, oveja y cabra. Identificación de productos de proteólisis de las caseínas.	[c] [d] [e]	
α -La, β Lg Ay B, BSA e IgG	SDS-CGE	Curva estándar para cada proteína de suero lácteo	Capilar de Sílice fundida RB: Kit de análisis proteico ProSort-SDS (Applied	Análisis cuantitativo de muestras de suero y concentrado de proteína de suero. Comparación con	[f]	

				BioSystems)	otros métodos	
				SB: 2% SDS,	analíticos.	
				2-mercapto		
				etanol al 5%		
α -La,	β Lg	CZE	Repetibilidad	Capilar de	Evaluación de la	[g]
Ay B y BSA			del área:	Sílice fundida	desnaturalización	[h]
			2.14-5.23%	RB: buffer de	de las principales	[i]
			Sensibilidad:	boratos 100mM	proteínas de suero	
			0.4mg/100ml	(pH 8.2) con	en leche sometidas	
			para β Lg A y B	sulfato ácido de	a distintos	
			respectivamente	sodio 30mM el	tratamientos	
			0.3mg/ml de	suero se inyecta	térmicos. Estudio	
			α -La B	de forma	del polimorfismo	
				directa.	de la β Lg en	
					distintas razas de	
					bovinos y su	
					influencia en el	
					contenido de β Lg.	
					Cuantificación de	
					las proteínas de	
					suero durante el	
					almacenaje de	
					leches UHT.	
					Datos comparados	
					con resultados de	
					HPLC.	
					Identificación del	
					origen de los	

α -La, β Lg	CZE	Repetibilidad	Capilar de	productos de proteólisis	[j]
Ay B BSA e IgG		del área: 0.7-1.3%	Silice fundida RB: 70mM	Análisis cuantitativo de muestras de suero	
		Sensibilidad: 0.6mg/100ml	buffer de fosfato (pH 2.5)	reales. Se identificó al	
		para α -La 0.11 mg/100ml	Muestras de suero diluidas	Caseínomacro péptido.	
		para β Lg	con RB		
		Recobro: 0.94-1.12 para			
		α -La y β Lg			

BSA, albúmina de suero bovino; CGE electroforesis en gel capilar; CZE, electroforesis en zona capilar; EDTA sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético; MHEC, metilhidroxietilcelulosa; MOPS, 3-N-(morfolino) ácido propanelsulfónico; RB, buffer de corrida; SB, buffer de muestra; SDS, dodecil sulfato sódico; TRIS, Tris(hidroximetil)aminometano.

Electroforesis Capilar en microchip

La electroforesis capilar en microchip es una nueva tecnología que emerge y promete guiar la siguiente revolución en el análisis químico. Tiene el potencial de en forma simultánea realizar cientos de ensayos de muestras en cuestión de minutos o menos. El análisis rápido combinado con arreglos de análisis paralelos en forma masiva deberían llevar a una eficiencia altísima. Los microchips típicamente consumen sólo pico litros de las muestras.

Estas funciones hacen a los microchips una tecnología atractiva para la siguiente generación de la instrumentación de electroforesis capilar.

A principios de los 90s, los análisis químicos en microchip fueron demostrados para muchas aplicaciones de electroforesis capilar (Manz et al, 1990), (Cheng et al, 1996).

La electroforesis capilar en microchip se basa en técnicas de micro fabricación desarrolladas por la industria semiconductora. Los micro canales en los microchips son fabricados usando fotolitografía o micro moldeo para formar canales para la inyección de muestra y la separación por electroforesis capilar.

Materiales y tecnologías de fabricación

Los chips de CE son fabricados principalmente usando varios sustratos de vidrio (Woolley y Mathis 1994), (Fan y Harrison 1994), (Jacobson et al, 1995) desde el nada caro vidrio limado de refrescos hasta el cuarzo de alta calidad.

Recientemente, materiales de varios polímeros han sido utilizados para fabricar microchips para separaciones por CE [Roberts et al 1997 – Martynova et al 1997].

Procedimientos de fabricación para materiales de vidrio

Las estructuras sobre sustratos de vidrio son en su mayoría generadas utilizando tecnologías fotolitográficas estándar [Woolley y Mathies 1994, Fan y Harrison 1994 – Koutny et al 1996].

Procedimientos de fabricación para materiales de polímeros

Métodos para la fabricación de microchips plásticos incluyen extirpación láser [Roberts et al 1997], moldeo por inyección [McCormick et al 1997, Ekstrom et al 1994], moldaje de goma silicón [Effenhauser et al 1997], y el estampado en caliente [Martynova et al 1997].

Formato del microchip

El diseño de los microchips para electroforesis capilar (CE) ha sobrellevado un desarrollo significativo desde estructuras con canales-únicos simples hasta unos más complejos.

Se han desarrollado las reglas del diseño para geometrías de muchos canales y los largos de separación con las herramientas de diseño por computadora que se han vuelto comercialmente disponibles. Los diseños actuales permiten reacciones dentro del chip y separaciones en canales múltiples.

Largo del canal de separación

El cambio del formato de columna de electroforesis capilar de largos capilares a canales cortos micro fabricados brinda nuevas oportunidades, limitaciones y retos. La miniaturización, pequeñas porciones de inyección, y tramos de separación cortos permiten rápidas separaciones sin el significativo ensanchamiento de picos debido a la difusión.

Geometría de canales

Los micro artículos para la electroforesis capilar (CE) tienen por lo típico canales con fondo de 15-40um y anchos de 60-200um [Jacobson et al 1994, Jacobson et al 1994⁷⁷, Liu y Sweedler 1996], aunque se han reportado canales con fondos menores de 10um [Harrison et al 1993, Jacobson et al 1998]. La pequeña sección transversal de los canales de separación y la alta masa térmica del microchip permiten que se disipe eficientemente el calentamiento Joule. Por lo tanto, altos campos eléctricos (por encima de 2kV/cm) pueden ser aplicados a

los microchips. Un campo eléctrico tan alto como 53kV/cm ha sido utilizado en un canal especial diseñado para alcanzar separaciones por debajo de milisegundos.

En convecciones al aire libre, se han observado pequeños gradientes de temperatura radiales de 2-4C del centro del canal a la pared del mismo. Con enfriamiento forzado, la diferencia del centro a la pared es menor a 1C [Liu et al 1994].

Manipulación y derivatización de la muestra

El muestreo, la concentración de la muestra por adición y la derivatización pre o post columna pueden realizarse dentro de los microchips de electroforesis capilar (CE). Las muestras son cargadas típicamente de platos microtituladores a los pozos de las muestras usando pipetas estándares.

Inyección de la muestra

Casi siempre se utiliza inyección de la muestra integrada para producir la pequeña cantidad de muestra (medida en pico litros) requerida para los microchips de electroforesis capilar (CE).

Derivatización de la muestra en línea

Para incrementar la sensibilidad de la detección de los analitos sin una fuerte señal analítica inherente, en general son marcados con un fluoróforo y detectados por LIF. El marcado puede ser precolumna, p.e., realizado antes de la separación por electroforesis capilar CE, o postcolumna, cuando ya han sido separados los analitos son marcados y detectados.

Detección Óptica

Es indispensable contar con esquemas de detección sensibles, en el caso de los artículos micro fabricados para la separación por CE debido al tamaño muy pequeño de la celda de detección. LIF (fluorescencia inducida por rayo láser) es hasta ahora el esquema de detección más popular para los chips de CE debido a su sensibilidad [Harrison et al 1993, Jacobson et al 1994, Burggraf et al 1993, Jacobson et al 1994, Fister et al 1998, Zhang et al 1998]. Un sistema de detección LIF que puede ser aplicado a los microchips utiliza un sistema de detección con focal, basado en lo descrito por Mathies y Huang 1992.

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una herramienta poderosa en la química analítica. Realiza la separación, detección e identificación de un amplio rango de compuestos, incluyendo polipéptidos y ácidos nucleicos.

La espectrometría de masas (MS) ha sido acoplada de manera exitosa a la electroforesis capilar CE con varios micro artículos de electro spray.

La electroforesis capilar CE en microchips y la ionización por electro spray (ESI)/MS han sido recientemente conectadas [Fijéis y Aebersold 1999, Xue et al 1997]. Los mismos artículos son utilizados para cargar las muestras al espectrómetro de masas MS utilizando el flujo electroosmótico sin ninguna separación por electroforesis capilar CE.

Detección electroquímica

Mientras que LIF provee una sensibilidad con un límite de hasta una sola molécula, el sistema de detección es mucho mayor que los artículos de análisis micro fabricados. Esto

reduce los beneficios de la miniaturización [Woolley et al 1998]. Los métodos electroquímicos proveen un acercamiento de detección alternativo al nombrar este asunto.

Cuando los electrodos son micro fabricados, por lo general resultan con mucha mayor sensibilidad y tiempos de respuesta más rápidos [Gavin y Ewin 1996, Gavin y Ewin 1998, Gavin y Swing 1997].

Otros métodos de detección

Algunos otros métodos de detección han sido aplicados a los chips CE incluyendo espectroscopia Raman y detección por índice de refracción holográfico.

Aplicaciones

Un desarrollo de aplicaciones para una nueva tecnología es siempre una confirmación de que la tecnología esta madurando.

La electroforesis en microchip ahora ha sido aplicada al análisis de ácidos nucleicos, proteínas y otros tipos de muestras en aplicaciones de investigación. Se espera que en un futuro aparezcan aplicaciones comerciales.

Determinación electroforética del tamaño y análisis de la concentración de proteínas utilizando el Labchip90

Ahora que el proyecto del genoma humano está terminado, la siguiente fase genómica importante es entender la expresión y función de las proteínas. Muchas proteínas son claves en funciones celulares y resulta esencial una identificación más eficiente de nuevos objetivos para el desarrollo de fármacos.

Después de procesar la información genética muchos laboratorios están generando un gran número de muestras de proteínas para estudios posteriores. En la actualidad existe un impedimento significativo en el proceso para el análisis de proteínas. Por consiguiente, la demanda para métodos automatizados para el análisis de proteínas ha venido incrementándose. A pesar de los desarrollos y mejoras continuas en los métodos de análisis de proteína muchos investigadores aún utilizan métodos tradicionales como electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Este método representa consumo de tiempo, una labor intensa y puede generar una cantidad significativa de desperdicios peligrosos.

Caliper Life Sciences ha desarrollado una plataforma instrumental integrada de alto desempeño que realiza determinaciones para el tamaño de proteínas y su cuantificación relativa. Este ensayo microfluidico es una alternativa automatizada al análisis manual de proteínas SDS-PAGE. El sistema LabChip 90 muestrea de forma directa de 96 platos pozo e integra todas las operaciones manuales esenciales al análisis de proteínas, incluyendo el teñido, desteñido, separación, detección y el análisis de información subsecuente. Mientras que el SDS-PAGE tradicional podría tardar entre 3 y 6 horas

Sólo para la separación y detección electroforética, el ensayo de proteínas con el LabChip 90 logra todos los aspectos del SDS-PAGE y en adición provee análisis de información cuantitativa de 96 muestras en 3 horas. Esta nota de aplicación describe del desempeño del ensayo proteico con el LabChip 90 y provee información demostrando la reproducibilidad para ambas mediciones tamaño y concentraciones de las proteínas (Sang et al 2001).

Fundamentos del Ensayo Proteico.

El ensayo proteico con el LabChip 90 se basa en una versión microfluidica del SDS-PAGE. Las proteínas son desnaturalizadas y recubiertas con SDS, lo que resulta en la superficie de la

proteína con carga neta negativa que es por aproximación proporcional al tamaño de la proteína desdoblada y menos dependiente a la carga de la proteína. El recubrimiento con SDS también provee un ambiente hidrofóbico para el marcador fluorescente. En vez de un gel entrecruzado de poliacrilamida, el LabChip 90 utiliza canales microfluidicos llenos con una solución de polímero acrilamida, la cual es una matriz tamiz para separar a la proteínas recubiertas de acuerdo con su tamaño

Función del Chip Microfluidico

El chip proteico del LabChip 90 realiza muchas funciones secuenciales, las que son referidas en la Figura siguiente. Primero, utiliza vacío en el pozo 1 para aspirar aproximadamente 170 nL de muestra de proteína del plato a un sorbedor capilar y hacia los canales microfluidicos del chip. Durante este paso la muestra es diluida 1:1 con una solución marcadora. La cual es de forma simultánea vertida desde el pozo 4. Este marcador es posteriormente utilizado como referencia para el tiempo de migración como se realiza de manera típica con la técnica SDS-PAGE. También se utiliza para la cuantificación relativa. Después, el chip electroforéticamente “carga” la mezcla proteína-marcador en los canales entre los pozos 3 y 8, donde cruza al canal de separación. Una porción de 20 pL de muestra es inyectada electroforéticamente al canal de separación. Un potencial es luego aplicado entre los pozos 7 y 10, lo que provoca que las proteínas individuales en la muestra migren por el canal de separación. Cada proteína es teñida con marcador contenido en el gel y separadas en distintas bandas con una resolución de 4-20% comparable a la obtenida en el gel SDS-PAGE. El desteñido de las proteínas se completa usando un paso de dilución que se logra por el flujo electrocinético de iones libres de SDS hacia el canal de separación en la intersección de

desteñido. Esto provoca que el fluido proteína-SDS-marcador corra a enfocarse como se muestra en la Figura 2.

En aproximadamente 250 milisegundos, la difusión de las micelas SDS libres hacia el fluido libre de SDS resulta en el rompimiento de micelas y una caída significativa en el fondo de fluorescente. Como las proteínas todavía estén recubiertas con el complejo SDS-marcador y retienen su fluorescencia, las bandas de proteína separadas son detectadas por debajo de la corriente del punto de dilución utilizando fluorescencia inducida por láser (LIF).

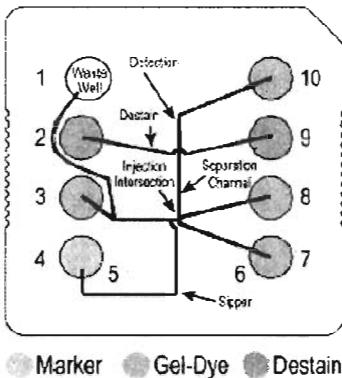


Figura 16. Un diagrama detallado del Chip proteico del LabChip 90.

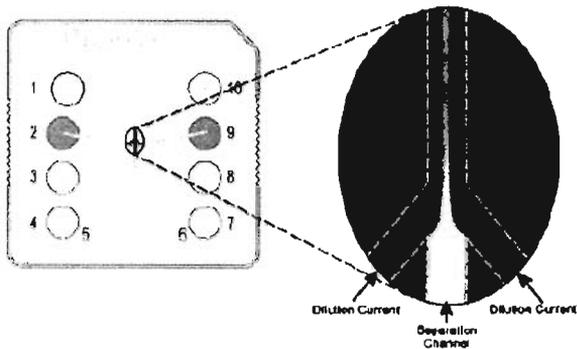


Figura 17. Una vista detallada del diseño y región de detección del Chip proteico del LabChip 90. La foto de la derecha es una fotografía real de esta región.

Protein Assay Specifications

Type	Specification
Sizing range	P100: 14-100 kDa P200: 14-200 kDa
Sizing accuracy	± 20%
Resolution	± 10% difference in MW across the sizing range, 50% valley
Linear dynamic range	20-2000 µg/mL
Relative concentration CV	30% up to 120 kDa relative to the ladder
Sensitivity	20 µg/mL (40 ng) BSA or CA in PBS buffer Sensitivity is equivalent to Coomassie
Analysis time	P100 - 60 seconds/sample P200 - 70 seconds/sample
Chip Lifetime	3-96 well plates
Time per plate	~3 hours

Especificaciones del Ensayo Proteico proporcionadas por el fabricante, destacan el LDR y el rango de tamaño dentro de los marcadores de peso molecular que puede analizar exitosamente el equipo.

Perspectivas a futuro

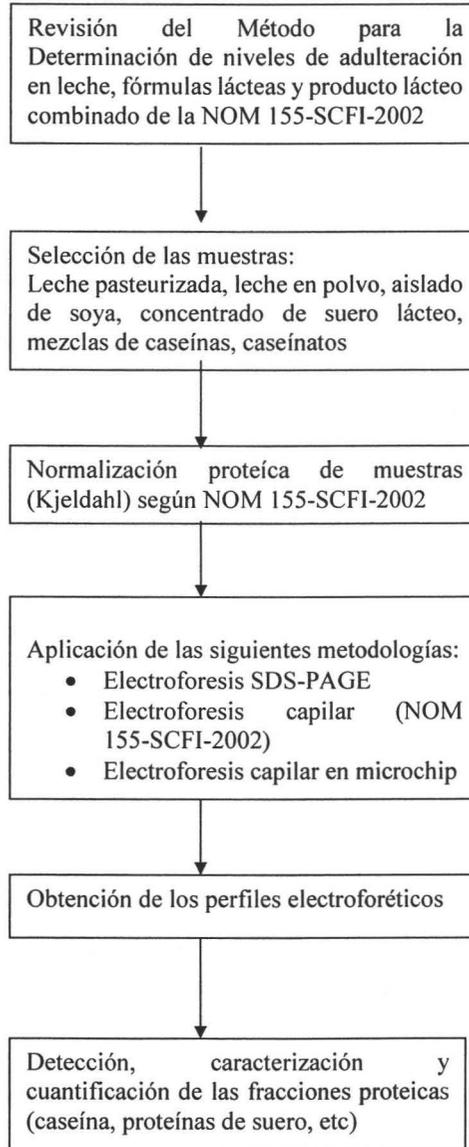
La electroforesis capilar (CE) en microchips es una nueva tecnología analítica que emerge rápidamente. La posibilidad fundamental de aplicar micro fabricación a la CE es ahora bien establecida y se han demostrado numerosas aplicaciones. La adaptación de la electroforesis capilar (CE) a microchips tiene muchas ventajas. Inyectores integrados producen porciones de muestras bien definidas que pueden ser resueltas en caminos de corta longitud. Las pequeñas porciones, buena disipación del calentamiento y altas diferencias de potencial aplicadas al campo eléctrico resultan en separaciones extremadamente rápidas que consumen solo pico litros como volúmenes de muestra.

El rápido progreso de la electroforesis capilar en microchip ha hecho en la última década sugerencias del impacto que puede tener en la siguiente. La electroforesis capilar en microchips tiene el potencial de ser la primera aplicación analítica en expandir fundamentalmente las nuevas tecnologías de microfluidicos y microchip. Se espera el desarrollo de instrumentos basados en CE por microchip que realicen automática y rápidamente además de en forma eficiente diversas aplicaciones electroforéticas con costos mínimos de preparación de las muestras. En los próximos años, la tecnología basada en microchips podría revolucionar muchas aplicaciones industriales de electroforesis capilar (CE) incluyendo la selectividad de medicamentos, análisis de polimorfismo de nucleótidos simples (SNP), re secuenciación para fármacogenéticos, proteomicos y diagnósticos.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

Diagrama experimental



Determinación de caseína en leche (Metodología referida en la NOM 155-SCFI-2002)

Reactivos y materiales

- Acido acético (1:9)
- Acido bórico
- Acido clorhídrico
- Acido sulfúrico 93% a 98% (libre de nitrógeno)
- Granallas de zinc grado reactivo
- Indicador de Wesslow
- Sulfato de cobre
- Sulfato de sodio anhidro grado reactivo

Preparación del indicador Wesslow

Mezclar dos partes de "a" y una parte de "b",

a) Rojo de metilo al 0,2% en una mezcla de 60 mL de alcohol etílico y 40 mL de agua

(CH₃)NC₆H₄N=NC₆H₄COOH y C₂H₅OH y H₂O.

b) Azul de metileno al 0,2% en agua C₁₆H₁₈N₃SCl.Cl₂Zn.H₂O.

Materiales

- Bureta de 50 mL.
- Espátula.
- Embudo de filtración.
- Vaso de precipitado de 100 mL.
- Probeta de 100 mL y 250 mL.

- Papel filtro de filtración lenta con retención de cristales finos.
- Pipeta de 1,0 mL.
- Matraces Kjeldhal de 500 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 500 mL.
- Agitador magnético.

Equipo

- Balanza analítica con exactitud de 0,1 mg
- Digestor-destilador de Kjeldhal

Preparación de la muestra

La reconstitución de la leche en polvo se deberá realizar de la siguiente forma:

Pesar un gramo de la leche en polvo en un vaso de precipitado de 100 ml, disolver completamente con agua de 40°C a 42°C, dejar reposar 10 min y posteriormente adicionar 0,30 mL de ácido acético 1:9, mezclar suavemente por rotación y dejar reposar de 3 min a 5 min.

Procedimiento

Medir 10 mL de leche en un vaso de precipitados de 100 ml adicionar 90 mL de agua destilada de 40°C a 42°C e inmediatamente adicionar aproximadamente 1,5 mL de solución de ácido acético (1:9) hasta llegar a un pH de 4,6, mezclar suavemente.

Continuar conforme al procedimiento indicado de acuerdo a la MX-F-608-NORMEX-2002.

Expresión de resultados

El nitrógeno presente en la muestra, expresado en porcentaje se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = V \times N \times 0,14 \times 100 / M$$

Donde:

M es el volumen o peso de la muestra.

V es el volumen gastado en la muestra-Volumen gastado en el blanco.

N es la normalidad del ácido clorhídrico.

0,014 son los miliequivalentes del nitrógeno;

El porcentaje de proteínas se obtiene multiplicando el % de nitrógeno obtenido por el factor de 6,38 para las fracciones lácteas y la leche; 6.25 para los productos de soya.

Electroforesis SDS-PAGE

Materiales y Metodos

Hardware y Consumibles:

- Gel Bio-Rad Criterion Precast gradiente 8-16%, Tris-HCl, 1.0 mm, 26 comb, 15 mL capacidad de muestra
- Buffer de corrida Bio-Rad 1X TGS

- Aparato para gel (Placas de vidrio): Bio-Rad, Dodeca Cell ó cámara Hoefer Se 600 Series Electrophoresis Unit. USA
- Fuente de poder: VWR, model 500-2
- Marcador: Ensayos Moleculares, Sypro Orange o solución teñidora
- Sistema de digitalización: Densitómetro Fluorst GS 700 (Bio Rad Laboratories, USA) ó Bio-Rad, Gel Doc 2000
- Software para digitalización: Bio-Rad, Quantity One, V4.1.0.026

Preparación de la muestra:

Preparación de las soluciones stock. Se pesaron aproximadamente 10mg de cada una de las muestras seleccionadas para este análisis.

Muestra	Peso (mg)
Proteína de soya	10.5
Proteína de suero	10.5
Mezcla de caseínas Hammerstein	10.5
Mezcla de caseínas Sigma	10.1

Tabla 1. Valores de las masas de las muestras seleccionadas que fueron utilizadas para la preparación de las soluciones para el análisis de las fracciones proteicas por el método SDS-PAGE

Todas las muestras fueron diluidas en 1 ml de agua desionizada. Para después ser diluidas 1:2 en el buffer de tratamiento en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se calentaron en baño María por 5 minutos para su completa dilución aunque las mezclas de caseínas en adición necesitaron aproximadamente 200ul de NaOH 0.1 N. Ocho microlitros de estas mezclas fueron cargados en los geles de separación.

Parámetros de Separación:

- Voltios: 70, 100, 110 V
- Tiempo: 5, 15, 85 min.

Tinción y digitalización

- Solución fijadora: 50 mL de una solución al 10% de ácido acético por una hora
- Solución teñidora: 0.05g de Azul de Coomasie, 80ml MetOH, 14ml de ácido acético glacial y agua desionizada., tinción del gel por una hora como mínimo
- Digitalización: Densitómetro Fluorst GS 700 (Bio Rad Laboratories, USA)

Documentación:

- Captura de los datos interpretados a la base de datos de forma manual.

Electroforesis capilar (Metodología referida en la NOM 155-SCFI-2002)

Reactivos

- Fosfato de potasio, grado analítico, monobásico, KH_2PO_4
- Fosfato de potasio, grado analítico, dibásico, K_2HPO_4
- Ácido fosfórico H_3PO_4
- Hidroxipropilmetilcelulosa, viscosidad 15, 000 (Catálogo fluka N1 09965 u otro)
- Urea
- Agua desionizada
- Ácido Clorhídrico, HCl , 0.1 N
- Ditioneitol (DTT) (Catálogo Aldrich N° 45, 777-9 u otro)
- Soluciones estándares de leches
- Soluciones estándares de los productos adulterantes

Equipo

a) Sistema de electroforesis Capilar con las siguientes características:

- Control de temperatura del capilar entre 15°C y 40°C
- Sistema de inyección por presión
- Detector Ultra Violeta con luz filtrada a 214 nm ó con arreglos de diodos.
- Sistema de control del voltaje hasta 30 kV

- Software de integración y análisis de resultados.
- b) Capilar de separación con las siguientes características:
 - Capilar neutro con recubrimiento interno de poliacrilamida
 - Diámetro interno de 50 μm
 - Longitud efectiva de 50 cm
- c) Centrífuga para tubos tipo "Eppendorf" con las siguientes características:
 - Velocidad máxima: 14,000 RPM
 - Presión Máxima: 18,000 g
- d) Agitador magnético
- e) Potenciómetro
- f) Sistema de filtración a 0.2 μm
- g) Pipetas analíticas en el rango 10-100 μL y 100 μL -1000 μL
- h) Puntas para pipetas analíticas

Preparación de la muestra:

a) Para los estándares de Caseína se pesaron:

Marca del estándar de Caseína	Peso (g)
Hammerstein	0.1023
Sigma	0.1003

Se mezcló con 10 mL de una solución conteniendo 6M Urea y 0,005 M de fosfato de potasio a pH 8 y se guardó la solución en refrigeración (2-8 °C).

Y para el aislado proteico de suero lácteo:

Muestra	Peso (g)
Proteína de suero lácteo	0.0500

Se mezcló con 100 mL de una solución conteniendo 6M Urea y 0,005 M de fosfato de potasio a pH 8 y se guardó la solución en refrigeración (2-8 °C).

b) Para la muestra de leche fluida: Se centrifugaron 3 ml de la muestra de leche a 18,000 g durante 15 min.

Se recuperó 1 mL de sobrenadante y se mezcló con 4 mL de una solución conteniendo 6M Urea y 0,005 M de fosfato de potasio a pH 8 (esta solución se preparó mezclando 36 g de urea y 87 mg de fosfato de potasio dibásico con 100 mL de agua desionizada, el pH se ajustó a 8). Se guardó la solución en refrigeración (2-8 °C).

Se preparó una solución de DTT a 0.2 M: Mezclando 309 mg de DTT con 10 ml de agua. Se agitó para diluir el DTT y guardó en diferentes alícuotas en refrigeración (2-8 °C).

Se agregaron 10 µl de la solución de DTT a la muestra y se pusieron a agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se filtró la muestra a través de un filtro de tamaño de poro 0.2 µm.

Preparación de la solución de separación:

Se preparó una solución madre de fosfato con urea: Mezclando 1,36 g de fosfato de potasio

monobásico con 36 g de urea en 100 mL de agua desionizada, el pH de esta solución debe ser de 2,5. Se guardó la solución, sellada, en refrigeración (2-8 °C). Se preparó una solución madre de HPMC: Mezclando 0,1g de HPMC en 100 mL de agua desionizada. Agitando moderadamente la solución para permitir la solubilización del HPMC, a temperatura ambiente. Se guardó la solución, sellada, en refrigeración (2-8 °C).

Para obtener la solución de separación, 24 horas aproximadamente antes de su uso, se mezclaron 10 mL de la solución de fosfato con 10 mL de la solución de HPMC, el pH final fue de 2,5. La solución resultante se guardó hasta su uso en un frasco cerrado a temperatura ambiente.

Corrida de separación

La separación se realizó en un capilar neutro (recubrimiento interno o coating de poliacrilamida) de 50 cm de longitud efectiva (longitud a la ventana de detección) y 50 µm de diámetro interno. Los pasos de la separación fueron los siguientes:

a) Lavado del capilar

El capilar se lavó con las soluciones siguientes:

- Lavado con agua desionizada 2 minutos
- Lavado con HCL 0.1 N 2 minutos (5 minutos cuando se usa por primera vez)
- Lavado con agua desionizada 1 minuto

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Lavado con solución de separación 3 minutos (10 minutos cuando se usa por primera vez)

b) Inyección de la muestra

La inyección se realizó desde un vial tapado y tiene las siguientes características: inyección por presión a 0,04 MPa (0,5 psi) durante 20 s.

c) Separación de la muestra

La inyección se realizó a tensión constante de 350 V/cm durante 30 minutos, a temperatura constante de 35 °C. El búfer de separación durante la corrida fue la misma solución de separación pH 2,5. Las proteínas se monitorearon a 214 nm de longitud de onda de absorbancia. La polaridad fue normal (cátodo a la salida del capilar).

Electroforesis capilar en microchip

Ensayo proteico en el LabChip 90

Hardware y Consumibles:

- Kit de análisis para LabChip de Caliper Life Sciences HT Protein 200 (incluye un chip y reactivos para un mínimo de 300 muestras) y un instrumento LabChip 90.

Preparación de la muestra y del Chip:

- Muestras: Proteína de soya, proteína de suero, leche en polvo, mezcla de caseínas Hammerstein, mezcla de caseínas Sigma, preparación alimenticia adicionada con Caseinato de Sodio, caseína ácida, leche fluida.
- Las muestras fueron preparadas en un plato de 96 pozos (MJ Research, plato de fondo cónico) mezclando 2 μL de cada muestra de proteínas y 7 μL del buffer desnaturizante (Buffer de muestra para ensayo proteico + 3.5% v/v b-mercaptoetanol). La mezcla después fue desnaturizada por calor a 95°C por cinco minutos. Después de enfriado, se adicionaron 35 μL de agua desionizada a cada muestra desnaturizada.
- El Chip HT Protein 200 fue preparado de acuerdo a la guía del usuario del Kit del Labchip. La preparación del chip tomó aproximadamente 10 minutos.

Separación y Análisis de la Información:

- El LabChip 90 separa, tiñe, destiñe, y detecta las proteínas automáticamente.
- El software LabChip HT analiza y reporta el tamaño y concentración de las proteínas encontradas en cada muestra. La información de las muestras puede ser revisada en un formato de tabla, en una vista del electroferograma o una imagen de gel virtual que es similar en apariencia a un gel SDS-PAGE.

La información también puede ser fácilmente exportada una vez consumado el análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Determinación del contenido proteico

Las muestras a analizar se evaluaron para determinar el % de proteína contenido por el método de Kjeldahl - Gunning y se tomaron como valores de referencia los establecidos en la Norma oficial mexicana-NOM-155-SCFI-2002 así como los valores reportados en las etiquetas de los productos por los fabricantes. En el caso de los productos lácteos se aplicó un tratamiento previo para la cuantificación de Nitrógeno únicamente a la fracción obtenida en el precipitado de caseína, según la técnica referida en la misma **NOM 155-SCFI-2002** según la metodología descrita. En las otras muestras si se determinó nitrógeno total. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 2. Resultados del análisis proteico

Muestra	% proteína
Mezcla de caseínas Hammerstein	86.282+-0.669
Mezcla de caseínas Sigma	83.997+-1.204
Proteína de soya aislada	22.746+-1.186
Proteína de suero lácteo	60.227+-5.225
Leche de soya	12.148+-1.061
* Leche entera en polvo	2.5547+-0.0212
* Leche entera pasteurizada	1.6670+-0.1535
* UHT parcialmente descremada	2.6462+-0.0155
* UHT semidescremada	2.6191+-0.0385
* UHT descremada	3.0324+-0.0411

Se presenta el promedio de tres repeticiones y su desviación estándar.

En el caso de los valores obtenidos para las mezclas de Caseína ambas se encuentran alrededor del 80%. En ninguna de las dos marcas el fabricante reporta su pureza, pero el

dato obtenido indica que viene acompañada de excipientes y diversos subproductos lácteos mismos del proceso de obtención, como se verá en los demás análisis.

El aislado de proteína de soya presenta valores muy por debajo del 30%. El fabricante tampoco reporta pureza, pero esto indica que no se trata de un aislado puro, que normalmente alcanza un valor de 80%. La leche de soya comercial se obtuvo un valor por debajo de lo reportado por el fabricante (14% de proteína).

Para las leches comerciales la Norma Oficial Mexicana-NOM-155-SCFI-2002 establece como contenido mínimo de proteína 3g en 100 ml, y de ésta el 70% debe corresponder a la caseína de leche es decir 2.1%. Los valores obtenidos experimentalmente indican que la leche entera pasteurizada no cumple con la especificación en cuanto al contenido mínimo de caseína de leche dictada en la norma. Las demás leches (en polvo y UHT's) sobrepasan el límite de especificación establecido en la norma. Muy probablemente debido a que al restarle grasa butírica se ve ligeramente modificada la densidad de la leche por lo que los componentes lácteos restantes; incluidas las proteínas de alguna manera se concentran (Referirse a la tabla de resultados del análisis proteico).

2. Resultados y Discusión del Análisis de muestras por electroforesis unidimensional en gel SDS-PAGE

Las muestras alimenticias analizadas en el gel de poliacrilamida fueron:

- Proteína de soya.
- Proteína de suero.
- Mezcla de caseínas Hammerstein
- Mezcla de caseínas Sigma.

<i>Muestra</i>	<i>C [mg/ml]</i>
Proteína de soya.	5.25
Proteína de suero.	5.25
Mezcla de caseínas Hammerstein	4.37
Mezcla de caseínas Sigma.	4.20

Identificación y concentración inicial de las muestras analizadas por electroforesis unidimensional en gel SDS-PAGE.

Se analizaron las muestras anteriores por electroforesis unidimensional en gel SDS-PAGE de la siguiente manera: Se prepararon dos geles que contenían en los extremos a los marcadores de alto y bajo Peso Molecular. Se realizó 1 inserción de 8 ul por duplicado de la solución preparada de cada muestra. Los carriles se seleccionaron de la siguiente forma; para la muestra 1 carriles 2 y 3, para la muestra 2 carriles 3 y 4 del primer gel. Para el segundo gel la identificación fue la misma, es decir para la muestra 4 carriles 2 y 3, para la muestra 5 carriles 4 y 5, con la finalidad de obtener resultados cualitativos y cuantitativos, así como un análisis estadístico poco significativo (por tratarse los datos experimentales únicamente por duplicado) de los resultados

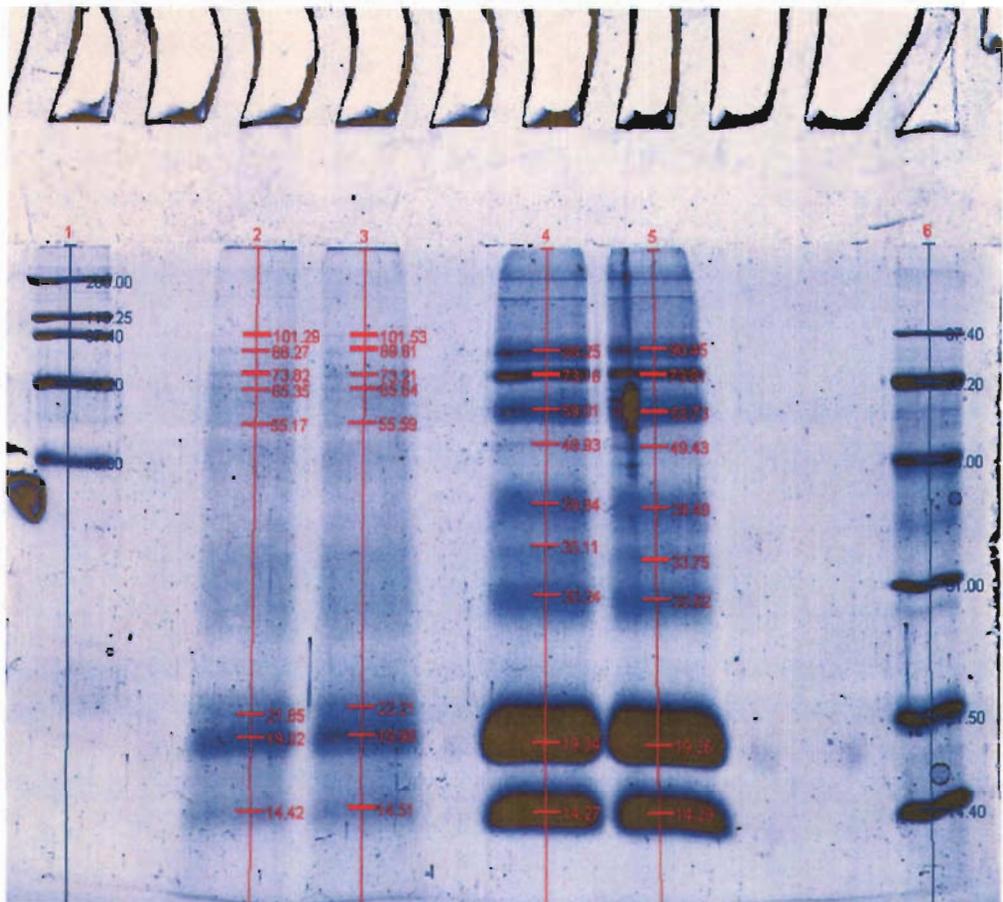
Análisis molecular

Se digitalizaron los geles mediante el densitómetro Fluorst GS 700 (Bio Rad Laboratories, USA) y se obtuvieron los pesos moleculares de cada una de las fracciones encontradas en las muestras con respecto de los marcadores de bajo y alto peso molecular (marca Bio Rad), así como la Concentración Relativa de las fracciones proteicas con respecto del % Total mediante el software Quantity One, Bio Rad. USA. Se caracterizaron las fracciones proteicas por sus tamaños correspondientes (kDa).

Análisis de Reproducibilidad

Las tablas del Peso Molecular dado en kDa y la Concentración relativa (mg/ml) de las cuatro muestras muestran la reproducibilidad de la información cuantitativa. Aunque es preciso mencionar que sólo se realizó por duplicado. Se proporcionan los valores SD y % CV que son un buen indicativo de la precisión de la metodología empleada para la caracterización de fracciones proteicas. Es importante hacer notar que no se obtuvo el rango dinámico lineal (LDR) de la metodología. Por lo que no sería prudente decir que este estudio sigue la linealidad de respuesta del análisis SDS-PAGE para la caracterización de fracciones proteicas.

Caracterización de fracciones proteicas contenidas en las muestras: proteína de soya, proteína de suero, mezclas de caseínas Hammerstein y Sigma por SDS-PAGE



MAPM

Soya

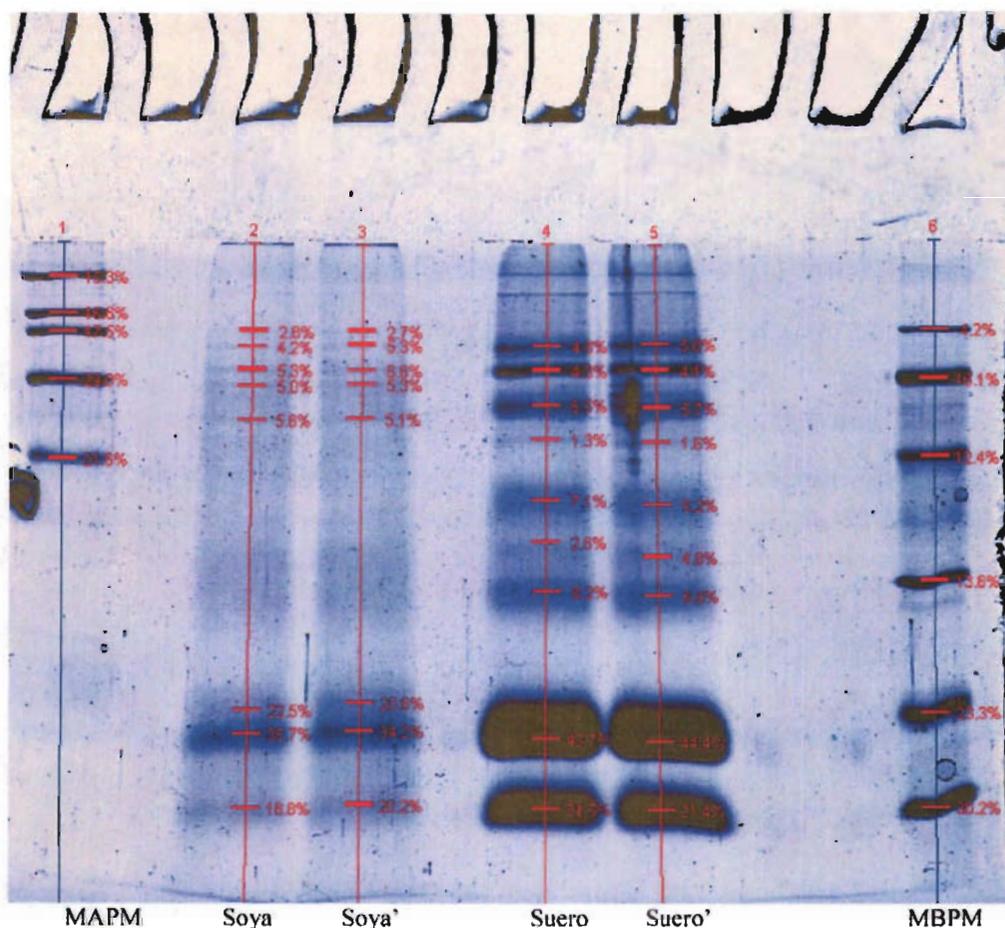
Soya'

Suero

Suero'

MBPM

Electroferograma 1. Muestra los PM (dados en kDa) de las bandas resueltas de las fracciones proteicas contenidas en las muestras: aislado proteico de soya y concentrado en polvo de suero de leche.



Electroferograma 2. Muestra el % parcial que aporta cada banda resuelta en las fracciones proteicas contenidas en las muestras: aislado proteico de soya y concentrado en polvo de suero de leche.

Proteína de soya

Se lograron resolver 8 marcas para los carriles 2 y 3 que contienen a la muestra 1, sus pesos

moleculares oscilan entre 14 y 102 kDa. La fracción más abundante es aquella con PM aproximado de 20 kDa con un 35% mientras que la de menor abundancia fue la de PM de 101 kDa con tan sólo 2.8%, los constituyentes principales son la β -conglucina (globulina 7S) y la glicina (globulina 11S), así como por algunos componentes menores de la β -conglucina (globulina 7S) (J-López Tapia et al 1999). Esto se puede apreciar mejor en la siguiente tabla.

PM (2) (kDa)	PM (3) (kDa)	% Total (2)	% Total (3)	Concentración Rel. (mg/ml) (2)	Concentración Rel. (mg/ml) (3)
101.29	101.53	2.8	2.7	0.1470	0.1417
88.27	89.81	4.2	5.3	0.2205	0.2782
73.82	73.21	5.3	6.6	0.2782	0.3465
65.35	65.64	5.0	5.3	0.2625	0.2782
55.17	55.59	5.6	5.1	0.2940	0.2677
21.85	22.21	22.5	20.6	1.1812	1.0815
19.92	19.98	35.7	34.2	1.8742	1.7955
14.42	14.51	18.8	20.2	0.9870	1.0605

Marcas resueltas (presentadas en orden descendente) del primer gel, carriles 2 y 3 respectivamente de la proteína de soya

Reproducibilidad

El análisis cuantitativo de la variación establecida para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en los geles SDS-PAGE para la muestra 1 arroja valores para la SD menores al 0.5 en casi todas las fracciones igual que el % CV que en su mayoría arroja valores por debajo del 1 %. Este resultado podría esperarse gracias a la gran ayuda que representa el software hoy día, sin embargo factores como la estructura de la proteína, modificaciones post-traduccionales y la composición de aminoácidos son variables que son difíciles o imposibles de minimizar y pueden afectar la migración electroforética. Algunos

mencionarían a la espectrometría de masas como mejor aliado para esta labor con resultados con mucha mayor exactitud, complementar el análisis SDS-PAGE con espectrometría de masas producirá una determinación más exacta. A pesar de sus limitaciones, SDS-PAGE es todavía un método usado comúnmente para la determinación de PM de una proteína.

Carril 2	Carril 3			
Tamaño kDa	Tamaño kDa	Tamaño promedio	SD	% CV
101.29	101.53	101.41	0.1697	0.16734
88.27	89.81	89.04	1.0889	1.22298
73.82	73.21	73.515		
		β-conglucina		
		(incluyendo cadena α)	0.4313	0.58673
65.35	65.64	65.495	0.2050	0.31309
55.17	55.59	55.38	0.2969	0.53626
21.85	22.21	22.03	0.2545	1.15550
19.92	19.98	19.95		
		glicina (básica)	0.0424	0.21266
14.42	14.51	14.465	0.0636	0.43995

Variación establecida para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en la proteína de soya

Para el análisis de la Concentración Relativa debemos considerar el efecto sinérgico que se da entre los errores intrínsecos de la metodología y los que representan la manipulación por el analista (cuando no se cuenta con un sistema automatizado) al realizar las soluciones y diluciones correspondientes (si es el caso). Además si el software no determina de manera directa la concentración con respecto de los estándares de peso molecular utilizados es muy probable que se obtengan valores de SD y % CV mayores como se ve en la tabla siguiente:

Carril 2	Carril 3			
Conc. Rel. (mg/ml)	Conc. Rel. (mg/ml)	Conc. Rel. promedio (mg/ml)	SD	% CV
0.1470	0.1417	0.1443	0.0037	2.5712
0.2205	0.2782	0.2493	0.0408	16.375
0.2782	0.3465	0.3123	0.0482	15.449
0.2625	0.2782	0.2703	0.0111	4.1190
0.2940	0.2677	0.2808	0.0185	6.6084
1.1812	1.0815	1.1313	0.0705	6.2343
1.8742	1.7955	1.8348	0.0556	3.0347
0.9870	1.0605	1.0237	0.0519	5.0766

Variación establecida para la Concentración Rel. de las fracciones proteica caracterizadas en la proteína ed soya.

Proteínas de suero

Se lograron resolver 9 marcas para los carriles 4 y 5 que contienen a la muestra 2, sus pesos moleculares oscilan entre 14 y 90 kDa. La fracción más abundante es aquella con PM aproximado de 19 kDa con un 44% mientras que la de menor abundancia fue la de PM de 50 kDa con tan sólo 1.5%.

PM (kDa) (4)	PM (kDa) (5)	% Total (4)	% Total (5)	Concentración Rel. (mg/ml) (4)	Concentración Rel. (mg/ml) (5)
88.25	90.45	4.8	5.0	0.2520	0.2625
73.16	73.81	4.3	4.1	0.2257	0.2152
59.01	58.73	6.5	5.7	0.3412	0.2992
49.93	49.43	1.3	1.6	0.0682	0.0840
39.84	39.49	7.1	6.2	0.3727	0.3255
35.11	33.75	2.6	4.8	0.1365	0.2520
30.24	30.02	8.2	6.8	0.4305	0.3570
19.34	19.26	43.7	44.4	2.2942	2.3310
14.27	14.29	21.5	21.4	1.1287	1.1235

Marcas resueltas (presentadas en orden descendente) del primer gel, carriles 4 y 5 respectivamente de la proteína de suero

Reproducibilidad

Para esta muestra tenemos dos valores de % CV por encima de 1 y sólo uno de SD mayor a 1, lo que representa una buena aproximación al peso molecular de las fracciones obtenidas del análisis de esta muestra.

Como no se trata de una muestra 100% pura se puede decir que se tienen más fracciones que las correspondientes a las fracciones proteicas lácteas como puede ser el mismo sabor a vainilla que reporta el fabricante de este producto entre otras sustancias desconocidas. Esto podría explicar la falta de resolución alrededor de los 19.5 kDa por una excesiva concentración de fracciones proteicas en esa región. Sin embargo podemos destacar la inequívoca presencia de las tres principales fracciones que componen al suero de la leche: α -lacto albúmina con PM 14 kDa, β -lactoglobulina con PM 18 KDa y BSA con PM de 70 kDa.

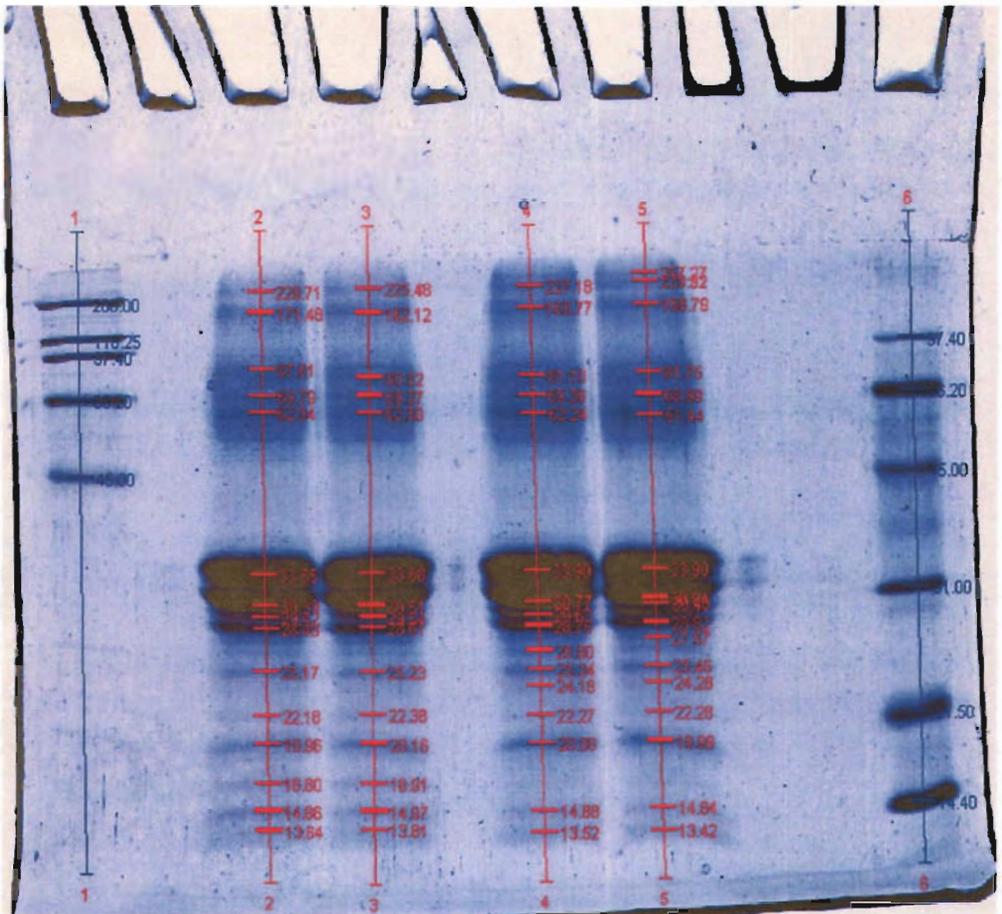
Carril 4	Carril 5			
Tamaño kDa	Tamaño kDa	Tamaño promedio	SD	% CV
88.25	90.45	89.35	1.5556	1.7410
73.16	73.81	73.485		
		BSA	0.4596	0.6254
59.01	58.73	58.87	0.1979	0.3363
49.93	49.43	49.68	0.3535	0.7116
39.84	39.49	39.665	0.2474	0.6239
35.11	33.75	34.43	0.9616	2.7931
30.24	30.02	30.13	0.1555	0.5163
19.34	19.26	19.3		
		β -lacto globulina	0.0565	0.2931
14.27	14.29	14.28		
		α -lacto albúmina	0.0141	0.0990

Variación establecida para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en la proteína de suero

Aunque las demás fracciones proteicas se presentan es importante destacar que no lo hacen en elevadas concentraciones, todas menores a 0.5 (mg/ml); con excepción de lo que parecen ser las fracciones identificadas como α -lacto albúmina y β -lactoglobulina cuya concentración sobrepasa la unidad. Aunque los valores de SD parecieran ser buenos el % CV nos muestra la variabilidad que se da en los parámetros evaluados, es decir si observamos con atención la fila resaltada podemos observar una diferencia significativa entre los valores de concentración relativa de la misma fracción, pero en carriles diferentes. Este error al ser analizado viene de la selección de las marcas para el análisis molecular por el densitómetro de masas. Algo que ya se había comentado al no contar con un sistema automatizado para realizar este análisis.

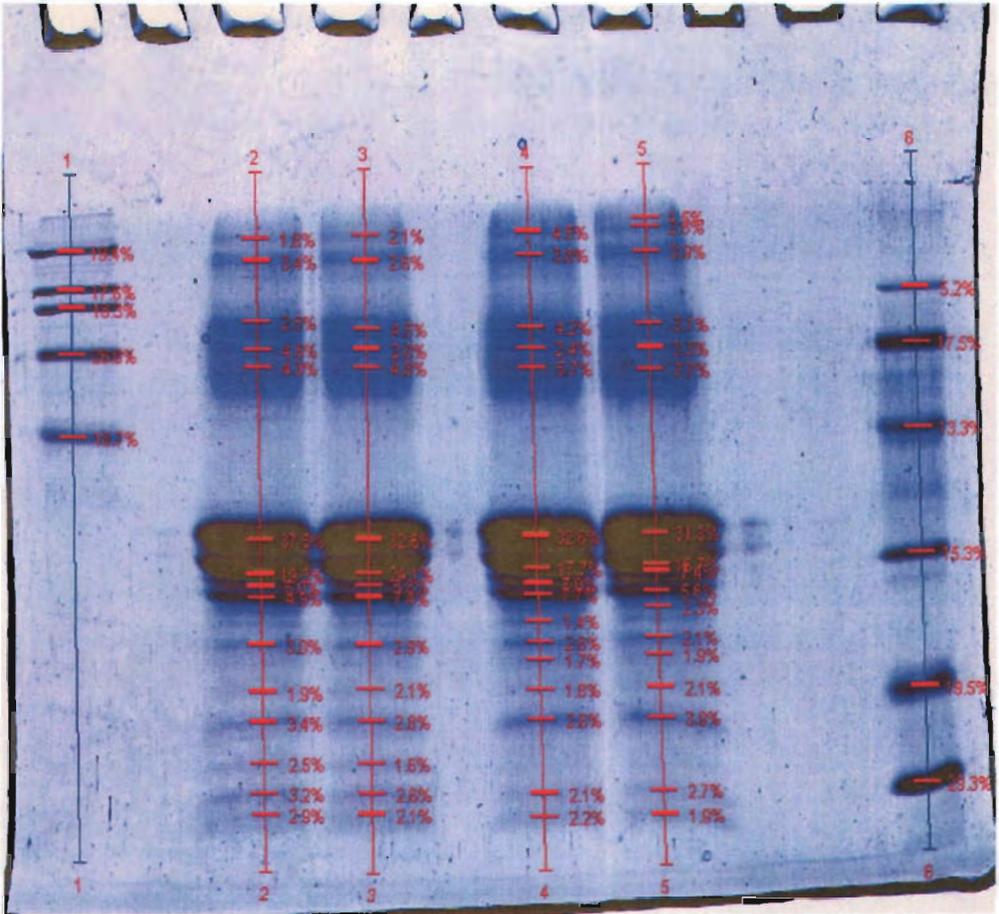
Carril 4	Carril 5			
Conc. Rel. (mg/ml)	Conc. Rel. (mg/ml)	Conc. Rel. promedio (mg/ml)	SD	% CV
0.2520	0.2625	0.2572	0.0074	2.8861
0.2257	0.2152	0.2205	0.0074	3.3671
0.3412	0.2992	0.3202	0.0296	9.2735
0.0682	0.0840	0.0761	0.0111	14.629
0.3727	0.3255	0.3491	0.0334	9.5698
0.1365	0.2520	0.1942	0.0816	42.044
0.4305	0.3570	0.3937	0.0519	13.199
2.2942	2.3310	2.3126	0.0259	1.1236
1.1287	1.1235	1.1261	0.0037	0.3296

Variación establecida para Concentración Rel. de las fracciones proteica caracterizadas en la proteína de suero



MAPM Cas H Cas H' Cas S Cas S' MBPM

Electroferograma 3. Muestra los PM (dados en kDa) de las bandas resultadas de las fracciones proteicas contenidas en las muestras; mezclas de caseinas marca Hammerstein y Sigma.



MAPM Cas H Cas H' Cas S Cas S' MBPM

Electroferograma 4. Muestra el % parcial que aporta cada banda resuelta en las fracciones proteicas contenidas en las muestras: mezclas de caseína marca Hammerstein y Sigma.

Mezcla de caseínas marca Hammerstein

Las caseínas son un buen ejemplo de las sorpresas que se puede llevar uno en el análisis de muestras. Simplemente del análisis visual entre los geles existe una diferencia significativa (como lo es una banda extra resuelta para la mezcla de caseínas de la marca Sigma), siendo que ambas deberían ser una mezcla de las diferentes subunidades que componen a esta fracción insoluble en la leche a pH 4.6. Por lo que cabe aclarar que aunque se trate del mismo producto el hecho de ser producido por otra compañía no garantiza la igualdad de sus características. Por otro lado es claro que no sólo hay caseínas sino fracciones del suero de leche claramente identificadas. Por lo que la pureza de este producto es discutible.

Se lograron resolver 15 marcas para los carriles 2 y 3 del segundo gel que contienen a la muestra 4, sus pesos moleculares oscilan entre 13 y 230 kDa. La fracción más abundante es aquella con PM aproximado de 33.55 kDa con un 37% mientras que la de menor abundancia fue la de PM de 230 kDa con tan sólo 1.8%.

PM (kDa) (2)	PM (kDa) (3)	% Total (2)	% Total (3)	Concentración Rel. (mg/ml) (2)	Concentración Rel.(mg/ml) (3)
229.7	225.4	1.80	2.10	0.0786	0.0917
171.4	162.1	3.40	2.60	0.1485	0.1136
87.61	80.82	2.50	4.50	0.1092	0.1966
69.79	69.37	4.60	2.00	0.2010	0.0874
62.94	62.50	4.00	4.80	0.1748	0.2097
33.55	33.68	37.5	32.6	1.6387	1.4246
30.39	30.51	19.3	24.1	0.8434	1.0531
29.42	29.54	5.00	5.80	0.2185	0.2534
28.48	28.61	4.90	7.40	0.2141	0.3233
25.17	25.23	3.00	2.90	0.1311	0.1267
22.18	22.38	1.90	2.10	0.0830	0.0917
19.96	20.16	3.40	2.80	0.1485	0.1223
16.80	16.91	2.50	1.60	0.1092	0.0699
14.86	14.97	3.20	2.60	0.1398	0.1136
13.64	13.81	2.90	2.10	0.1267	0.0917

Marcas resueltas (presentadas en orden descendente) del primer gel, carriles 2 y 3 respectivamente de la mezcla de caseínas Hammerstein

Reproducibilidad

En este caso se pueden identificar un mayor número de fracciones provenientes de la leche, aunque no se descarta el uso de excipientes u otras sustancias de origen no proteico como pueden ser glicósidos según lo arrojó el análisis proteico. El resultado no esperado es que existen proteínas de suero claramente identificadas por sus PM, específicamente la BSA y la α -lacto albúmina. Igualmente existen muchas fracciones no identificadas. Los valores de SD son casi todos menores a la unidad igual que el % CV.

Carril 2	Carril 3			
Tamaño	Tamaño	Tamaño promedio	SD	% CV
kDa	kDa			
229.71	225.48	227.59	2.9910	1.3142
171.48	162.12	166.80	6.6185	3.9679
87.610	80.820	84.215	4.8012	5.7011
69.790	69.370	69.580	0.2969	0.4268
		BSA		
62.940	62.500	62.720	0.3111	0.4960
33.550	33.680	33.615	0.0919	0.2734
30.390	30.510	30.450	0.0848	0.2786
29.420	29.540	29.480	0.0848	0.2878
28.480	28.610	28.545	0.0919	0.3220
25.170	25.230	25.200	0.0424	0.1683
		α s2 caseína		

22.180	22.380	22.280	0.1414	0.6347
α s1 caseína				
19.960	20.160	20.060	0.1414	0.7049
κ-caseína				
16.800	16.910	16.855	0.0777	0.4614
14.860	14.970	14.915	0.0777	0.5215
α-lacto albúmina				
13.640	13.810	13.725	0.1202	0.8758

Variación establecida para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en la mezcla de caseínas Hammerstein

Un hecho para notar es la concentración en que se presentan las fracciones de suero lácteo; y habla de la sensibilidad de la metodología para caracterizar y cuantificar a las fracciones proteicas.

Existe una fracción (alrededor de 33kDa) no identificada que corresponde a la fracción de máxima concentración. Cabe resaltar que la mayoría de las caseínas teóricamente deberían encontrarse por debajo de los 25kDa y existen muchas fracciones no identificadas en ambas mezclas.

Carril 2		Carril 3					
Conc.	Rel.	Conc.	Rel.	Conc.	Rel.	promedio SD	% CV
(mg/ml)		(mg/ml)		(mg/ml)			
0.0786		0.0917		0.0852		0.0092	10.8785
0.1485		0.1136		0.1311		0.0247	18.8561
0.1092		0.1966		0.1529		0.0618	40.4061
0.2010		0.0874		0.1442		0.0803	55.7114
0.1748		0.2097		0.1922		0.0247	12.8564
1.6387		1.4246		1.5316		0.1514	9.88537
0.8434		1.0531		0.9482		0.1483	15.6410
0.2185		0.2534		0.2359		0.0247	10.4756
0.2141		0.3233		0.2687		0.0772	28.7441
0.1311		0.1267		0.1289		0.0030	2.39697
0.0830		0.0917		0.0874		0.0061	7.07106
0.1485		0.1223		0.1354		0.0185	13.6859
0.1092		0.0699		0.0895		0.0278	31.0437
0.1398		0.1136		0.1267		0.0185	14.6297
0.1267		0.0917		0.1092		0.0247	22.6274

Variación establecida para Concentración Rel. de las fracciones proteica caracterizadas en la mezcla de caseínas Hammerstein

Mezcla de Caseínas marca Sigma

En esta muestra se lograron resolver 16 y 17 marcas, en los carriles 4 y 5 del segundo gel

respectivamente que contienen a esta muestra, sus pesos moleculares oscilan entre 13 y 258 kDa. Algo para destacar es la presencia de una banda de más en el carril 5 alrededor de los 30 kDa. (Ver tabla y electroferograma 3 carriles 4 y 5). La fracción más abundante es aquella con PM aproximado de 33.90 kDa con un 33% mientras que la de menor abundancia fue la de PM de 258 kDa con tan sólo 1.5%.

PM (kDa) (4)	PM (kDa) (5)	% Total (4)	% Total (5)	Concentración Rel. (mg/ml) (4)	Concentración Rel. (mg/ml) (5)
227.18	257.27	4.50	1.50	0.1890	0.063
168.77	229.92	3.80	2.60	0.1596	0.1092
81.100	168.79	4.20	3.90	0.1764	0.1638
69.360	81.750	2.40	3.10	0.1008	0.1302
62.240	68.990	5.70	3.30	0.2394	0.1386
33.900	61.440	32.60	7.70	1.3692	0.3234
30.770	33.900	17.7	31.3	0.7434	1.3146
29.620	30.940	7.00	16.7	0.2940	0.7014
28.760	30.400	7.70	7.40	0.3234	0.3108
26.800	28.820	1.40	5.60	0.0588	0.2352
25.340	27.570	2.60	2.30	0.1092	0.0966
24.180	25.460	1.70	2.10	0.0714	0.0882
22.270	24.280	1.80	1.90	0.0756	0.0798
20.080	22.280	2.60	2.10	0.1092	0.0882
14.880	19.990	2.10	3.90	0.0882	0.1638

13.520	14.840	2.20	2.70	0.0924	0.1134
	13.420		1.90		0.0798

Marcas resueltas (presentadas en orden descendente) del segundo gel, carriles 4 y 5 respectivamente de la mezcla de caseínas Sigma

Reproducibilidad

En esta muestra se tienen valores de SD en su mayoría por debajo de la unidad. Igualmente sucede con los % CV. Se tiene buena reproducibilidad de esta metodología para esta muestra. Se logran identificar fracciones del suero de la leche (BSA y α lacto albúmina) y destaca la presencia de la β caseína; presente en esta muestra analizada.

En ambas muestras 4 y 5 no se presentan ni la α s0 ni la γ caseína aunque la literatura las menciona como micro variantes de la α s1 y de la β caseína respectivamente

Carril 4	Carril 5			
Tamaño kDa	Tamaño kDa	Tamaño promedio	SD	% CV
227.18	229.92	228.55	1.9374	0.8477
168.77	168.79	168.78	0.0141	0.0083
81.100	81.750	81.425	0.4596	0.5644
69.360	68.990	69.175	0.2616	0.3782
		BSA		
62.240	61.440	61.840	0.5656	0.9147
33.900	33.900	33.900	0	0
30.770	30.940	30.855	0.1202	0.3895

29.620	30.400	30.010	0.5515	1.8378
28.760	28.820	28.790	0.0424	0.1473
26.800	27.570	27.185	0.5444	2.0028
25.340	25.460	25.400	0.0848	0.3340
		α s2 caseína		
24.180	24.280	24.230	0.0707	0.2918
		β caseína		
22.270	22.280	22.275	0.0070	0.0317
		α s1 caseína		
20.080	19.990	20.035	0.0636	0.3176
		κ-caseína		
14.880	14.840	14.860	0.0282	0.1903
		α-lacto albúmina		
13.520	13.420	13.470	0.0707	0.5249

Variación establecida para el tamaño de las fracciones proteicas caracterizadas en la mezcla de caseínas Sigma

La reproducibilidad de la concentración relativa, aunque presenta valores de SD por debajo de la unidad no resulta confiable (debido a que sólo se realizó la corrida por duplicado, como se ya se mencionó) y esto se ve reflejado en el % CV donde sólo 7 valores son menores del 20 %. La muestra que se presenta en mayor concentración es la de PM 31 kDa, alrededor de 1mg/ml, igual que en la muestra 4. Es muy posible que esta fracción no se haya disgregado correctamente en sus fracciones correspondientes. Las modificaciones post-traduccionales son una realidad, en estas muestras; un buen ejemplo es la fosforilación y la glicosilación,

entre otras. Algunos autores mencionan que el estudio de las proteínas de leche por SDS-PAGE, PAGE con urea alcalina y PAGE con urea ácida no permite una clara identificación de las subunidades de las caseínas (Pardo et al 2001). En el caso de los hidrolizados de proteína sólo los péptidos de gran tamaño pueden ser visualizados adecuadamente por estas técnicas.

Carril 4		Carril 5				
Conc.	Rel.	Conc.	Rel.	Conc.	Rel.	promedio SD % CV
(mg/ml)		(mg/ml)		(mg/ml)		
0.1890		0.0630		0.1260		0.0890 70.7106
0.1596		0.1092		0.1344		0.0356 26.5165
0.1764		0.1638		0.1701		0.0089 5.23782
0.1008		0.1302		0.1155		0.0207 17.9990
0.2394		0.1386		0.1890		0.0712 37.7123
1.3692		0.3234		0.8463		0.7394 87.3794
0.7434		1.3146		1.0290		0.4038 39.2516
0.2940		0.7014		0.4977		0.2880 57.8813
0.3234		0.3108		0.3171		0.0089 2.80969
0.0588		0.2352		0.1470		0.1247 84.8528
0.1092		0.0966		0.1029		0.0089 8.65845
0.0714		0.0882		0.0798		0.0118 14.8864
0.0756		0.0798		0.0777		0.0029 3.82219
0.1092		0.0882		0.0987		0.0148 15.0448
0.0882		0.1638		0.1260		0.0534 42.4264

0.0924	0.1134	0.1029	0.0148	14.4307
--------	--------	--------	--------	---------

Variación establecida para Concentración Rel. de las fracciones proteicas caracterizadas en la mezcla de caseínas Sigma

3. Implementación de la técnica de determinación de las fracciones proteicas por EC

En la actualidad, la electroforesis capilar se ha convertido en una técnica analítica con muchas aplicaciones en el estudio de proteínas y péptidos en alimentos.

Se implementó el método de separación de las proteínas de la leche y determinación de la adulteración descrito en la Norma Oficial Mexicana-NOM-155-SCFI-2002-Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado - denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos de proteínas lácteas y leche pasteurizada. Las muestras utilizadas fueron proteína de suero lácteo y mezclas de caseínas marca Hammerstein y Sigma.

La electroforesis se realizó con equipo Beckman Coulter modelo P/ACE Systems MDQ y detector UV simple, con un capilar de recubrimiento neutro (50 cm x 50 µm), a 35C y 21 Kv por 50 minutos para cada muestra.

a) Mezclas de Caseínas

Las condiciones establecidas en la técnica para el corrimiento resultan ser las adecuadas para obtener muy buena separación de todas las fracciones de las caseínas, para ambas mezclas. El descenso del pH promueve una diferencia de carga entre las alfa y las beta caseínas lo que, aunado a su diferencia de tamaño, favorece la separación que se observa entre éstas en el

electroferograma. La viscosidad del buffer se relaciona al tiempo de migración de los solutos porque afecta la velocidad del fluido el capilar, de acuerdo con la ecuación de Hagen-Poiseuille (Millares et al, 2001). La codificación que se presenta en los siguientes electroferogramas corresponde a las diferentes fracciones de las caseínas (CN) α , β y un complejo remanente entre κ y β que componen a las mezclas de caseínas. Es de mencionarse que las absorbancias de los picos de mayor altura no tienen correspondencia entre sí (es decir una se presenta a 0.018 uA y la otra a 0.022uA), esto resulta lógico si consideramos que al preparar el vial con la mezcla de caseínas Hammerstein existía mayor masa (referirse a los datos de las pesadas en la metodología); esto es una prueba de la sensibilidad que nos otorga el detector UV-VIS del modelo PACE de Beckman.

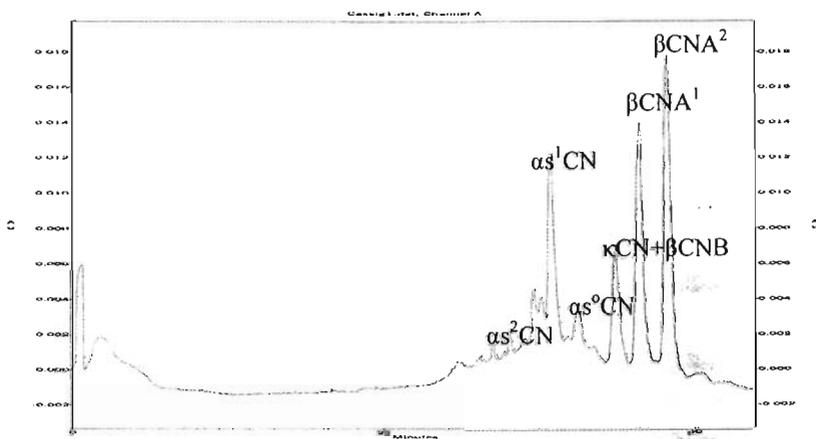


Fig. 18 Caseína Sigma

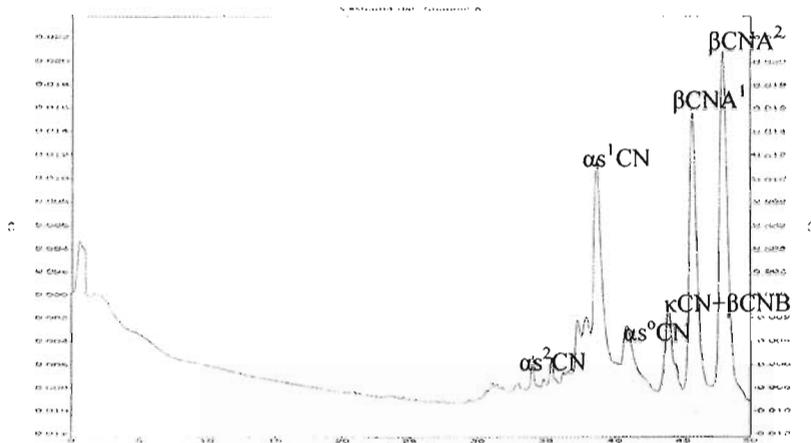


Fig. 19 Caseína Hammarsten.

Se observan seis picos prominentes que se describen como las fracciones proteicas que constituyen a las subunidades diversas de las alfas y betas caseínas (Millares et al 2001). Además se observan restos de lo que pudieron ser proteínas de suero a tiempos más cortos de elusión. Ambas mezclas presentan una muy buena resolución por lo que es indistinto utilizar cualquiera de éstos como patrón de referencia.

La técnica de electroforesis capilar, a diferencia de la electroforesis en gel, permite cuantificar directamente cada tipo de caseína; es decir las señales que registra el instrumento, lo que se presenta en la tabla 2 como uA. Esto nos permite eliminar otras fuentes de error además de gozar de las ventajas de la automatización. Debe hacerse notar que deben optimizarse los tiempos de corrida para asegurar la aparición de todos los picos, por lo que no

queda completa la cuantificación de todas las formas de caseína. La expresión presentada es únicamente el área bajo la curva y falta correlacionar con un estándar.

Tabla 2

Fracción observada	Área
β CNA ²	-----
β CNA ¹	1102840
κ CN+ β CNB	334841
α s ⁰ CN	145150
α s ¹ CN	791951
α s ² CN	147758

Valores establecidos únicamente para estándar de Caseína Hammerstein

b) Proteína de suero lácteo bovino

El perfil obtenido para el estándar de las proteínas de suero lácteo no fue bueno, probablemente debido a su alta sensibilidad a la desnaturalización por calor. Los electroferogramas muestran picos anchos característicos de β -Lg desnaturalizada, probablemente debido a su lactosilación (Otte et al 1998) o a otros procesos (pasteurización y descremado) como podría ser el mismo desengrasado por centrifugación debido a que su mecanismo de estabilidad es por hidratación y no por carga eléctrica, su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reducen el potencial de óxido-reducción, lo que puede llegar a inhibir parcialmente las reacciones de oxidación. Otra causa probable de la falta de resolución en la señal obtenida podría ser la concentración en que se trabajaron ya que si observamos con atención la máxima señal de respuesta se da a las 0.006 uA y en cambio al eluir las fracciones contenidas en la leche fluida la máxima respuesta registrada es de 0.002; es ahí donde podemos distinguir de entra las fracciones del suero lácteo.

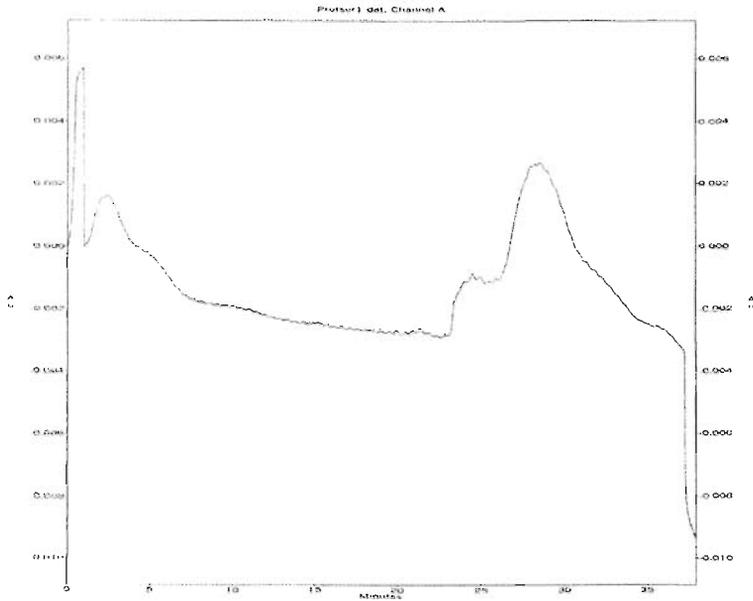


Figura 20. Proteína de suero lácteo bovino

3) Muestra de leche comercial

El patrón electroforético puede alterarse por el daño térmico que presentan las proteínas.

La muestra comercial que podría presentar menor daño por desnaturalización térmica era la muestra de leche pasteurizada, por lo que se seleccionó para trabajar inicialmente.

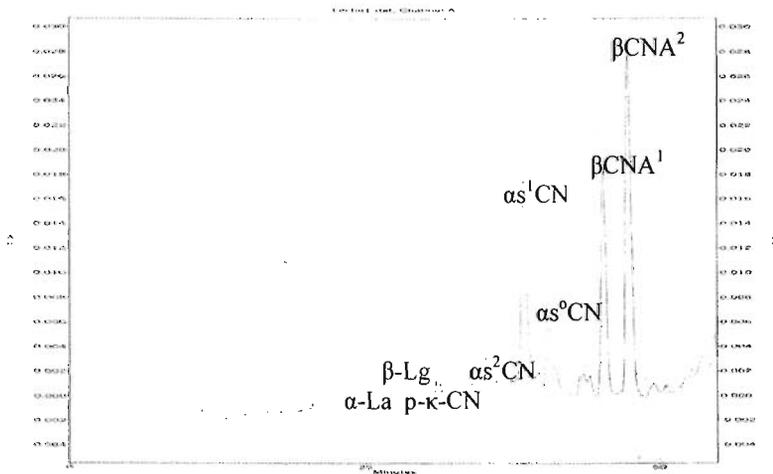


Figura 21. Muestra de leche pasteurizada

Se pueden observar picos anchos, sobre todo en el sector de las proteínas de suero lácteo, pero los picos correspondientes a la caseína se definen tan bien como los patrones comerciales.

Al sobreponer el estándar de Caseína de Sigma con la muestra de leche pasteurizada tenemos una correspondencia casi total, con excepción del complejo formado entre la κCN y la βCNB y las proteínas de suero $\alpha\text{-La}$ y la $\beta\text{-Lg}$ presentes en la muestra de leche comercial aunque no se descarta su contenido en mínimas cantidades en ambas mezclas de Caseínas.

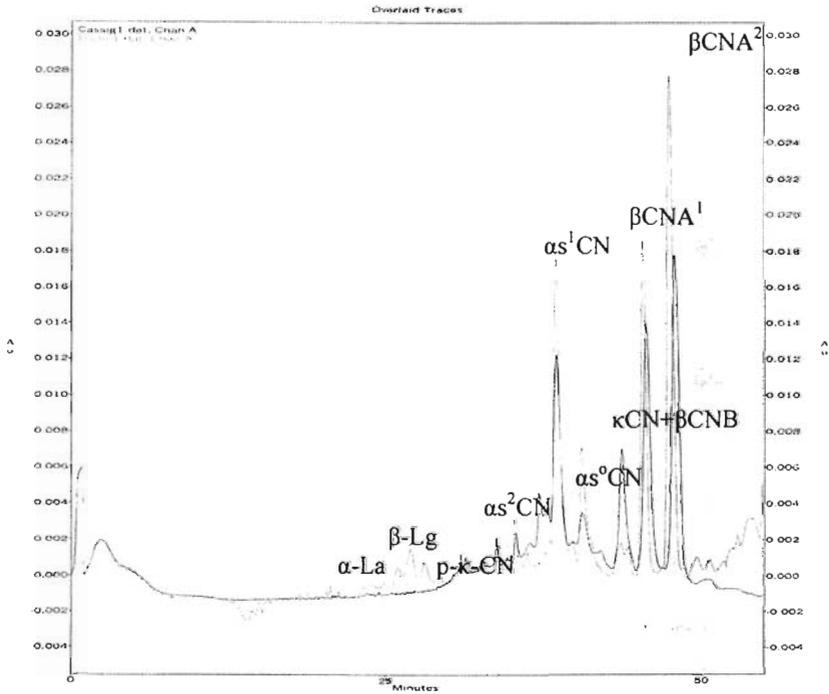


Figura 22. Caseína sigma y muestra de leche pasteurizada.

Esto podría deberse a la variabilidad de factores inherentes de los proveedores, los tipos de razas y alimentación de los animales, así como diversos factores ambientales como son la estación del año en el tiempo de ordeña, característicos de cada región.

Reproducibilidad y límite de detección

En la determinación de proteínas lácteas por electroforesis en zona capilar (CZE) se han estudiado de manera fructífera las diversas variables que podrían afectar el ensayo como son: la absorción del soluto en la pared del capilar, así como los efectos del pH, fuerza iónica del buffer y de aditivos poliméricos en combinación con capilares con cubiertas hidrofílicas (Jong et al 1993). Con la electroforesis de zona capilar (CZE), se han obtenido platos teóricos en el rango de 300 000-700 000. Los resultados pueden compararse con aquellos alcanzados con HPLC de fase reversa. (Referirse en las aplicaciones de la electroforesis capilar a la tabla de los principales métodos electroforéticos capilares)

4. Análisis de muestras por electroforesis en microchip

Las muestras alimenticias analizadas en el LC-90 de Caliperls fueron:

- Proteína de soya.
- Proteína de suero.
- Leche en polvo.
- Mezcla de caseínas Hammerstein
- Mezcla de caseínas Sigma.
- Preparación alimenticia adicionada con Caseinato de Sodio
- Caseína ácida
- Leche fluida

Las tres últimas muestras corresponden a matrices mas complejas que fueron sometidas al análisis con la finalidad de obtener sus perfiles electroforéticos y de demostrar el poder de

análisis y resolución del LabChip 90.

<i>Muestra</i>	<i>Identificación</i>	<i>Stock TRC</i> <i>[µg/ml]</i>	<i>Diluciones</i> <i>seriales</i>
Proteína de soya.	1	798.7	1:2, 1:4,...1:2048
Proteína de suero.	2	8134.919	1:2, 1:4,...1:2048
Leche en polvo Alpura.	3	6234.36	1:2, 1:4,...1:2048
Mezcla de caseínas Hammerstein	4	22550.8	1:2, 1:4,...1:2048
Mezcla de caseínas Sigma.	5	23898.2	1:2, 1:4,...1:2048
Preparación alimenticia adicionada con Caseinato de Sodio	KCa	9933.311	1:2, 1:4,...1:2048
Caseína ácida	CH	12635.56	1:2, 1:4,...1:2048
Leche fluida	Sample A	2122.05	1:8, 1:16,...1:2048

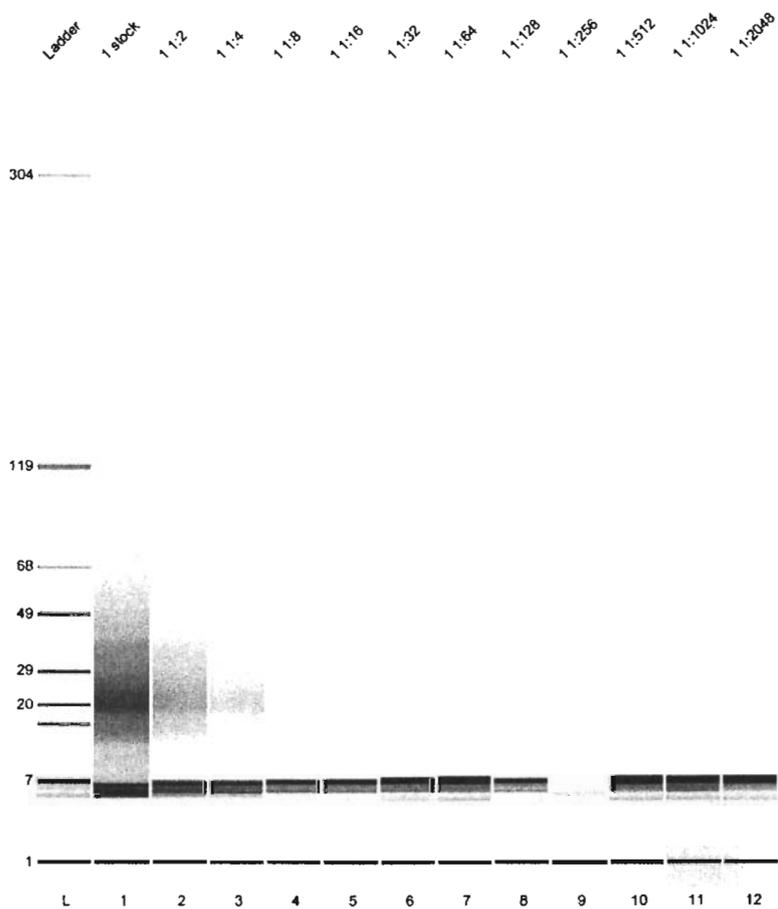
Identificación de muestras analizadas por electroforesis en chip con LC-90.

Se presentan los geles virtuales así como los electroferogramas (únicamente los electroferogramas de la proteína de soya que presentan concentraciones sensibles al instrumento) anexo a una tabla que presenta el número de picos identificados, el tiempo de migración del analito (dado en segundos), su tamaño dado en kDa, la concentración relativa a los marcadores de peso molecular de referencia del equipo en ng/ul, el % de pureza, la altura del pico y las áreas corregidas de éstos. Los primeros picos corresponden a los marcadores de peso molecular inyectado así como a la señal de SDS y son excluidos automáticamente por el sistema (system excluded).

En el apéndice se encuentran todos los electroferogramas y tablas resultantes del análisis de todas las muestras por el LabChip 90.

Assay: HT Protein Express 200
 Data Path: C:\LC 90\Customer data\Advance Instrument of Mexico

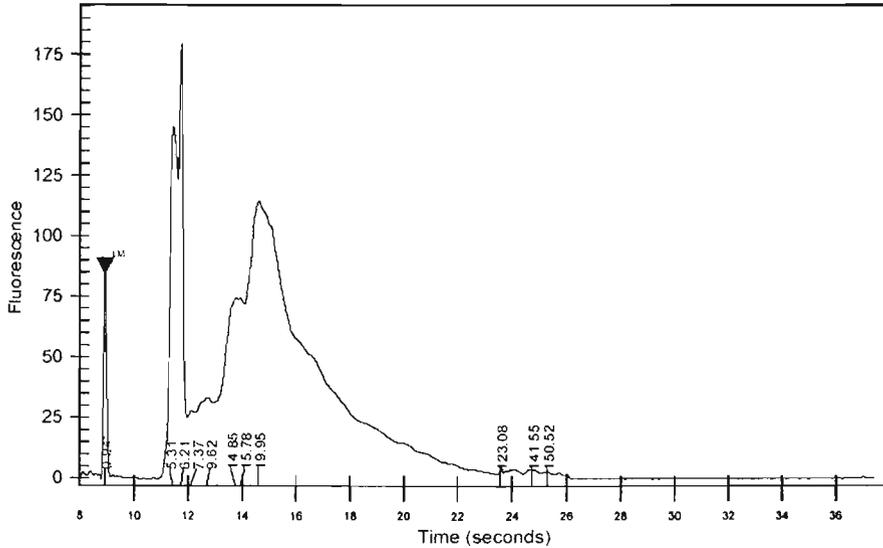
Read: 5/31/2005 4:06:34 PM (2.5.0 Build 171)
 Modified: 5/31/2005 5:18:19 PM (2.5.0 Build 171)



Assay: HT Protein Express 200
 Data Path: C:\LC 90\Customer data\Advance Instrument of Mexico

Read: 5/31/2005 4:06:34 PM (2.5.0 Build 171)
 Modified: 5/31/2005 5:18:19 PM (2.5.0 Build 171)

1 stock



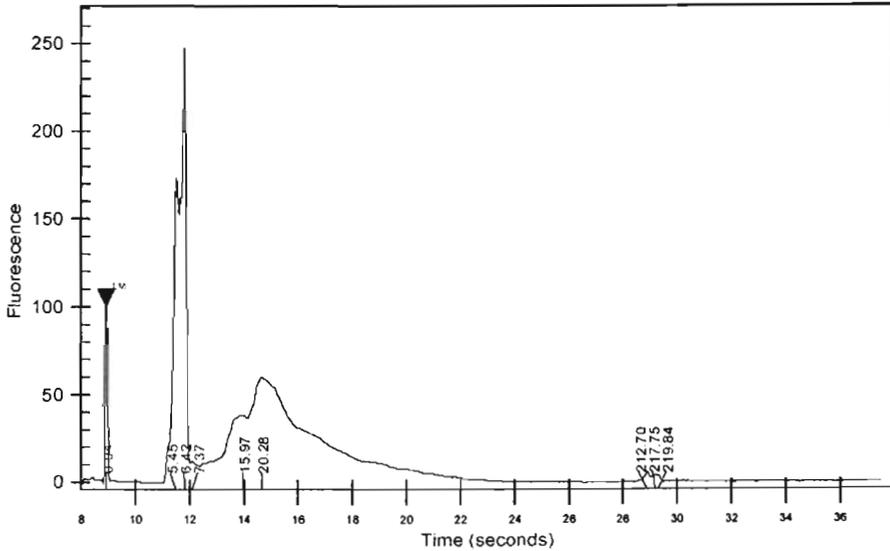
Total Rel Conc.: 798.7 µg/ml

Peak	Mig. Time (secs)	Size (kDa)	Rel. Conc. (ng/ul)	%Purity	Height	Corr. Area	Observations
1	8.1						
2	8.4						
3	8.9	0.9			87.3	4.7	Lower Marker
4	11.5	5.3			144.4	54.5	System Excluded
5	11.8	6.2			177.1	41.5	System Excluded
6	12.1	7.4			24.5	8.1	System Excluded
7	12.7	9.6			27.9	24.8	System Excluded
8	13.8	14.8	121.43	15.2	65.8	73.4	
9	13.9	15.8	42.73	5.3	65.2	25.8	
10	14.6	20.0	617.29	77.3	103.5	373.1	
11	23.6	123.1	2.10	0.3	2.8	1.3	
12	24.8	141.5	9.96	1.2	2.5	6.0	
13	25.3	150.5	5.19	0.7	2.3	3.1	

Assay: HT Protein Express 200
 Data Path: C:\LC 90\Customer data\Advance Instrument of Mexico

Reed: 5/31/2005 4:06:34 PM (2.5.0 Build 171)
 Modified: 5/31/2005 5:18:19 PM (2.5.0 Build 171)

1 1:2



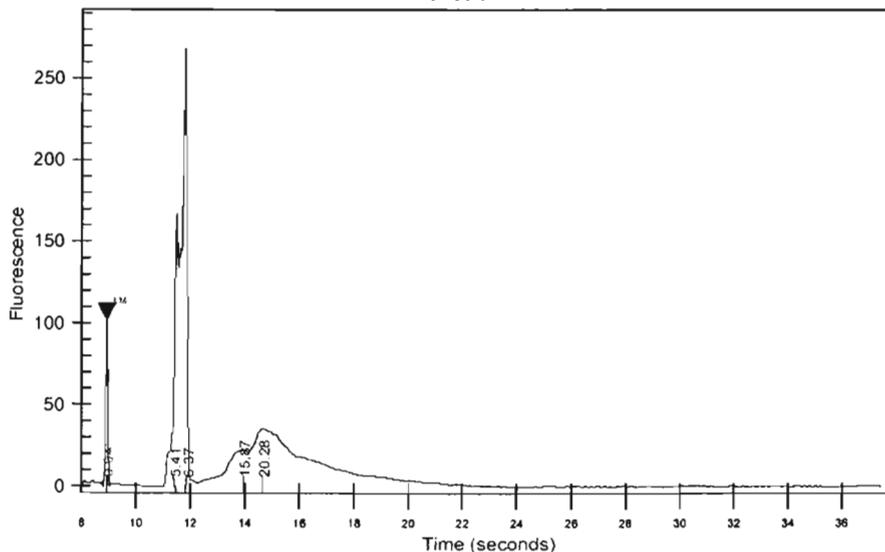
Total Rel Conc.: 284.08 µg/ml

Peak	Mig.Time (secs)	Size (kDa)	Rel.Conc. (ng/ul)	%Purity	Height	Corr.Area	Observations
1	8.1						
2	8.4						
3*	8.9	0.9			105.4	4.8	Lower Marker
4	11.5	5.5			173.0	51.2	System Excluded
5	11.8	6.4			247.9	68.6	System Excluded
6	12.1	7.4			10.3	4.3	System Excluded
7	14.0	16.0	104.58	36.8	33.4	65.2	
8	14.7	20.3	158.86	55.9	54.1	99.0	
9	28.9	212.7	10.74	3.8	6.1	6.7	
10	29.2	217.7	6.88	2.4	4.0	4.3	
11	29.3	219.8	3.02	1.1	3.8	1.9	

Assay: HT Protein Express 200
 Data Path: C:\LC 90\Customer data\Advance Instrument of Mexico

Read: 5/31/2005 4:06:34 PM (2.5.0 Build 171)
 Modified: 5/31/2005 5:18:19 PM (2.5.0 Build 171)

1 1:4



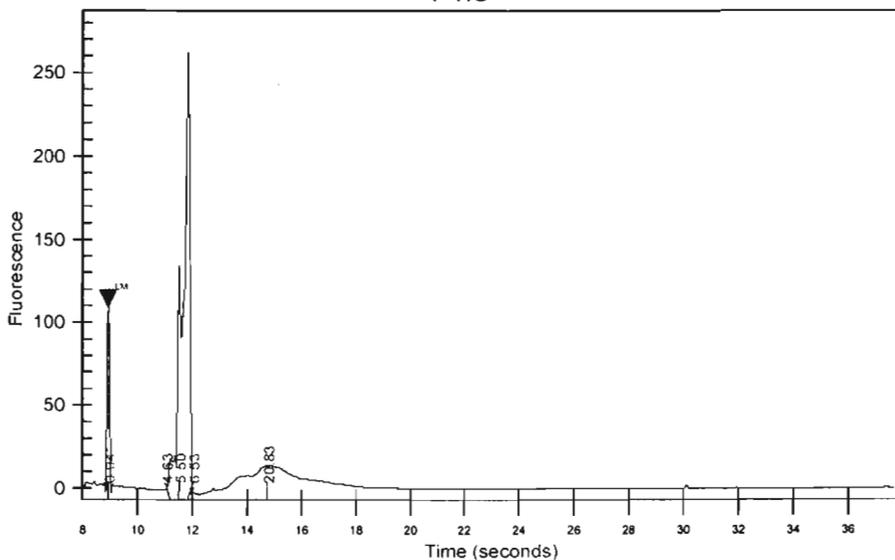
Total Rel Conc.: 78.1 µg/ml

Peak	Mig. Time (secs)	Size (kDa)	Rel. Conc. (ng/ul)	%Purity	Height	Corr. Area	Observations
1	8.1						
2	8.4						
3*	8.9	0.9			106.3	4.7	Lower Marker
4	11.5	5.4			166.9	39.1	System Excluded
5	11.8	6.4			266.0	57.0	System Excluded
6	14.0	15.9	31.95	40.9	14.1	19.6	
7	14.7	20.3	46.15	59.1	25.2	28.3	

Assay: HT Protein Express 200
 Data Path: C:\LC 901\Customer data\Advance Instrument of Mexico

Read: 5/31/2005 4:06:34 PM (2.5.0 Build 171)
 Modified: 5/31/2005 5:18:19 PM (2.5.0 Build 171)

1 1:8



Total Rel Conc.. 15.81 µg/ml

Peak	Mig. Time (secs)	Size (kDa)	Ref. Conc. (ng/ul)	%Purity	Height	Corr. Area	Observations
1	8.1						
2	8.4						
3	8.9	0.9			115.3	4.8	Lower Marker
4	11.2	4.6			18.1	2.7	System Excluded
5	11.5	5.5			134.2	22.7	System Excluded
6	11.9	6.5			261.7	72.3	System Excluded
7	14.8	20.8	15.81	100.0	7.1	10.1	

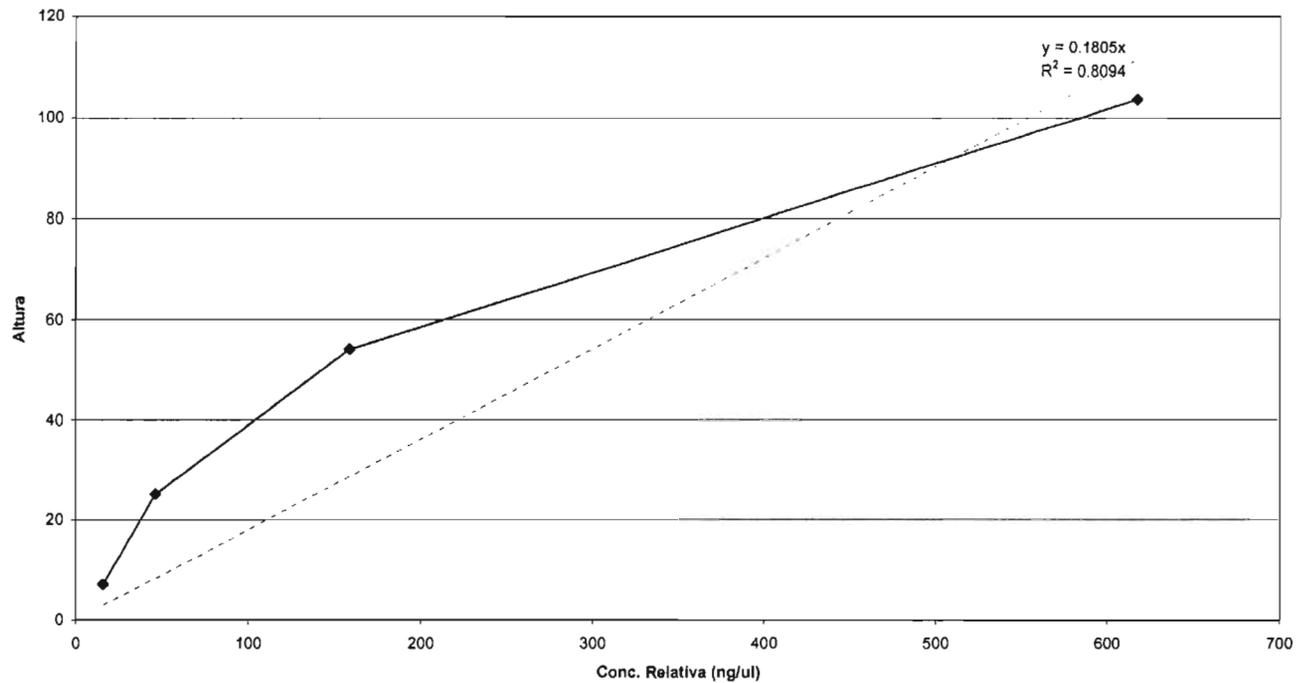
Elaboración de curvas de calibración

Para cada muestra se seleccionó (de los electroferogramas) la señal de mayor respuesta y con el mismo tiempo de migración (pueden existir variaciones de décimas de segundo en los tiempos de elusión que corresponde a una fracción proteica, esto debido a la diferencia que existe de las concentraciones totales relativas entre cada dilución). Con esa señal se elaboró una curva de calibración entre la Concentración Relativa (ng/ul) y la altura del pico, y la misma Concentración Relativa (ng/ul) y el área corregida. Esto con el objetivo de mostrar el rango dinámico lineal del instrumento para cada muestra analizada y la linealidad que se observa por la correlación entre la concentración relativa y el área corregida. Inequivoca señal del poder del detector de fluorescencia inducida por rayo laser con el que cuenta el LabChip 90. El fabricante garantiza un LDR entre 20-2000 ug/ml para las muestras analizadas en el equipo. Cabe resaltar que siempre que se manejen variables como el límite de detección y la sensibilidad real del instrumento cumpliendo con la **linealidad** en la respuesta, se debe contar con un análisis estadístico confiable. Aunque si se sale de ese rango lineal se podría tener una mayor sensibilidad pero con confiabilidad reducida porque se pierden los datos estadísticos que respalden ese valor.

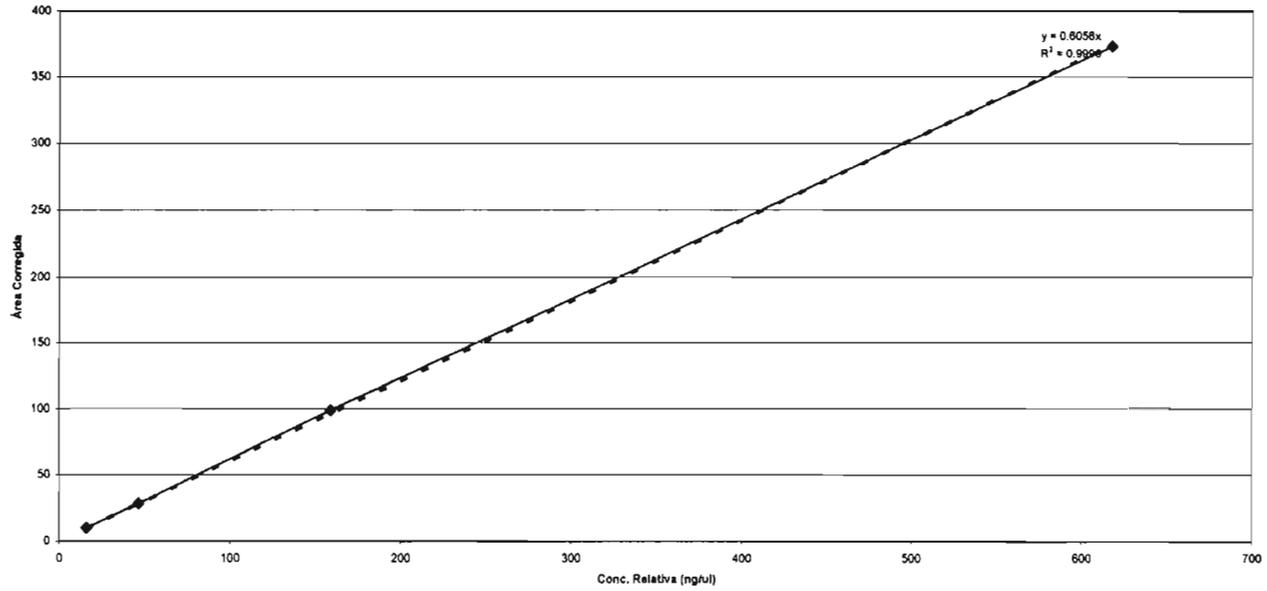
Dilución	Pico	Tiempo de migración [s]	Conc. Relativa (ng/ul)	Altura	Área correlativa
Stock	10	14.6	617.29	103.5	373.1
1:2	8	14.7	158.86	54.1	99.0
1:4	7	14.7	46.15	25.2	28.3
1:8	7	14.8	15.81	7.1	10.1
1:16					
1:32					
1:64					
1:128					
1:256					
1:512					

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la proteína de soya

Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (proteína de soya)



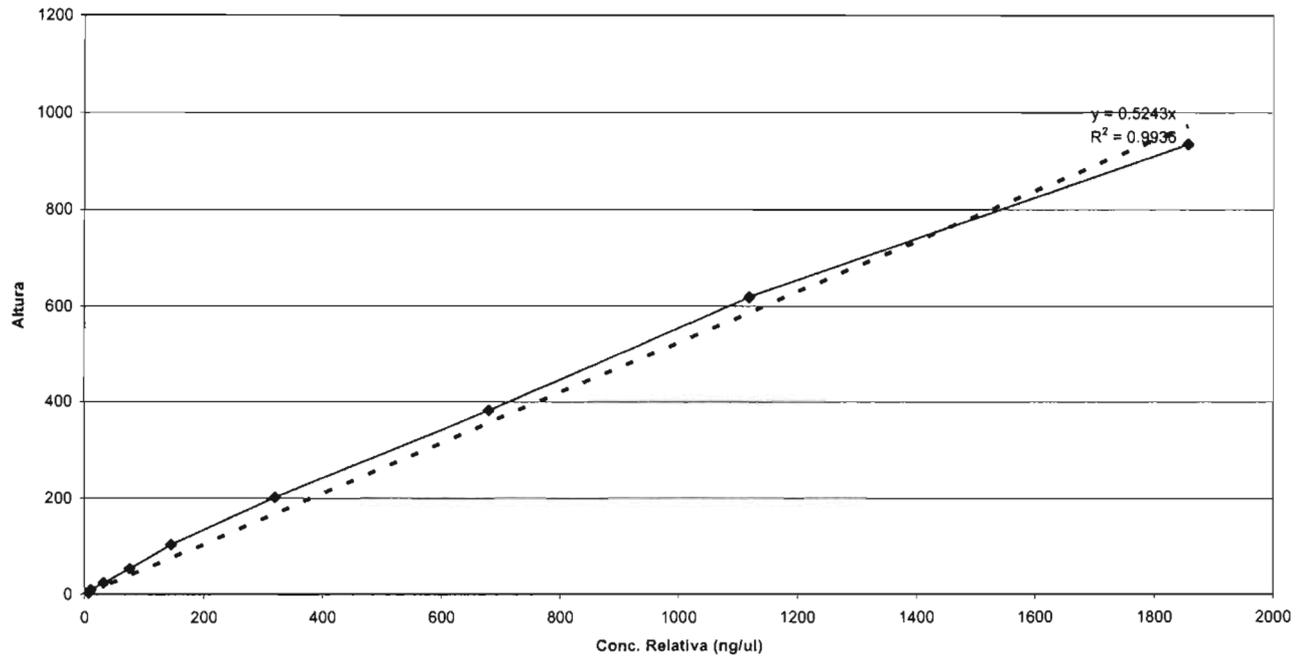
Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (proteína de soya)



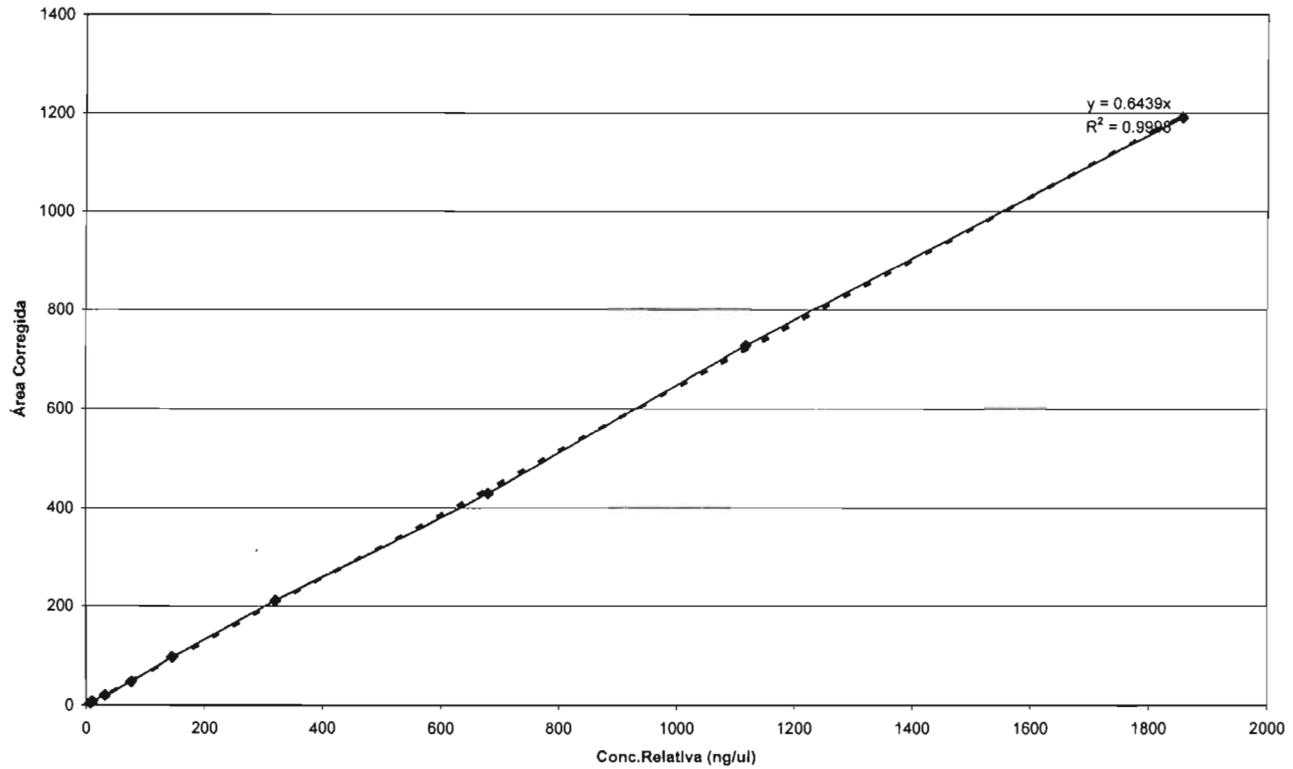
Dilución	Pico	Tiempo de migración [s]	Conc. Relativa (ng/ul)	Altura	Área correlativa
Stock	11	14.7	1856.42	935.3	1191.5
1:2	12	14.7	1117.87	618.7	729.1
1:4	14	14.7	680.07	382.5	429.6
1:8	14	14.7	320.24	202.4	211.2
1:16	14	14.7	145.32	104.9	98.0
1:32	13	14.7	76.00	54.5	48.7
1:64	14	14.7	31.51	24.6	21.3
1:128	12	14.7	10.12	9.5	7.7
1:256	8	14.6	6.61	4.0	4.8
1:512					

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la proteína de suero.

Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (proteína de suero)



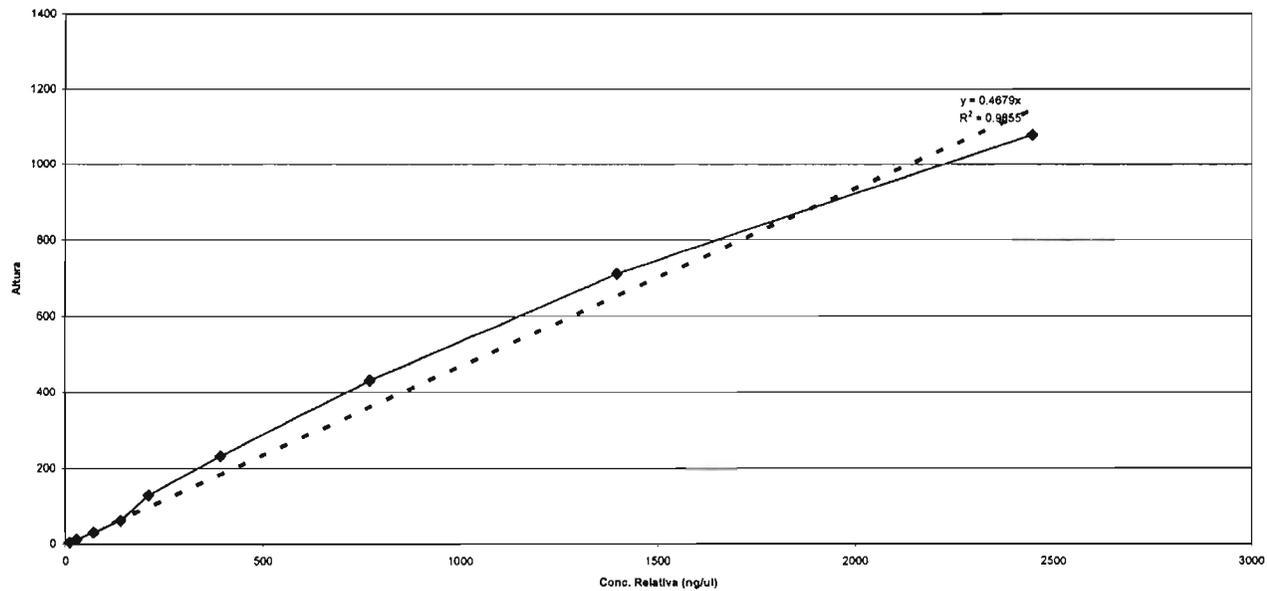
Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (proteína de suero)



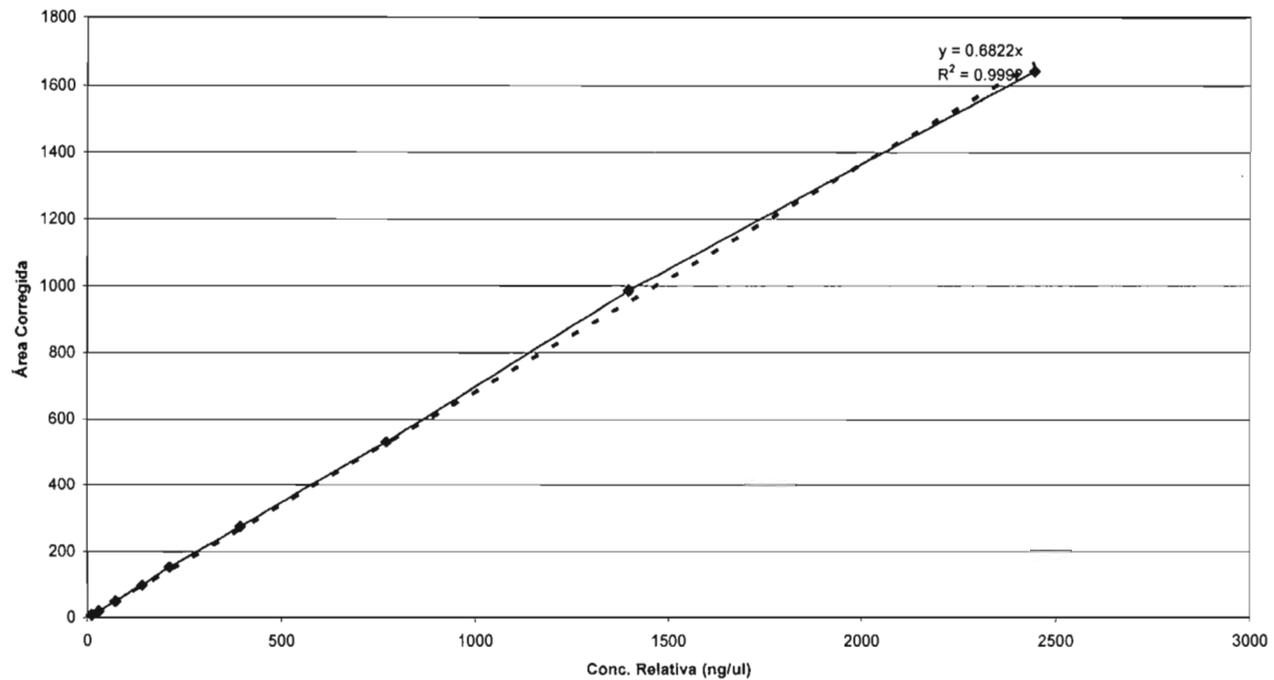
Dilución	Pico	Tiempo de migración [s]	Conc. Relativa (ng/ul)	Altura	Área correlativa
Stock	18	16.5	2445.12	1077.7	1644.1
1:2	18	16.5	1396.13	712.5	987.9
1:4	17	16.6	770.68	431.0	530.5
1:8	19	16.6	392.98	232.5	276.5
1:16	17	16.7	210.25	131.0	153.0
1:32	12	16.7	139.47	63.2	97.6
1:64	10	16.7	71.28	32.8	50.0
1:128	11	16.7	28.57	13.1	19.8
1:256	9	16.7	10.84	5.4	7.9
1:512					

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la leche en polvo.

Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (leche en polvo)



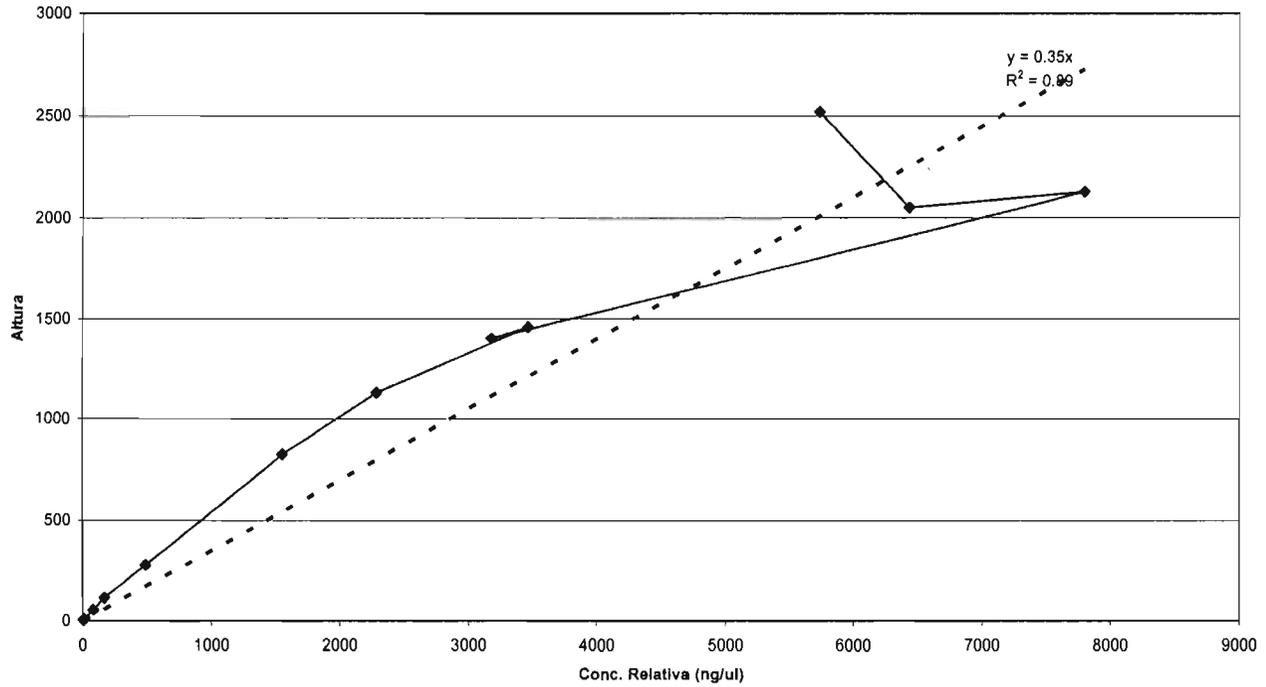
respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (leche en polvo)



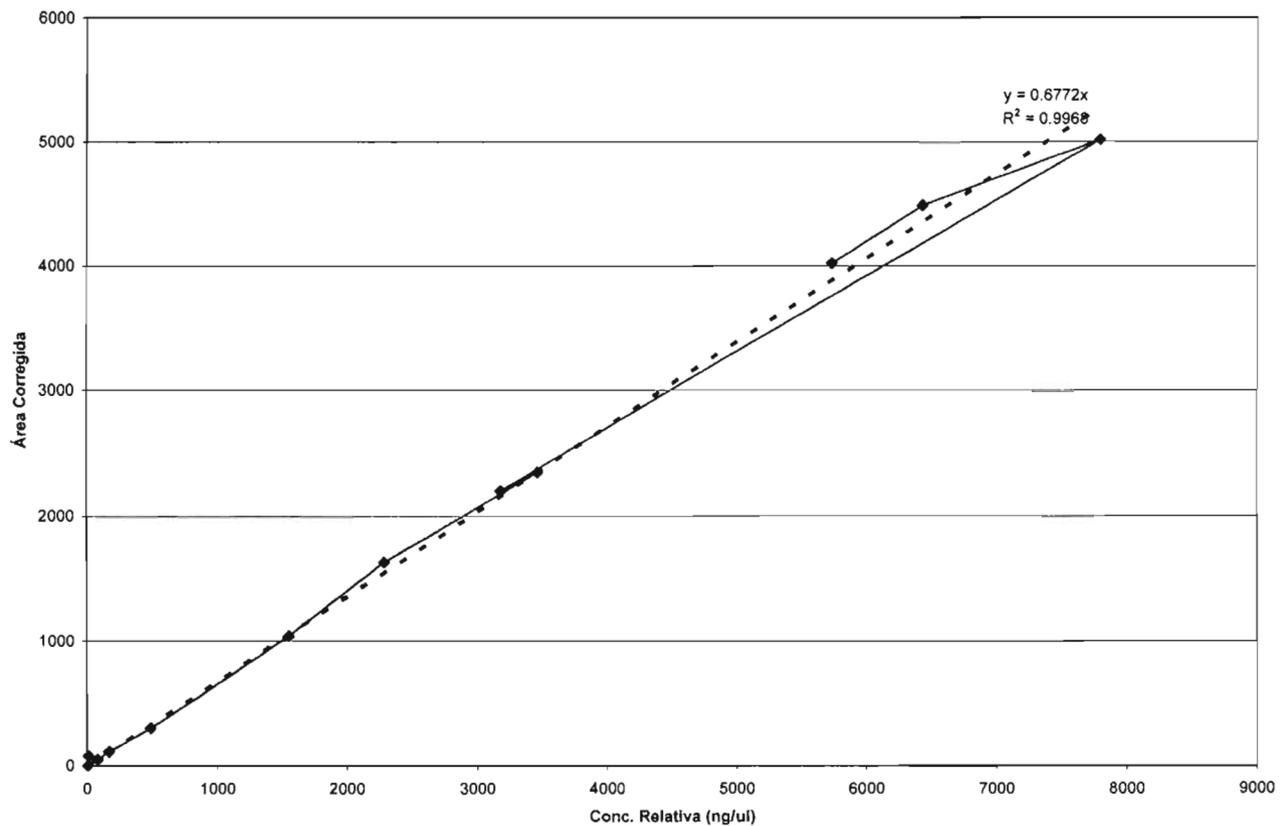
Dilución	Pico	Tiempo de migración [s]	Conc. Relativa (ng/ul)	Altura	Area correlativa
Stock	13	15.9	5732.03	2519.8	4024.2
1:2	15	16.0	6428.91	2049.5	4486.6
1:4	13	16.0	7795.04	2125.7	5020.5
1:8	16	16.0	3176.34	1403.8	2198.8
1:16	16	16.1	3461.34	1459.3	2347.4
1:32	15	16.1	2282.07	1130.0	1632.5
1:64	17	16.1	1552.20	825.7	1041.7
1:128	14	16.2	486.79	279.0	307.6
1:256	9	16.2	167.50	114.0	117.3
1:512	10	16.2	80.23	54.9	55.6
1:1024	7	16.2	11.84	10.2	85.5
1:2048	7	15.2	6.09	5.2	4.8

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la mezcla de caseínas Hammerstein.

Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (mezcla de caseínas Hammerstein)



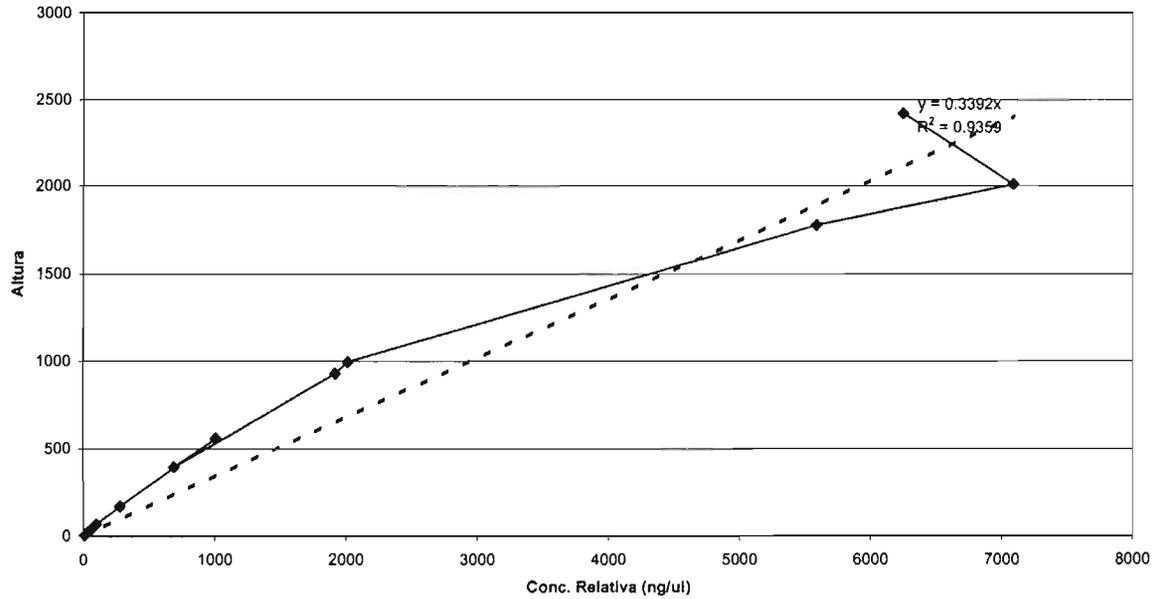
Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (mezcla de caseínas Hammerstein)



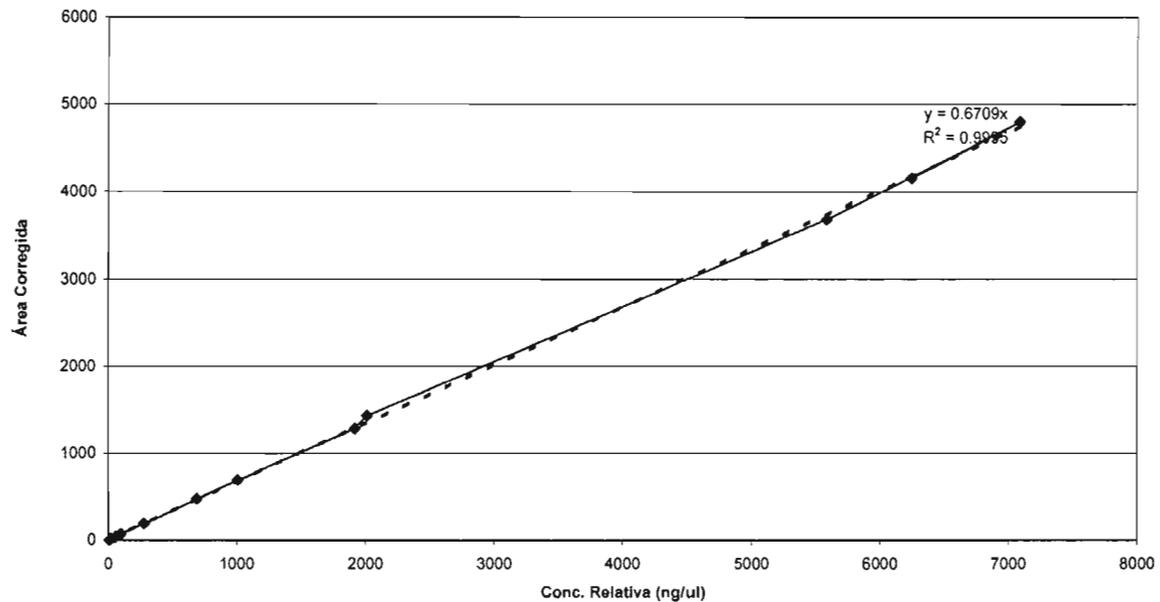
Dilución	Pico	Tiempo de migración [s]	Conc. Relativa (ng/ul)	Altura	Área correlativa
Stock	11	15.9	6243.10	2420.3	4158.7
1:2	13	16.0	7085.22	2010.5	4801.3
1:4	17	16.0	5585.10	1780.4	3682.6
1:8	14	16.1	2010.48	995.0	1436.7
1:16	13	16.1	1915.13	930.5	1284.0
1:32	12	16.1	686.47	394.7	481.3
1:64	15	16.1	1004.19	560.3	693.6
1:128	12	16.2	277.17	170.7	192.2
1:256	8	16.2	97.73	67.8	72.5
1:512	7	16.2	53.39	36.9	38.2
1:1024	7	16.2	21.24	16.5	15.7
1: 2048	7	16.2	9.76	7.5	7.1

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la mezcla de caseínas Sigma.

respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (mezcla de caseínas Sigma)



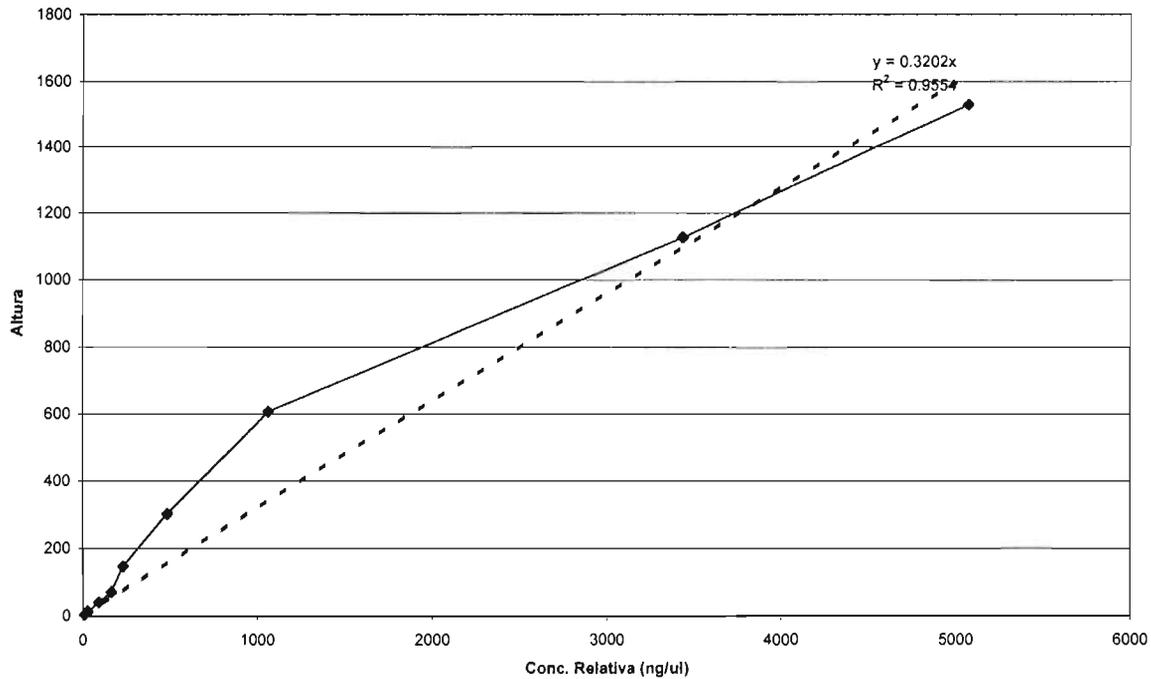
respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (mezcla de caseínas Sigma)



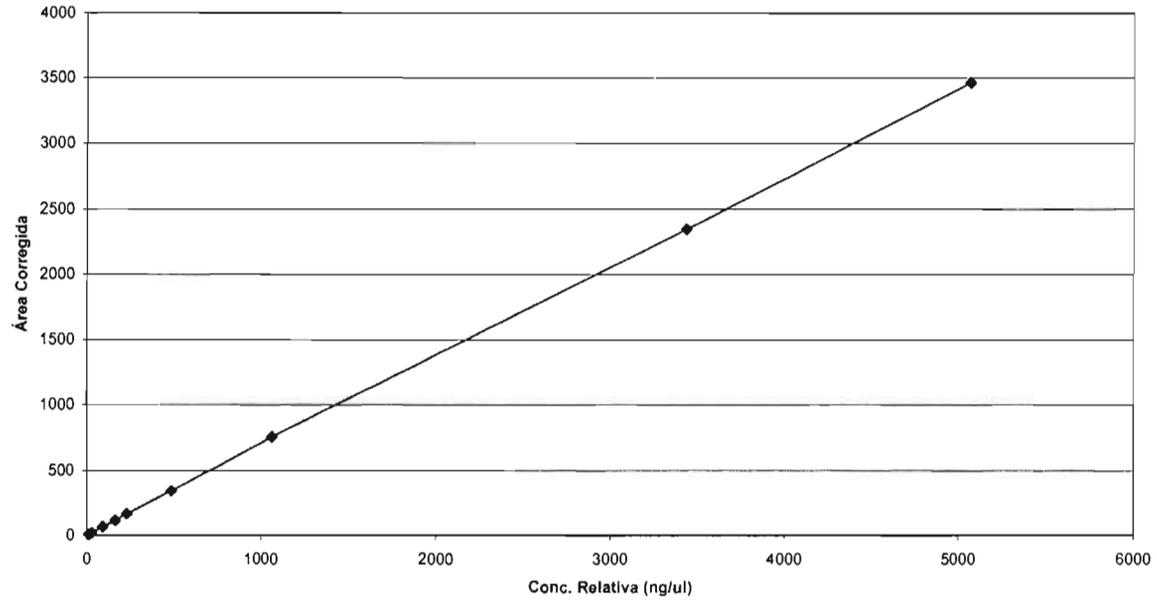
Dilución	Pico	Tiempo de migración [s]	Conc. Relativa (ng/ul)	Altura	Área correlativa
Stock	20	16.0	5069.63	1529.2	3464.3
1:2	20	16.0	3435.87	1128.9	2347.8
1:4	20	16.3	1061.34	607.9	758.9
1:8	19	16.3	483.52	303.3	345.2
1:16	18	16.3	229.01	147.6	167.2
1:32	13	16.3	161.62	71.2	114.6
1:64	13	16.4	90.28	41.6	66.4
1:128	7	16.4	27.80	13.9	21.1
1:256	7	16.3	11.40	6.0	8.5
1:512					
1:1024					
1: 2048					

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la preparación alimenticia adicionada con Caseinato de Sodio.

Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (preparación alimenticia adicionada con caseinato de sodio)



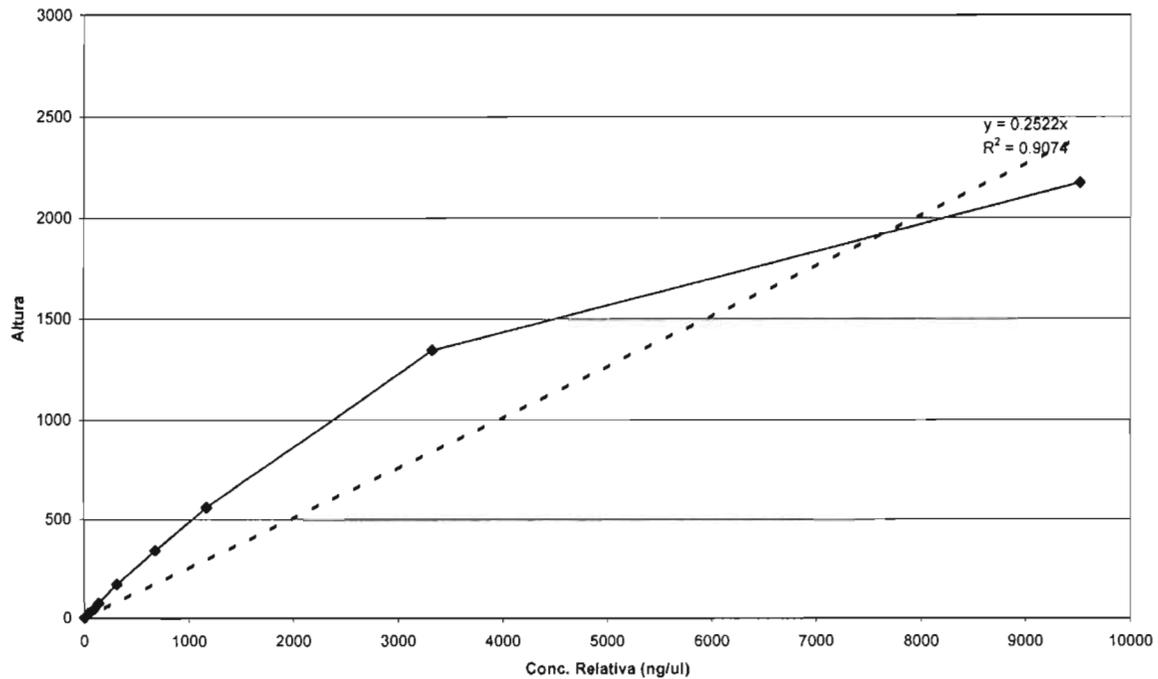
Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (preparación alimenticia adicionada con caseinato de sodio)



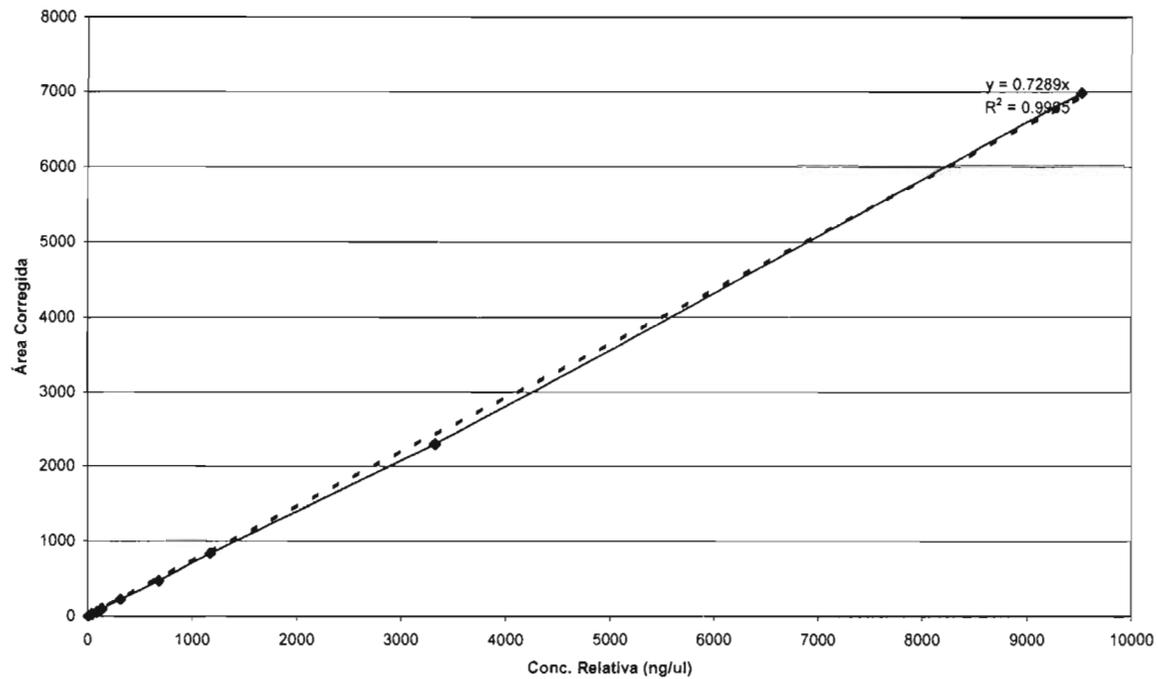
Dilución	Pico	Tiempo de migración [s]	Conc. Relativa (ng/ul)	Altura	Área correlativa
Stock	15	15.8	9516.63	2175.4	6985.7
1:2	18	16.0	3325.73	1342.7	2295.4
1:4	16	16.1	1167.36	560.1	836.9
1:8	14	16.1	677.85	344.5	468.6
1:16	14	16.2	310.63	172.5	227.3
1:32	9	16.2	134.76	76.4	97.4
1:64	9	16.2	86.68	45.7	59.0
1:128	8	16.2	41.31	26.4	29.0
1:256	7	16.2	4.59	5.1	3.4
1:512					
1:1024					
1: 2048					

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la caseína ácida.

Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (caseína ácida)



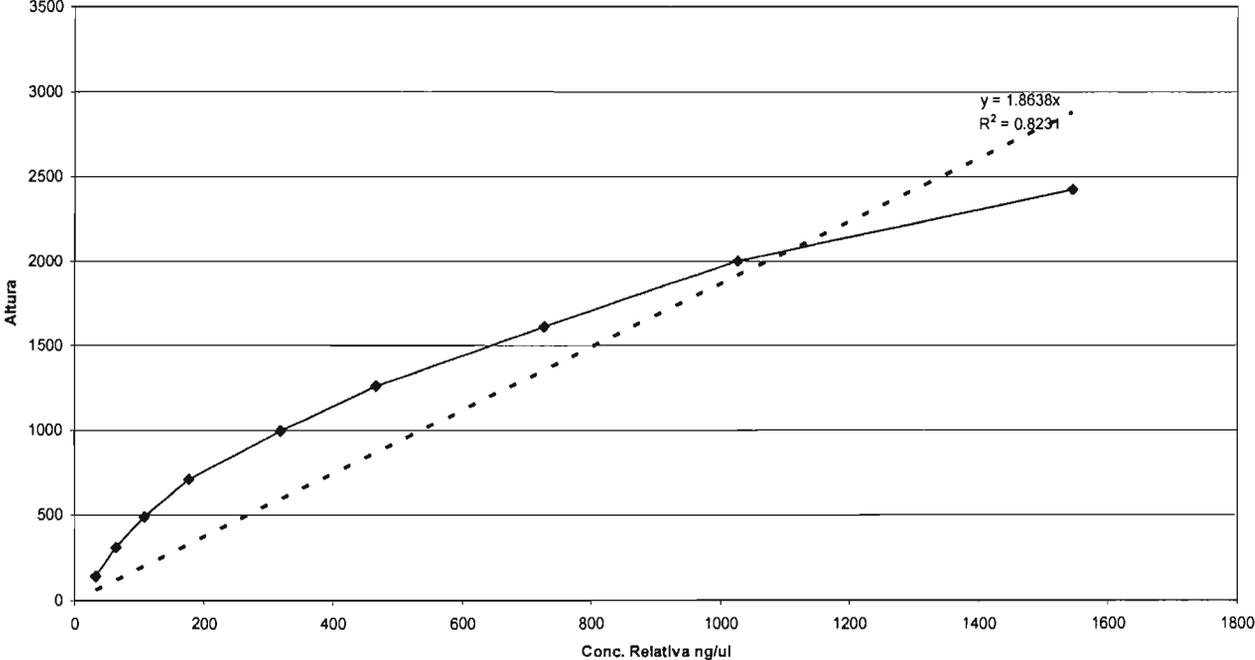
Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (caseína ácida)



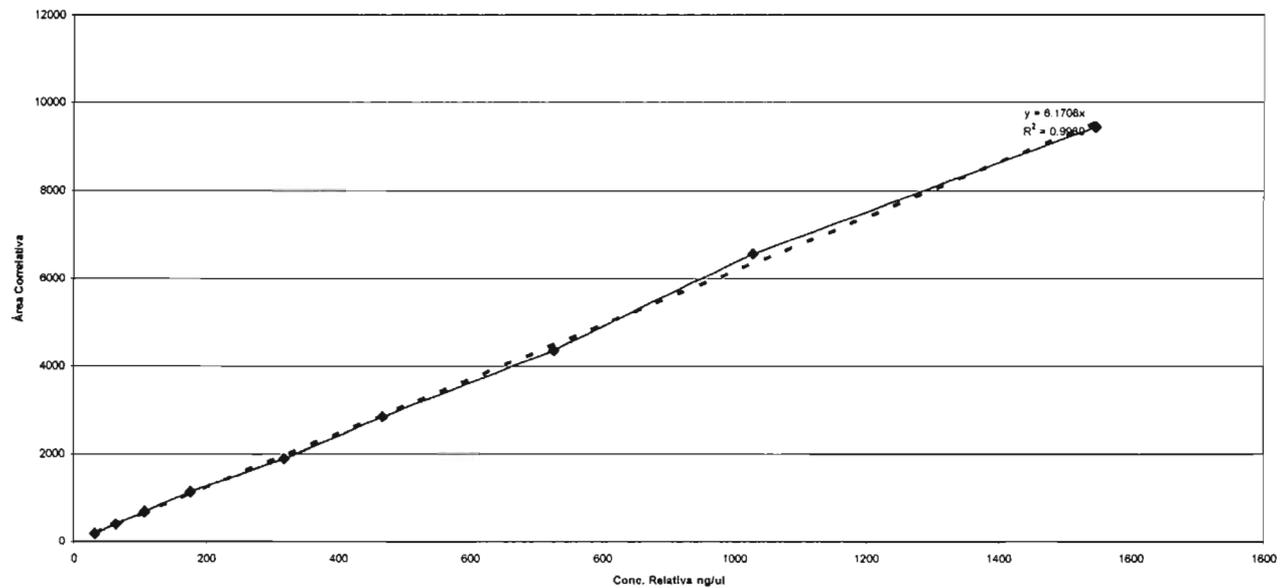
Dilución	Pico	Tiempo de migración [s]	Conc. Relativa (ng/ul)	Altura	Área correlativa
Stock					
1:2					
1:4					
1:8	12	18.45	1545.60	2426.15	9446.89
1:16	15	18.40	1027.05	2003.98	6575.73
1:32	13	18.38	726.49	1610.05	4368.74
1:64	13	18.37	466.63	1259.39	2854.17
1:128	12	18.38	318.21	997.38	1891.69
1:256	11	18.37	176.10	714.46	1136.50
1:512	8	18.38	106.71	487.45	693.74
1:1024	8	18.37	63.41	310.93	408.31
1: 2048	4	18.42	31.73	143.91	186.66

Tabla de valores seleccionados para curva de respuesta del LC-90 con la leche fluida.

Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (leche fluida)



Respuesta del LC-90 a diferentes concentraciones (leche fluida)



REPRODUCIBILIDAD DEL EQUIPO

La industria farmacéutica tiene protocolos estrictos para la adquisición de un equipo nuevo, sobre todo si se trata para investigación y desarrollo de nuevos productos. Entre ellos destacan los protocolos IQ / OQ (calificación de la instalación y la operación del instrumento) y el coeficiente de variación. En algunas ocasiones llegan a pedir como máximo el 2% de CV. La industria alimentaria queda un poco rezagada con respecto a requerimientos de instalación de instrumentos, no está demás el incluir un análisis del CV, ya que si la NOM 155 tiene como objetivo el monitoreo de la calidad de la proteína de la leche y que efectivamente esta provenga de la vaca, el analista debe conocer las capacidades del equipo con el que trabaje para este monitoreo. Con la finalidad de establecer relaciones comerciales justas e imparciales para evitar la competencia desleal entre medianos y grandes productores se requiere de un control real y eficaz que cubra todos los puntos del proceso.

El análisis para la determinación del CV consistió en la realización de tres corridas de una muestra de β -Interferon proporcionada por una farmacéutica mexicana, bajo las mismas condiciones establecidas en el protocolo de análisis de las muestras (de igual forma que las muestras alimenticias analizadas). Es muy importante destacar que el fabricante sólo garantiza que los parámetros estadísticos, llámese LDR y el % CV será menor al 2% en un rango de concentraciones de 20 –2000 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Por lo que debemos ubicar nuestra muestra para cualquier análisis dentro del intervalo de concentraciones establecidas. De no hacerlo la respuesta del instrumento variará notablemente (esto se aprecia mejor en la gráfica establecida para la respuesta del instrumento para la mezcla de caseínas Hammerstein).

<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>	<i>Corrida 3</i>		SD	% CV
Tamaño kDa	Tamaño kDa	Tamaño kDa	Tamaño Promedio		
65.8	65.2	64.2	65.07	0.81	1.24%
68.5	67.8	67.4	67.90	0.56	0.82%
70.4	69.6	69.1	69.70	0.66	0.94%
71.2	71	70.1	70.77	0.59	0.83%
71.4	71.2	70.7	71.10	0.36	0.51%
72	71.6	70.5	71.37	0.78	1.09%
73.7	71.6	71	72.10	1.42	1.97%
73.1	71.4	70.7	71.73	1.23	1.72%
72.5	71	70.5	71.33	1.04	1.46%

Variación establecida para el tamaño de la fracción proteica analizada

<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>	<i>Corrida 3</i>		SD	% CV
Conc. Rel. ng/ul	Conc. Rel. ng/ul	Conc. Rel. ng/ul	Conc. Rel. Promedio		
4868.81	5471.55	4975.06	5105.14	321.74	6.30%
3129.13	3213.52	3170.91	3171.187	42.20	1.33%
1653.74	1578.15	1663.77	1631.887	46.81	2.87%
869.82	827.34	791.79	829.65	39.07	4.71%
406.56	405.93	400.08	404.19	3.57	0.88%
153.93	157.58	153.08	154.8633	2.39	1.54%
45.18	45.09	43.72	44.66333	0.82	1.83%
11.85	11.65	11.31	11.60333	0.27	2.35%
2.85	2.88	2.55	2.76	0.18	6.61%

Variación establecida para la Concentración de la fracción proteica analizada

Los resultados referentes a la reproducibilidad de la determinación del tamaño de la muestra de β -interferon indican que a partir de valores obtenidos de tres corridas de nueve diluciones (contando a la solución stock) la desviación estándar se encuentran por debajo de la unidad en casi todas las diluciones, excepto cuando se trabaja por debajo del LDR (20-2000 ug/ml) valores establecidos por el fabricante. Con respecto a la variación que podría presentarse entre estos valores se encuentra un resultado notable, ya que ningún valor sobrepasa el CV de 2%. Se puede afirmar que no existe mucha variabilidad entre estos parámetros considerando

además que la matriz es de 3x9 (es decir se realizaron tres corridas de nueve diferentes concentraciones) .

En cuanto a la concentración se observa el mismo fenómeno, ya que se partió de una solución que sobrepasa ampliamente el límite superior del LDR establecido por el fabricante y no es sino hasta que se inician las diluciones que se mejoran los parámetros estadísticos, aunque los valores no son muy buenos por debajo del límite inferior del LDR, con los valores de CV más amplios en los extremos. Esto se debe a que la respuesta del equipo en estas concentraciones ya no es lineal y aunque los valores de SD son menores que la unidad a concentraciones cercanas a 20ug/ml (límite inferior del LDR establecido por el fabricante) la variación entre estos valores no sugiere una reproducibilidad confiable.

5. Análisis de aislados proteicos por SDS-PAGE y LC-90.

Las cuatro muestras (proteína de soya, proteína de suero, mezcla de caseínas Hammerstein y mezcla de caseínas Sigma) fueron analizadas usando ambas metodologías SDS-PAGE tradicional y el LabChip 90 con la finalidad de comparar los geles obtenidos con los geles virtuales generados por el Lab-Chip 90.

Las imágenes comparativas se muestran en las siguientes figuras. Es importante mencionar que únicamente el LC-90 presenta los geles virtuales con bandas resueltas hasta los 120 kDa y diluciones seriales en cada carril que van de la solución Stock de concentración conocida hasta la dilución 1:2048 correspondiente para cada muestra. Por lo que realmente se compara la resolución de las fracciones por debajo de este PM.

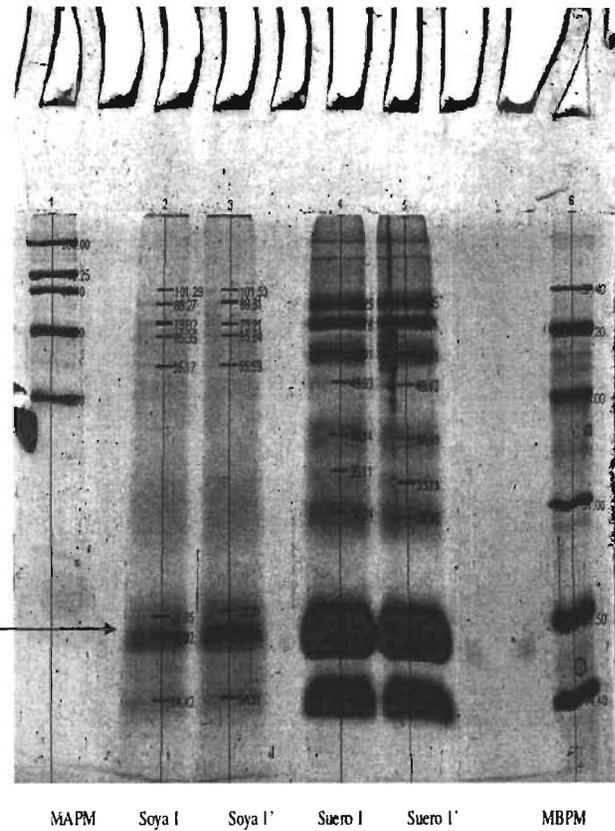
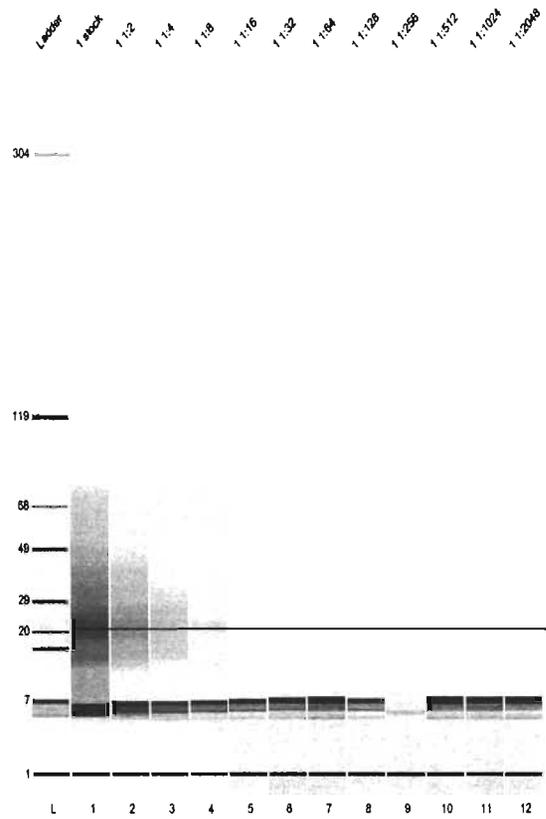
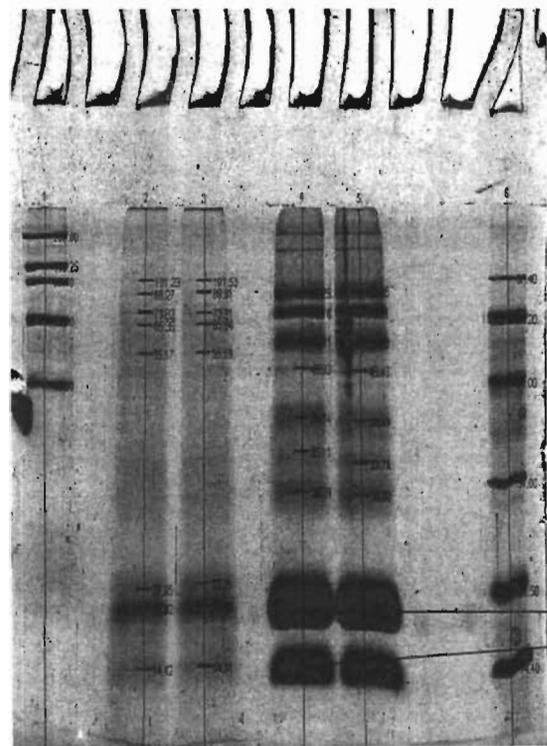


Figura 23 El gel de la izquierda es un gel virtual generado del LabChip 90 del análisis de la muestra 1 (soya), mientras que el gel de la derecha es un gel SDS-PAGE de esta muestra. El buffer de la muestra es 0.025 mM TrisCl pH 6.8



MAPM Soya I Soya I' Suero I Suero I' MBPM

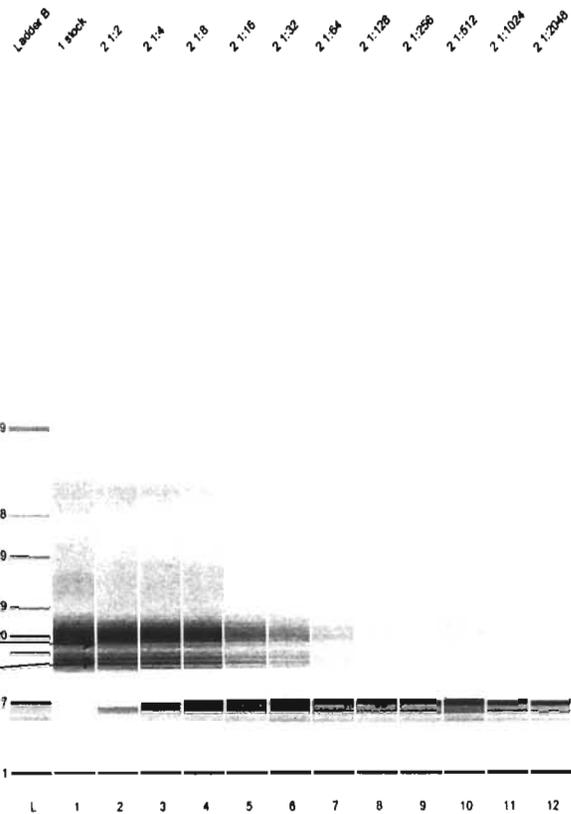


Figura 24 El gel de la derecha es un gel virtual generado del LabChip 90 del análisis de la muestra 2 (suero), mientras que el gel de la izquierda es un gel SDS-PAGE de esta muestra. El buffer de la muestra es 0.025 mM TrisCl pH 6.8

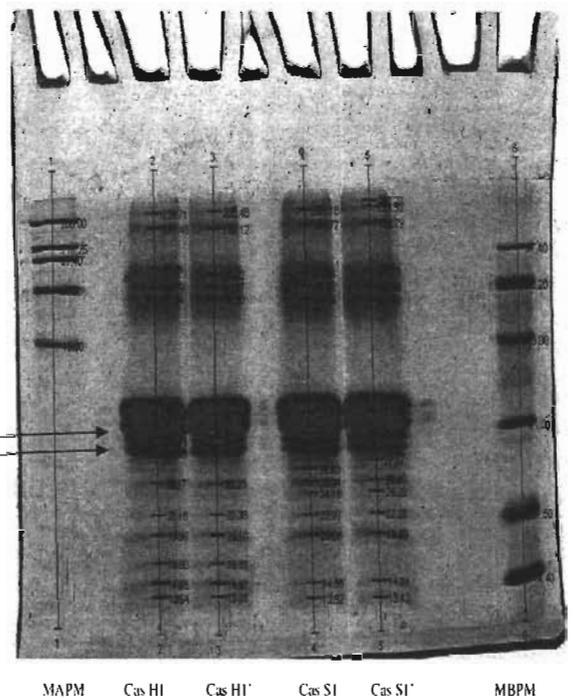
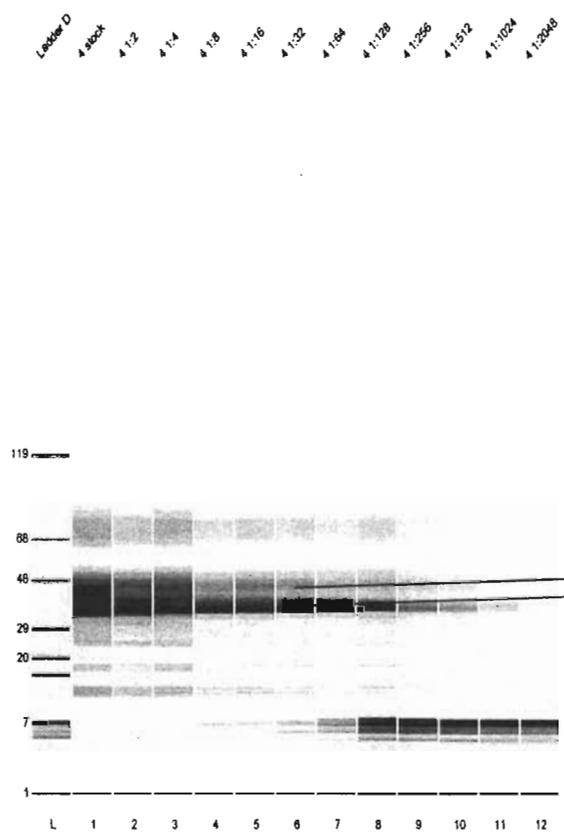


Figura 25 El gel de la izquierda es un gel virtual generado del LabChip 90 del análisis de la muestra 4 (Cas. H), mientras que el gel de la derecha es un gel SDS-PAGE de esta muestra. El buffer de la muestra es 0.025 mM TrisCl pH 6.8

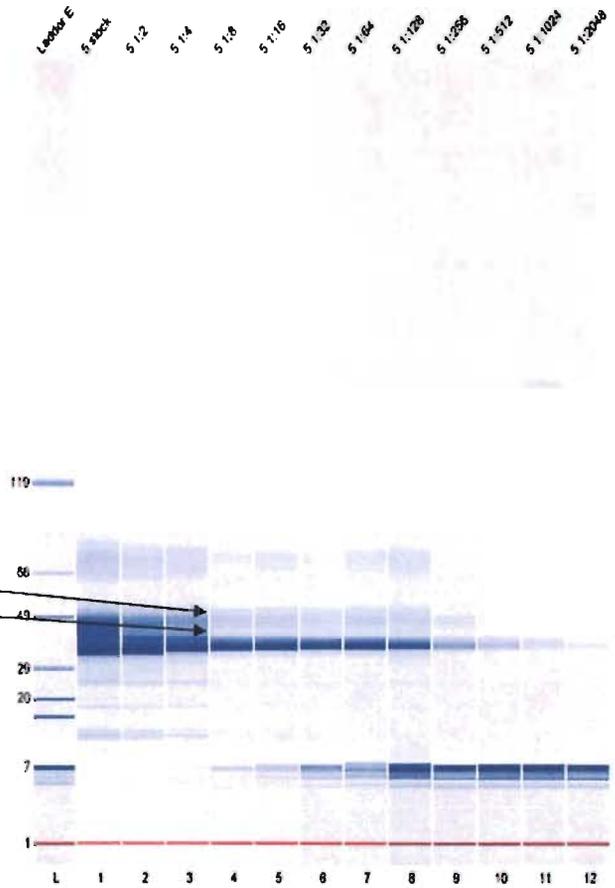
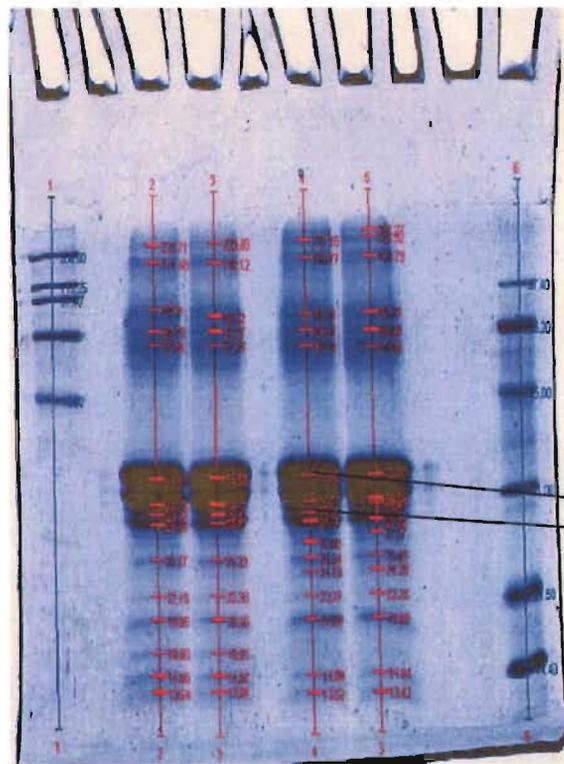


Figura 26 El gel de la derecha es un gel virtual generado del LabChip 90 del análisis de la muestra 5(Cas. S), mientras que el gel de la izquierda es un gel SDS-PAGE de esta muestra. El buffer de la muestra es 0.025 mM TrisCl pH 6.8

En el caso de las muestras proteína de suero, mezcla de caseínas Hammerstein y mezcla de caseínas Sigma se seleccionaron los carriles de los geles virtuales que más se asemejaban a las concentraciones manejadas en la técnica SDS-PAGE para su comparación (señalados en las figuras respectivas).

Muestra	C [mg/ml] PAGE	TRC [mg/ml] LC-90	Carril seleccionado
Proteína de soya.	5.25	0.798	1
Proteína de suero.	5.25	4.198	2
Mezcla de caseínas Hammerstein	4.37	4.590	6
Mezcla de caseínas Sigma.	4.20	3.466	4

Identificación de muestras analizadas por SDS-PAGE y LC-90

A pesar de la diferencia que se da en las concentraciones manejadas para ambas metodologías, se observan cualitativamente muy buenos geles que prácticamente no presentan variaciones. Si se observa con atención en la figura 23 se ven las mismas tres bandas tanto del gel virtual como del SDS-PAGE digitalizado por el densitómetro y la diferencia que existe en cuanto a las concentraciones es de más de cuatro unidades para el gel SDS-PAGE por encima del LC-90. Esto habla de la excelente sensibilidad presentada para el LC-90. Es sumamente importante recordar que la concentración de nuestra muestra debe ubicarse dentro del LDR del LC-90 que va de 20-2000 ug/ml para con ello asegurarnos de la validez del análisis estadístico.

En la figura 24 con el gel en SDS-PAGE se aprecian dos manchas concentradas de bajo peso molecular; mientras que en el gel virtual elaborado en el LC-90 se logran resolver dos bandas de la fracción de aproximadamente 20 kDa y otras tres bandas de la banda de menor PM presentada en el gel de poliacrilamida. Esto sugiere que el LabChip 90 provee mejor

resolución que el método SDS-PAGE para estas proteínas en este intervalo de tamaño. La concentración relativa entre la muestra en ambas metodologías difiere en menor proporción con respecto de las demás y con ello vemos la mejoría de resolución por parte del LC-90.

Para comparar las muestras 4 y 5 que también fueron analizadas utilizando el LabChip 90 (Figuras 25 y 26). Los resultados muestran que el ensayo proteico realizado en el LabChip 90 es capaz de detectar y caracterizar las fracciones que constituyen a estas mezclas. Ambas muestras con fracciones de alto y bajo peso molecular son bien separadas y detectadas.

En la figura 25 se presenta una mejor resolución para el ensayo realizado en el LC-90, mientras que en el gel SDS-PAGE se encuentran las marcas muy poco resueltas (cuatro bandas). En la figura 26 también se resuelven sólo cuatro bandas para el gel SDS-PAGE y la fracción superior se resuelve mejor en el LabChip 90; se observan tres bandas en esta sola fracción. Es importante mencionar que para los geles de 1mm de espesor como el que se utilizó en este ensayo se recomienda adicionar de 25 –30ug de proteína disueltos en 35ul, con una inserción de 12 ul por cada pozo o carril. Por lo que esa también es una variable considerable en este análisis. Se podrían realizar otros ensayos con una solución más diluida, sin embargo habría que considerar el tiempo que implica realizar todo el análisis desde la elaboración de los geles hasta el corrimiento de las muestras. Y la cantidad de residuos tóxicos que se generan. Por todo lo anterior el LabChip representa una mejor alternativa en el análisis de proteínas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Composición

- La leche pasteurizada no cumple con el contenido mínimo requerido de Caseína (según lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana-NOM-155-SCFI-2002).
- Las muestras de leche Ultra pasteurizadas superan ampliamente lo establecido en la normatividad debido al proceso de descremado.
- La normatividad (Norma Oficial Mexicana-NOM-155-SCFI-2002) establece que el porcentaje mínimo de proteína para las leches comerciales enteras semidescremadas y descremadas debe ser de 3g de proteína en 100 ml, y de ésta el 70% debe corresponder a la caseína de leche es decir 2.1%.

Conclusiones del Análisis de muestras por electroforesis unidimensional en gel SDS-PAGE

- Se demuestra que los perfiles y la cuantificación de las fracciones de las proteínas analizadas (proteína de soya, proteína de suero y mezclas de caseínas Hammerstein y Sigma) son diferentes al de la leche.
- Los resultados muestran que para la separación, identificación y cuantificación de proteínas contenidas en un aislado proteico comercial de soya, mezclas de caseínas y polvo para preparar una bebida que contiene proteínas del suero de la leche esta metodología conlleva algunos inconvenientes, como son: un alto consumo de tiempo (primero para preparar los geles y después para hacer el corrimiento de las muestras) el análisis limitado de muestras por cada gel y una alta producción de residuos

tóxicos.

- Es una metodología de bajo costo, con muy buena sensibilidad y que permite cuantificación de los datos resultantes.
- El ensayo proteico en geles SDS-PAGE puede aplicarse para investigar la presencia de proteínas de soya en leche.
- Los resultados obtenidos podrían sugerir que los principales indicadores de proteína de soya (glicina y β -conglucina) pueden ser detectados por SDS-PAGE independientemente del tipo de ingredientes que contenga la formulación.
- Cuando se analizaron los perfiles electroforéticos de la mezclas de caseínas los patrones encontrados fueron similares, excepto en el caso de la mezcla de caseínas Sigma en donde se observa una banda extra alrededor de los 260 kDa.
- Existe una notable diferencia entre lo obtenido en este estudio y lo que reporta el fabricante para la mezcla de caseínas Hammerstein, el fabricante reporta fracciones proteicas cuyos PM van de 75000-100000 Da mientras que el análisis arroja que se encontraron 15 marcas, cuyos pesos moleculares oscilan entre 13 y 230 kDa.
- Los perfiles electroforéticos permiten confirmar la composición de las preparaciones alimenticias estudiadas.
- A pesar de los inconvenientes que resultan del ensayo de proteínas por SDS-PAGE resulta ser una metodología sencilla, económica y confiable, por lo que puede incluirse en cualquier laboratorio que cumpla con los mínimos requerimientos para su análisis.

Conclusiones del montaje de la técnica de electroforesis capilar (CE)

- Se implementó el método de separación de las proteínas de la leche y determinación descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-155SCFI-2002.
- La electroforesis capilar permite el análisis de productos lácteos con un mínimo de muestra preparada. Esta claro que la electroforesis capilar no sólo elimina las desventajas de la electroforesis en gel, sino que provee resultados cuantitativos con mayor rapidez, exactitud y precisión.
- Es posible detectar adulteraciones por proteína de soya , de suero y adición de mismas caseínas en la leche fluida.
- Los patrones obtenidos por la electroforesis capilar pueden ser usados para determinar adulteraciones en leche y en otros productos.
- No se detectó problema alguno en cuanto a los perfiles obtenidos para cada tipo de estándar utilizado (mezclas de caseínas Caseína Sigma y Caseína Hammarsten) por lo que es prácticamente indistinto utilizar cualquiera de éstos como patrón de referencia.
- El perfil obtenido para el estándar de las proteínas de suero lácteo no fue bueno, probablemente debido a su alta sensibilidad a la desnaturalización por calor o a otros procesos como podría ser el mismo desengrasado por centrifugación
- Al superponer el estándar de Caseína de Sigma con la muestra de leche pasteurizada tenemos una correspondencia casi total, con excepción del complejo formado entre la κ CN y la β CNB.
- No se descarta el contenido en mínimas cantidades de las proteínas de suero α -La y la β -Lg presentes en la muestra de leche comercial, en ambos estándares de Caseína.
- No se presenta adulteración alguna en la muestra de leche comercial analizada.

- Es necesario determinar la reproducibilidad y el límite de detección de la técnica propuesta en la NOM-155-SCFI-2002.

Conclusiones del análisis electroforético por microchip

- Se obtuvieron los perfiles electroforéticos de la proteína de soya, proteína de suero, mezclas de caseínas marca Hammerstein y Sigma, preparación alimenticia adicionada con caseinato de sodio, caseína ácida y leche fluida. (Ver apéndice)
- Se determinó la linealidad de la respuesta del LabChip 90 de la proteína de soya, proteína de suero, mezclas de caseínas marca Hammerstein y Sigma, preparación alimenticia adicionada con caseinato de sodio, caseína ácida y leche fluida.
- Se comprobó la reproducibilidad del instrumento dentro y fuera de los límites especificados por el fabricante.
- La electroforesis en microchip no sólo permite detectar las adulteraciones por adición de fracciones de proteína de soya, suero o misma caseína sino que optimiza los tiempos de análisis a cuestión de segundos y proporciona además el tamaño, la concentración relativa y el % de pureza.
- El muestreo automatizado, tñido, destñido, análisis y archivo de la información colocan al ensayo de proteínas realizado con el Labchip 90 como una herramienta poderosa para los laboratorios que requieren alta eficiencia y alta calidad en el análisis de proteínas.
- Mientras que la información del método tradicional SDS-PAGE es dependiente de la variabilidad que el usuario tenga para la tinción, destñido y los pasos de la

digitalización de los geles, el LabChip 90 utiliza ambos, un marcador interno y un estándar que permite el análisis de muchas muestras con un alto nivel de reproducibilidad y robustez para el tamaño y la concentración relativa.

- Los resultados son comparables o superiores a los generados por la metodología SDS-PAGE con azul de Coomasie como revelador.

Recomendaciones

Para el Análisis de muestras por electroforesis unidimensional en gel SDS-PAGE

- Se debe investigar si la precisión de la medición cuantitativa esta limitada por las variaciones en la respuesta de diferentes tipos de preparaciones de soya.
- Minimizar la concentración de la solución sometida al análisis podría mejorar la resolución del ensayo.
- Realizar un análisis bidimensional, para definir las bandas que no se logran resolver en el análisis unidimensional o en su caso modificar la metodología por lo propuesto por otros autores como Tricina –SDS-PAGE (Pardo et. al 2001).

Trabajo por realizar para el montaje la metodología de EC propuesta en la NOM-155-SCFI-2002.

- Obtener los perfiles electroforéticos para muestras de leche adulteradas con los posibles agentes adulterantes de origen animal (caseínatos, proteínas de suero y otras fracciones proteicas) y de origen vegetal (proteína de soya, chícharo y gluten) con los posibles grados de adulteración.

- Es necesario contemplar la posible problemática que representaría la determinación de la adulteración con proteínas de origen animal y vegetal (ISO /DIS 17129 IDF 206 Milk and milk products – Determination of soy and pea proteins using SDS-CE (Screening method)).
- No se descarta el uso de esta misma técnica para la determinación de adulteración en leche por proteínas de origen vegetal o mezclas entre estas.
- Es necesario determinar la reproducibilidad y el límite de detección de la técnica propuesta en la NOM-155-SCFI-2002.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- American Dry Milk Institute (ADMI, 1971) 8: 678-691
- Baker, D.R. "Capillary Electrophoresis" John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1995.
- Burggraf, N., Manz, A., Effenhauser, C. S., Verpoorte, E., Derooij, N. F., Widmer, H. M., J. High Res. Chromatogr. 1993, 16, 594-596.
- Carretero, A.S.; Cruces-Blanco, C.; Ramirez, S.C.; Pancorbo, A.C.; Gutierrez, A.F. J. Agric. Food. Chem. 2004, 52, 5791.
- Cavazza, A.; Corradini, C.; Lauria, A.; Nicoletti, I. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 3324.
- Cheng, J., Shoffner, M. A., K. R., Kricka, L. J., Wilding P., J. Chromatogr. A 1996, 732, 151-158.
- Cunico, R.L.; Goodin, K.M.; Wehr, T. "Basic HPLC and CE of Biomolecules" Bay Bioanalytical Laboratory: Richmond, CA, 1998.
- Effenhauser, C. S., Bruin, G. J. M., Paulus, A., Ehrat, M., Anal. Chem. 1997, 69, 3451-3457.
- Ekstrom, B., Jacobson, G., Ohman, O., Sjodin, H., US Patent 5,376,252, 1994.
- FAO: 2001 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.
<http://www.fao.org>
- Fan, Z. H., Harrison, D. J., Anal. Chem. 1994, 66, 177-184.
- Fijéis, D., Aebersold, R., J. Biochech. Eng. Trans. ASME 1999, 121, 7-12.
- Fister, J. C., Jacobson, S. C., Davis, L. M., Ramsey, J. M., Anal. Chem. 1998, 70, 431-437.
- Foley, J.P. Anal. Chem. 1990, 62, 1302.
- Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. 1998. Dry Chem and Biochem. Blackie Academic and Professional, Londres. 478pp.
- García Amigo, Molina E. Jnal of liq Chrom and Relted Tech; 23(13). 2021-2031 (2000).

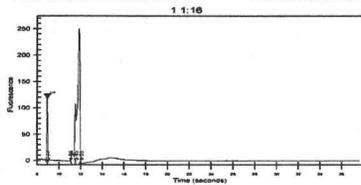
- Gavin, P. F., Ewing, A. G., *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 8932-8936.
- Gavin, P. F., Ewing, A. G., *J. Microcol. Sep.* 1998, 10, 357-364
- Gavin, P. F., Ewing, A. G., *Anal. Chem.* 1997, 69, 3838-3845.
- Guzman – Gonzalez, Marais M; Ramos M; Amigo F. *Jnal. of the Sce. of food and agre;* 79(8). 117-1122 (2000).
- Harrison, D. J., Fan, Z. H., Seiler, K., Manz, A., Widmer, H. M., *Anal. Chem. Acta* 1993, 283, 361-366.
- Harrison, D. J., Fluri, K., Seiler, K., Fan, Z. H., Effenhauser, C. S., Manz, A., *Science* 1993, 261, 895-897.
- ISO /DIS 17129 IDF 206 Milk and milk products – Determination of soy and pea proteins using SDS-CE (Screening method).
- Jacobson, S. C., Culbertson, C. T., Daler, J. E., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3476-3480.
- Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Koutny, L. B., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1994, 66, 1114-1118; 2369-2373
- Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Moore, A. W., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1994, 66, 4127-4132.
- Jacobson, S. C., Koutny, L. B., Hergenroder, R., Moore, A. W., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1994, 66, 3472-3476
- Jacobson, S. C., Moore, A. W., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2059-2063.
- Jeong S., Biondi S., Mikkelsen J., Fathollahi B., Winoto A., Spaid M. and Chow A. Application Note from Caliper Life Sciences Inc., Mountain View, CA 94043, USA 2001
- Jong de N., Visser S. Y Olieman C. ,*Jnal of Chrom A*, 652 207-213(1993).
- Koutny, L. B., Schmalzing, D., Taylor T. A., Fuchs, M., *Anal. Chem.* 1996, 68, 18-22.
- Liu, K. L. K., Davis, K. L., Morris, M. D., *Anal. Chem.* 1994, 66, 3744-3750.
- Liu, Y. M., Sweedler, J. V., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2471-2476
- López Tapia J., García Risco M., y col. *Jnal of Chrom A* 836 153-160 (1999).

- Lynch, A.G. Mulvihill, D.M. Law, A.J. Leaver, *Jnal of Chrom A*, 7(4): 213-220 (1997).
- Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M., *Sens. Actuators B* 1990, 1, 244-248.
- Martynova, L., Locascio, L. E., Gaitan, M., Kramer, G. W., Christensen, R. G., MacCrehan, W. A., *Anal. Chem.* 1997,69, 4783-4789.
- Mathies, R. A., Huang, X. C., *Nature* 1992, 359, 167-169.
- McCormick, R. M., Nelson, R. J., Alonso-Amigo, M G., Benvegna, J., Hoopwer, H. H., *Anal. Chem.* 1997, 69, 2626-2630.
- Millares, B y Ramos, M. *Jnal of Chrom*; 915:225-230 (2001).
- Noble P. Wong; R y Keeney, M. 1999. *Ftals of Dry Chem.* Third edition. Editorial An Aspen Publication. Gaithersburg, Maryland.
- Norma Oficial Mexicana-NOM-155-SCFI-2002-Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado - denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Olvera Montiel M.A. Determinación de caseína, caseínatos o fracciones proteicas adicionados a mezclas de leche en polvo importada. Tesis licenciatura, UNAM, México D.F. pp1-3, 6, 8, 12,14-16,22-23 2002.
- Otte J., K.S. Larsen, S. Bouhallab, *Int. Dairy. J.* 8 (1998) 857.
- Pardo F.M., Natalucci L.C. *Acta. Farm. Bonaerense* 21 (1): 57-60 (2002)
- Recio I., Amigo L., López-Fandiño R. , *Jnal of Chrom B*, 697 231-242 (1997)
- Roberts, M. A., Rossier, J. S., Bercier, P., Girault, H., *Anal. Chem.* 1997, 69, 2035-2042.
- Rodrigues, M.R.A.; Caramao, E.B.; Arce, L.; Rios, A.; Valcarcel, M. J. *Agric. Food Chem.* 2002, 50, 425.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. <http://www.sagar.gob.mx>
<http://www.siea.sagarpa.gob.mx> (2001).
- Secretaria de Salud. Manual de calidad 1999. Sistemas de HACCP. Vol 1: p. 89-103

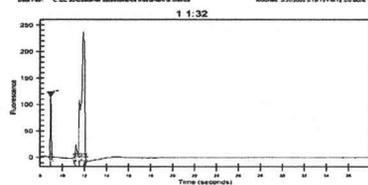
- Simms, P.J.; Jeffries, C.T.; Huang, Y; Zhang, L.; Arrhenius, T.; Nadzan, A.M. J. Comb. Chem. 2001, 3, 427.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. "Principles of Instrumental Analysis, 5th ed." Saunders college Publishing: Philadelphia, 1998.
- Spreer E. 1991. Milk and Dairy Product Technology. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. Anal. Chem. 1984, 56, 111, 113.
- Trujillo A.J; Casals y Guamis B. Jnal of Dry Sce. (83) (1): 11-19 (2000).
- Veloso Ana CA, Teixeira, N. Ferreira I. Jnal of Chrom A, 967 209-218 (2002).
- Vladislav Dolník, Shaorong Liu, Stevan Jovanovich Electrophoresis 2000, 21, 41-54 Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
- Walstra P y Jenness R, 1987. Química y Física Lactológica. Acribia S.A., Zaragoza. 123-233, 334-41.
- Woolley, A. T., Lao, K. Q., Glazer, A. N., Mathies, R. A., Anal. Chem. 1998, 70, 684-688.
- Woolley, A. T., Mathies, R. A., Proc. Natl. Acad.Sci. USA 1994, 91, 11348-11352.
- Xue, Q. F., Dunayevskiy, Y. M., Foret, F., Karger, B. L., Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997, 11, 1253-1256
- Zhang, Y., Lee, H. K., Li, S. F. Y., Talanta 1998, 45, 613-618.
- [a] F-T.A. Chen and J-H Zang, J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., 75 (1992) 905.
- [b]M. Kanning, M. Casella y C. Olieman, LC-GC Int., 6 (1993) 701.
- [c]I. Recio y C. Olieman, Electroforesis, 17 (1996), 1228.
- [d]I. Recio, M. L. Pérez-Rodríguez, M. Ramos y L. Amigo, J. Chromatogr. A, 1997, (en la prensa).

- [e]I. Recio, L. Amigo, M. Ramos y R. López-Fandiño, J. Dairy Res., 1997, en la prensa.
- [f]N.M. Kinghorn, C.S. Norris, G.R. Paterson y D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 111.
- [g]I. Recio, E. Molina, M. Ramos y M. de Frutos, Electrophoresis, 16 (1995), 654.
- [h]M. de Frutos, E. Molina y L. Amigo, Milchwissenschaft, 51 (1996) 374.
- [i]I. Recio, M. de Frutos, A. Olano y M. Ramos, J. Agr. Food Chem., 44 (1996) 3955.
- [j]J. Otte, L. Midtgaard, K.B. Qvist, Milchwissenschaft, 50 (1994) 75.
- [Z]I. Recio, L. Amigo, R. López-Fandiño, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 231-242.

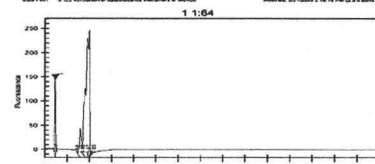
APÉNDICE



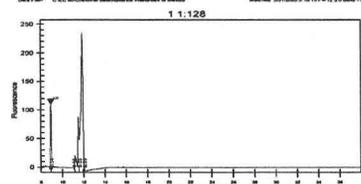
Peak	Ret. Time (min)	Area	Height	Conc. Area	Observations
1	1:16	180	240	1.8	Lower Member
2	1:16	10	10	0.1	System Response
3	1:16	10	10	0.1	System Response



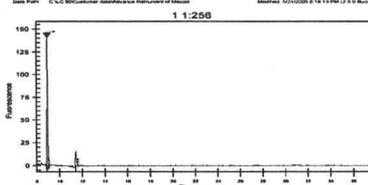
Peak	Ret. Time (min)	Area	Height	Conc. Area	Observations
1	1:32	180	240	1.8	Lower Member
2	1:32	10	10	0.1	System Response
3	1:32	10	10	0.1	System Response



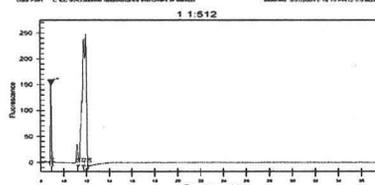
Peak	Ret. Time (min)	Area	Height	Conc. Area	Observations
1	1:04	180	240	1.8	Lower Member
2	1:04	10	10	0.1	System Response
3	1:04	10	10	0.1	System Response



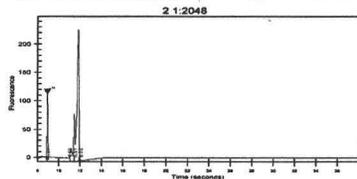
Peak	Ret. Time (min)	Area	Height	Conc. Area	Observations
1	1:28	180	240	1.8	Lower Member
2	1:28	10	10	0.1	System Response
3	1:28	10	10	0.1	System Response



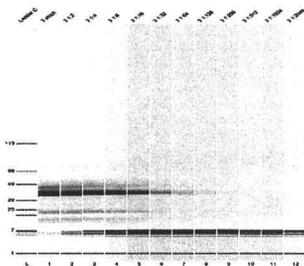
Peak	Ret. Time (min)	Area	Height	Conc. Area	Observations
1	1:26	140	180	1.4	Lower Member
2	1:26	10	10	0.1	System Response



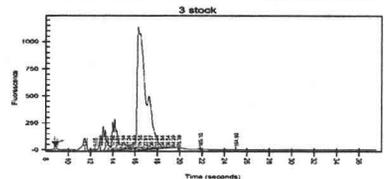
Peak	Ret. Time (min)	Area	Height	Conc. Area	Observations
1	1:52	180	240	1.8	Lower Member
2	1:52	10	10	0.1	System Response
3	1:52	10	10	0.1	System Response



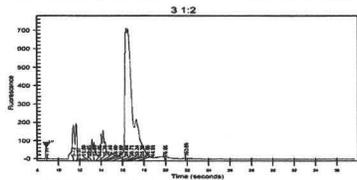
Peak	Ret. Time (min)	Area	Rel. Comp. (Area)	%Purity	Height	Con. Area	Observations
1	1.2	180	100	100	180	180	Small Peak



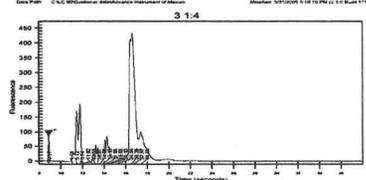
Peak	Ret. Time (min)	Area	Rel. Comp. (Area)	%Purity	Height	Con. Area	Observations
1	1.2	180	100	100	180	180	Small Peak
2	1.5	10	5	5	10	10	Small Peak
3	1.8	15	8	8	15	15	Small Peak
4	2.1	20	11	11	20	20	Small Peak
5	2.4	25	14	14	25	25	Small Peak
6	2.7	30	17	17	30	30	Small Peak
7	3.0	35	20	20	35	35	Small Peak
8	3.3	40	22	22	40	40	Small Peak
9	3.6	45	25	25	45	45	Small Peak
10	3.9	50	28	28	50	50	Small Peak
11	4.2	55	31	31	55	55	Small Peak
12	4.5	60	34	34	60	60	Small Peak



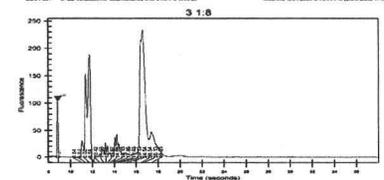
Peak	Ret. Time (min)	Area	Rel. Comp. (Area)	%Purity	Height	Con. Area	Observations
1	1.2	1000	100	100	1000	1000	Small Peak



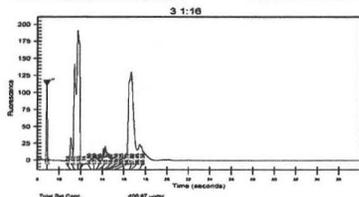
Peak	Ret. Time (min)	Area	Rel. Comp. (Area)	%Purity	Height	Con. Area	Observations
1	1.2	650	100	100	650	650	Small Peak



Peak	Ret. Time (min)	Area	Rel. Comp. (Area)	%Purity	Height	Con. Area	Observations
1	1.2	350	100	100	350	350	Small Peak

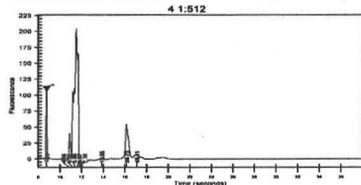


Peak	Ret. Time (min)	Area	Rel. Comp. (Area)	%Purity	Height	Con. Area	Observations
1	1.2	200	100	100	200	200	Small Peak



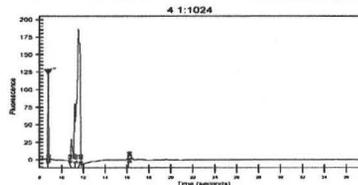
Total Ion Conc.: 400.87 µg/ml

Peak	Ret. Time (min)	Area	Height	Observed
1	1.16	180	180	180
2	1.18	10	10	10
3	1.20	5	5	5
4	1.22	2	2	2
5	1.24	1	1	1
6	1.26	1	1	1
7	1.28	1	1	1
8	1.30	1	1	1
9	1.32	1	1	1
10	1.34	1	1	1
11	1.36	1	1	1
12	1.38	1	1	1
13	1.40	1	1	1
14	1.42	1	1	1
15	1.44	1	1	1
16	1.46	1	1	1
17	1.48	1	1	1
18	1.50	1	1	1
19	1.52	1	1	1
20	1.54	1	1	1
21	1.56	1	1	1
22	1.58	1	1	1
23	1.60	1	1	1
24	1.62	1	1	1
25	1.64	1	1	1
26	1.66	1	1	1
27	1.68	1	1	1
28	1.70	1	1	1
29	1.72	1	1	1
30	1.74	1	1	1
31	1.76	1	1	1
32	1.78	1	1	1
33	1.80	1	1	1
34	1.82	1	1	1
35	1.84	1	1	1
36	1.86	1	1	1
37	1.88	1	1	1
38	1.90	1	1	1
39	1.92	1	1	1
40	1.94	1	1	1
41	1.96	1	1	1
42	1.98	1	1	1
43	2.00	1	1	1
44	2.02	1	1	1
45	2.04	1	1	1
46	2.06	1	1	1
47	2.08	1	1	1
48	2.10	1	1	1
49	2.12	1	1	1
50	2.14	1	1	1
51	2.16	1	1	1
52	2.18	1	1	1
53	2.20	1	1	1
54	2.22	1	1	1
55	2.24	1	1	1
56	2.26	1	1	1
57	2.28	1	1	1
58	2.30	1	1	1
59	2.32	1	1	1
60	2.34	1	1	1
61	2.36	1	1	1
62	2.38	1	1	1
63	2.40	1	1	1
64	2.42	1	1	1
65	2.44	1	1	1
66	2.46	1	1	1
67	2.48	1	1	1
68	2.50	1	1	1
69	2.52	1	1	1
70	2.54	1	1	1
71	2.56	1	1	1
72	2.58	1	1	1
73	2.60	1	1	1
74	2.62	1	1	1
75	2.64	1	1	1
76	2.66	1	1	1
77	2.68	1	1	1
78	2.70	1	1	1
79	2.72	1	1	1
80	2.74	1	1	1
81	2.76	1	1	1
82	2.78	1	1	1
83	2.80	1	1	1
84	2.82	1	1	1
85	2.84	1	1	1
86	2.86	1	1	1
87	2.88	1	1	1
88	2.90	1	1	1
89	2.92	1	1	1
90	2.94	1	1	1
91	2.96	1	1	1
92	2.98	1	1	1
93	3.00	1	1	1
94	3.02	1	1	1
95	3.04	1	1	1
96	3.06	1	1	1
97	3.08	1	1	1
98	3.10	1	1	1
99	3.12	1	1	1
100	3.14	1	1	1
101	3.16	1	1	1
102	3.18	1	1	1
103	3.20	1	1	1
104	3.22	1	1	1
105	3.24	1	1	1
106	3.26	1	1	1
107	3.28	1	1	1
108	3.30	1	1	1
109	3.32	1	1	1
110	3.34	1	1	1
111	3.36	1	1	1
112	3.38	1	1	1
113	3.40	1	1	1
114	3.42	1	1	1
115	3.44	1	1	1
116	3.46	1	1	1
117	3.48	1	1	1
118	3.50	1	1	1
119	3.52	1	1	1
120	3.54	1	1	1
121	3.56	1	1	1
122	3.58	1	1	1
123	3.60	1	1	1
124	3.62	1	1	1
125	3.64	1	1	1
126	3.66	1	1	1
127	3.68	1	1	1
128	3.70	1	1	1
129	3.72	1	1	1
130	3.74	1	1	1
131	3.76	1	1	1
132	3.78	1	1	1
133	3.80	1	1	1
134	3.82	1	1	1
135	3.84	1	1	1
136	3.86	1	1	1
137	3.88	1	1	1
138	3.90	1	1	1
139	3.92	1	1	1
140	3.94	1	1	1
141	3.96	1	1	1
142	3.98	1	1	1
143	4.00	1	1	1
144	4.02	1	1	1
145	4.04	1	1	1
146	4.06	1	1	1
147	4.08	1	1	1
148	4.10	1	1	1
149	4.12	1	1	1
150	4.14	1	1	1
151	4.16	1	1	1
152	4.18	1	1	1
153	4.20	1	1	1
154	4.22	1	1	1
155	4.24	1	1	1
156	4.26	1	1	1
157	4.28	1	1	1
158	4.30	1	1	1
159	4.32	1	1	1
160	4.34	1	1	1
161	4.36	1	1	1
162	4.38	1	1	1
163	4.40	1	1	1
164	4.42	1	1	1
165	4.44	1	1	1
166	4.46	1	1	1
167	4.48	1	1	1
168	4.50	1	1	1
169	4.52	1	1	1
170	4.54	1	1	1
171	4.56	1	1	1
172	4.58	1	1	1
173	4.60	1	1	1
174	4.62	1	1	1
175	4.64	1	1	1
176	4.66	1	1	1
177	4.68	1	1	1
178	4.70	1	1	1
179	4.72	1	1	1
180	4.74	1	1	1
181	4.76	1	1	1
182	4.78	1	1	1
183	4.80	1	1	1
184	4.82	1	1	1
185	4.84	1	1	1
186	4.86	1	1	1
187	4.88	1	1	1
188	4.90	1	1	1
189	4.92	1	1	1
190	4.94	1	1	1
191	4.96	1	1	1
192	4.98	1	1	1
193	5.00	1	1	1
194	5.02	1	1	1
195	5.04	1	1	1
196	5.06	1	1	1
197	5.08	1	1	1
198	5.10	1	1	1
199	5.12	1	1	1
200	5.14	1	1	1
201	5.16	1	1	1
202	5.18	1	1	1
203	5.20	1	1	1
204	5.22	1	1	1
205	5.24	1	1	1
206	5.26	1	1	1
207	5.28	1	1	1
208	5.30	1	1	1
209	5.32	1	1	1
210	5.34	1	1	1
211	5.36	1	1	1
212	5.38	1	1	1
213	5.40	1	1	1
214	5.42	1	1	1
215	5.44	1	1	1
216	5.46	1	1	1
217	5.48	1	1	1
218	5.50	1	1	1
219	5.52	1	1	1
220	5.54	1	1	1
221	5.56	1	1	1
222	5.58	1	1	1
223	5.60	1	1	1
224	5.62	1	1	1
225	5.64	1	1	1
226	5.66	1	1	1
227	5.68	1	1	1
228	5.70	1	1	1
229	5.72	1	1	1
230	5.74	1	1	1
231	5.76	1	1	1
232	5.78	1	1	1
233	5.80	1	1	1
234	5.82	1	1	1
235	5.84	1	1	1
236	5.86	1	1	1
237	5.88	1	1	1
238	5.90	1	1	1
239	5.92	1	1	1
240	5.94	1	1	1
241	5.96	1	1	1
242	5.98	1	1	1
243	6.00	1	1	1
244	6.02	1	1	1
245	6.04	1	1	1
246	6.06	1	1	1
247	6.08	1	1	1
248	6.10	1	1	1
249	6.12	1	1	1
250	6.14	1	1	1
251	6.16	1	1	1
252	6.18	1	1	1
253	6.20	1	1	1
254	6.22	1	1	1
255	6.24	1	1	1
256	6.26	1	1	1
257	6.28	1	1	1
258	6.30	1	1	1
259	6.32	1	1	1
260	6.34	1	1	1
261	6.36	1	1	1
262	6.38	1	1	1
263	6.40	1	1	1
264	6.42	1	1	1
265	6.44	1	1	1
266	6.46	1	1	1
267	6.48	1	1	1
268	6.50	1	1	1
269	6.52	1	1	1
270	6.54	1	1	1
271	6.56	1	1	1
272	6.58	1	1	1
273	6.60	1	1	1
274	6.62	1	1	1
275	6.64	1	1	1
276	6.66	1	1	1
277	6.68	1	1	1
278	6.70	1	1	1
279	6.72	1	1	1
280	6.74	1	1	1
281	6.76	1	1	1
282	6.78	1	1	1
283	6.80	1	1	1
284	6.82	1	1	1
285	6.84	1	1	1
286	6.86	1	1	1
287	6.88	1	1	1
288	6.90	1	1	1
289	6.92	1	1	1
290	6.94	1	1	1
291	6.96	1	1	1
292	6.98	1	1	1
293	7.00	1	1	1
294	7.02	1	1	1
295	7.04	1	1	1
296	7.06	1	1	1
297	7.08	1	1	1
298	7.10	1	1	1
299	7.12	1	1	1
300	7.14	1	1	1
301	7.16	1	1	1
302	7.18	1	1	1
303	7			



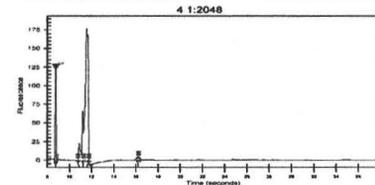
Total Ion Conc.: 84.02 µg/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	Conc. (µg/ml)	Observed
1	4.15	180000	200	84.02	84.02
2	4.25	10000	10	1.13	1.13
3	4.35	5000	5	0.56	0.56
4	4.45	2000	2	0.23	0.23
5	4.55	1000	1	0.12	0.12
6	4.65	500	0.5	0.06	0.06
7	4.75	200	0.2	0.02	0.02
8	4.85	100	0.1	0.01	0.01
9	4.95	50	0.05	0.00	0.00
10	5.05	20	0.02	0.00	0.00
11	5.15	10	0.01	0.00	0.00
12	5.25	5	0.00	0.00	0.00
13	5.35	2	0.00	0.00	0.00
14	5.45	1	0.00	0.00	0.00
15	5.55	0.5	0.00	0.00	0.00
16	5.65	0.2	0.00	0.00	0.00
17	5.75	0.1	0.00	0.00	0.00
18	5.85	0.05	0.00	0.00	0.00
19	5.95	0.02	0.00	0.00	0.00
20	6.05	0.01	0.00	0.00	0.00



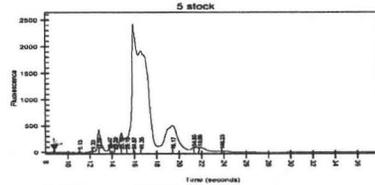
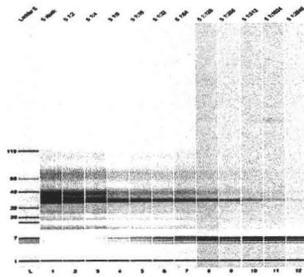
Total Ion Conc.: 11.96 µg/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	Conc. (µg/ml)	Observed
1	4.15	180000	200	11.96	11.96
2	4.25	10000	10	1.13	1.13
3	4.35	5000	5	0.56	0.56
4	4.45	2000	2	0.23	0.23
5	4.55	1000	1	0.12	0.12
6	4.65	500	0.5	0.06	0.06
7	4.75	200	0.2	0.02	0.02
8	4.85	100	0.1	0.01	0.01
9	4.95	50	0.05	0.00	0.00
10	5.05	20	0.02	0.00	0.00
11	5.15	10	0.01	0.00	0.00
12	5.25	5	0.00	0.00	0.00
13	5.35	2	0.00	0.00	0.00
14	5.45	1	0.00	0.00	0.00
15	5.55	0.5	0.00	0.00	0.00
16	5.65	0.2	0.00	0.00	0.00
17	5.75	0.1	0.00	0.00	0.00
18	5.85	0.05	0.00	0.00	0.00
19	5.95	0.02	0.00	0.00	0.00
20	6.05	0.01	0.00	0.00	0.00



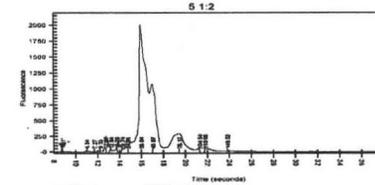
Total Ion Conc.: 0.09 µg/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	Conc. (µg/ml)	Observed
1	4.15	180000	200	0.09	0.09
2	4.25	10000	10	1.13	1.13
3	4.35	5000	5	0.56	0.56
4	4.45	2000	2	0.23	0.23
5	4.55	1000	1	0.12	0.12
6	4.65	500	0.5	0.06	0.06
7	4.75	200	0.2	0.02	0.02
8	4.85	100	0.1	0.01	0.01
9	4.95	50	0.05	0.00	0.00
10	5.05	20	0.02	0.00	0.00
11	5.15	10	0.01	0.00	0.00
12	5.25	5	0.00	0.00	0.00
13	5.35	2	0.00	0.00	0.00
14	5.45	1	0.00	0.00	0.00
15	5.55	0.5	0.00	0.00	0.00
16	5.65	0.2	0.00	0.00	0.00
17	5.75	0.1	0.00	0.00	0.00
18	5.85	0.05	0.00	0.00	0.00
19	5.95	0.02	0.00	0.00	0.00
20	6.05	0.01	0.00	0.00	0.00



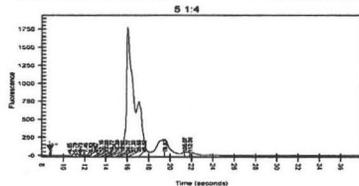
Total Ion Conc.: 3396.2 µg/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	Conc. (µg/ml)	Observed
1	5.56	2400000	2500	3396.2	3396.2
2	5.66	100000	100	136.8	136.8
3	5.76	50000	50	68.4	68.4
4	5.86	20000	20	27.4	27.4
5	5.96	10000	10	13.7	13.7
6	6.06	5000	5	6.8	6.8
7	6.16	2000	2	2.7	2.7
8	6.26	1000	1	1.4	1.4
9	6.36	500	0.5	0.7	0.7
10	6.46	200	0.2	0.3	0.3
11	6.56	100	0.1	0.1	0.1
12	6.66	50	0.05	0.05	0.05
13	6.76	20	0.02	0.02	0.02
14	6.86	10	0.01	0.01	0.01
15	6.96	5	0.00	0.00	0.00
16	7.06	2	0.00	0.00	0.00
17	7.16	1	0.00	0.00	0.00
18	7.26	0.5	0.00	0.00	0.00
19	7.36	0.2	0.00	0.00	0.00
20	7.46	0.1	0.00	0.00	0.00



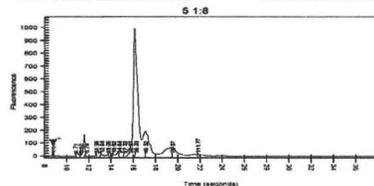
Total Ion Conc.: 4970.71 µg/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	Conc. (µg/ml)	Observed
1	6.12	2400000	2500	4970.71	4970.71
2	6.22	100000	100	203.6	203.6
3	6.32	50000	50	101.8	101.8
4	6.42	20000	20	40.7	40.7
5	6.52	10000	10	20.4	20.4
6	6.62	5000	5	10.2	10.2
7	6.72	2000	2	4.1	4.1
8	6.82	1000	1	2.0	2.0
9	6.92	500	0.5	1.0	1.0
10	7.02	200	0.2	0.4	0.4
11	7.12	100	0.1	0.2	0.2
12	7.22	50	0.05	0.1	0.1
13	7.32	20	0.02	0.04	0.04
14	7.42	10	0.01	0.02	0.02
15	7.52	5	0.00	0.01	0.01
16	7.62	2	0.00	0.00	0.00
17	7.72	1	0.00	0.00	0.00
18	7.82	0.5	0.00	0.00	0.00
19	7.92	0.2	0.00	0.00	0.00
20	8.02	0.1	0.00	0.00	0.00



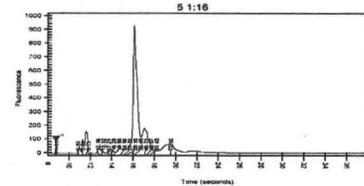
Total Ion Count: 11148.04 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observations
1	0.12	100	100	1.00	
2	0.15	150	150	1.00	
3	0.18	200	200	1.00	
4	0.21	250	250	1.00	
5	0.24	300	300	1.00	
6	0.27	350	350	1.00	
7	0.30	400	400	1.00	
8	0.33	450	450	1.00	
9	0.36	500	500	1.00	
10	0.39	550	550	1.00	
11	0.42	600	600	1.00	
12	0.45	650	650	1.00	
13	0.48	700	700	1.00	
14	0.51	750	750	1.00	
15	0.54	800	800	1.00	
16	0.57	850	850	1.00	
17	0.60	900	900	1.00	
18	0.63	950	950	1.00	
19	0.66	1000	1000	1.00	
20	0.69	1050	1050	1.00	
21	0.72	1100	1100	1.00	
22	0.75	1150	1150	1.00	
23	0.78	1200	1200	1.00	
24	0.81	1250	1250	1.00	
25	0.84	1300	1300	1.00	
26	0.87	1350	1350	1.00	
27	0.90	1400	1400	1.00	
28	0.93	1450	1450	1.00	
29	0.96	1500	1500	1.00	
30	0.99	1550	1550	1.00	
31	1.02	1600	1600	1.00	
32	1.05	1650	1650	1.00	
33	1.08	1700	1700	1.00	
34	1.11	1750	1750	1.00	



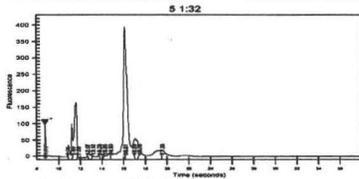
Total Ion Count: 5416.9 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observations
1	0.12	100	100	1.00	
2	0.15	150	150	1.00	
3	0.18	200	200	1.00	
4	0.21	250	250	1.00	
5	0.24	300	300	1.00	
6	0.27	350	350	1.00	
7	0.30	400	400	1.00	
8	0.33	450	450	1.00	
9	0.36	500	500	1.00	
10	0.39	550	550	1.00	
11	0.42	600	600	1.00	
12	0.45	650	650	1.00	
13	0.48	700	700	1.00	
14	0.51	750	750	1.00	
15	0.54	800	800	1.00	
16	0.57	850	850	1.00	
17	0.60	900	900	1.00	
18	0.63	950	950	1.00	
19	0.66	1000	1000	1.00	
20	0.69	1050	1050	1.00	
21	0.72	1100	1100	1.00	
22	0.75	1150	1150	1.00	
23	0.78	1200	1200	1.00	
24	0.81	1250	1250	1.00	
25	0.84	1300	1300	1.00	
26	0.87	1350	1350	1.00	
27	0.90	1400	1400	1.00	
28	0.93	1450	1450	1.00	
29	0.96	1500	1500	1.00	
30	0.99	1550	1550	1.00	
31	1.02	1600	1600	1.00	
32	1.05	1650	1650	1.00	
33	1.08	1700	1700	1.00	
34	1.11	1750	1750	1.00	



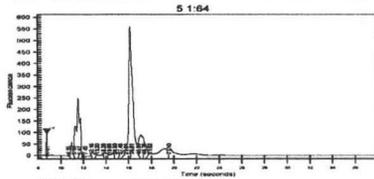
Total Ion Count: 3973.62 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observations
1	0.12	100	100	1.00	
2	0.15	150	150	1.00	
3	0.18	200	200	1.00	
4	0.21	250	250	1.00	
5	0.24	300	300	1.00	
6	0.27	350	350	1.00	
7	0.30	400	400	1.00	
8	0.33	450	450	1.00	
9	0.36	500	500	1.00	
10	0.39	550	550	1.00	
11	0.42	600	600	1.00	
12	0.45	650	650	1.00	
13	0.48	700	700	1.00	
14	0.51	750	750	1.00	
15	0.54	800	800	1.00	
16	0.57	850	850	1.00	
17	0.60	900	900	1.00	
18	0.63	950	950	1.00	
19	0.66	1000	1000	1.00	
20	0.69	1050	1050	1.00	
21	0.72	1100	1100	1.00	
22	0.75	1150	1150	1.00	
23	0.78	1200	1200	1.00	
24	0.81	1250	1250	1.00	
25	0.84	1300	1300	1.00	
26	0.87	1350	1350	1.00	
27	0.90	1400	1400	1.00	
28	0.93	1450	1450	1.00	
29	0.96	1500	1500	1.00	
30	0.99	1550	1550	1.00	
31	1.02	1600	1600	1.00	
32	1.05	1650	1650	1.00	
33	1.08	1700	1700	1.00	
34	1.11	1750	1750	1.00	



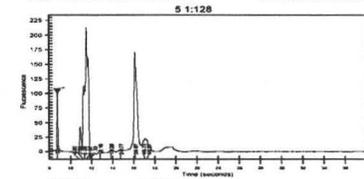
Total Ion Count: 1028.34 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observations
1	0.12	100	100	1.00	
2	0.15	150	150	1.00	
3	0.18	200	200	1.00	
4	0.21	250	250	1.00	
5	0.24	300	300	1.00	
6	0.27	350	350	1.00	
7	0.30	400	400	1.00	
8	0.33	450	450	1.00	
9	0.36	500	500	1.00	
10	0.39	550	550	1.00	
11	0.42	600	600	1.00	
12	0.45	650	650	1.00	
13	0.48	700	700	1.00	
14	0.51	750	750	1.00	
15	0.54	800	800	1.00	
16	0.57	850	850	1.00	
17	0.60	900	900	1.00	
18	0.63	950	950	1.00	
19	0.66	1000	1000	1.00	
20	0.69	1050	1050	1.00	
21	0.72	1100	1100	1.00	
22	0.75	1150	1150	1.00	
23	0.78	1200	1200	1.00	
24	0.81	1250	1250	1.00	
25	0.84	1300	1300	1.00	
26	0.87	1350	1350	1.00	
27	0.90	1400	1400	1.00	
28	0.93	1450	1450	1.00	
29	0.96	1500	1500	1.00	
30	0.99	1550	1550	1.00	
31	1.02	1600	1600	1.00	
32	1.05	1650	1650	1.00	
33	1.08	1700	1700	1.00	
34	1.11	1750	1750	1.00	



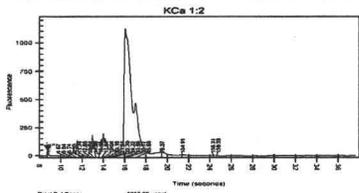
Total Ion Count: 4617.66 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observations
1	0.12	100	100	1.00	
2	0.15	150	150	1.00	
3	0.18	200	200	1.00	
4	0.21	250	250	1.00	
5	0.24	300	300	1.00	
6	0.27	350	350	1.00	
7	0.30	400	400	1.00	
8	0.33	450	450	1.00	
9	0.36	500	500	1.00	
10	0.39	550	550	1.00	
11	0.42	600	600	1.00	
12	0.45	650	650	1.00	
13	0.48	700	700	1.00	
14	0.51	750	750	1.00	
15	0.54	800	800	1.00	
16	0.57	850	850	1.00	
17	0.60	900	900	1.00	
18	0.63	950	950	1.00	
19	0.66	1000	1000	1.00	
20	0.69	1050	1050	1.00	
21	0.72	1100	1100	1.00	
22	0.75	1150	1150	1.00	
23	0.78	1200	1200	1.00	
24	0.81	1250	1250	1.00	
25	0.84	1300	1300	1.00	
26	0.87	1350	1350	1.00	
27	0.90	1400	1400	1.00	
28	0.93	1450	1450	1.00	
29	0.96	1500	1500	1.00	
30	0.99	1550	1550	1.00	
31	1.02	1600	1600	1.00	
32	1.05	1650	1650	1.00	
33	1.08	1700	1700	1.00	
34	1.11	1750	1750	1.00	



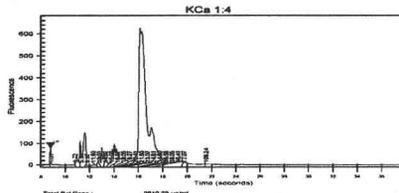
Total Ion Count: 148.96 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observations
1	0.12	100	100	1.00	
2	0.15	150	150	1.00	
3	0.18	200	200	1.00	
4	0.21	250	250	1.00	
5	0.24	300	300	1.00	
6	0.27	350	350	1.00	
7	0.30	400	400	1.00	
8	0.33	450	450	1.00	
9	0.36	500	500	1.00	
10	0.39	550	550	1.00	
11	0.42	600	600	1.00	
12	0.45	650	650	1.00	
13	0.48	700	700	1.00	
14	0.51	750	750		



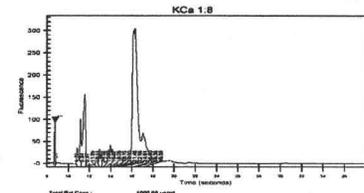
Total Ref Conc: 2998.82 ug/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	%Purity	Height	Conc./Area	Observations
1	10.5	1000	1000	100	1000	1000	
2	11.0	50	50	5	50	50	
3	11.5	50	50	5	50	50	
4	12.0	50	50	5	50	50	
5	12.5	50	50	5	50	50	
6	13.0	50	50	5	50	50	
7	13.5	50	50	5	50	50	
8	14.0	50	50	5	50	50	
9	14.5	50	50	5	50	50	
10	15.0	50	50	5	50	50	
11	15.5	50	50	5	50	50	
12	16.0	50	50	5	50	50	
13	16.5	50	50	5	50	50	
14	17.0	50	50	5	50	50	
15	17.5	50	50	5	50	50	
16	18.0	50	50	5	50	50	
17	18.5	50	50	5	50	50	
18	19.0	50	50	5	50	50	
19	19.5	50	50	5	50	50	
20	20.0	50	50	5	50	50	



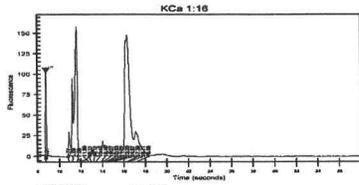
Total Ref Conc: 2910.22 ug/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	%Purity	Height	Conc./Area	Observations
1	10.5	550	550	100	550	550	
2	11.0	50	50	5	50	50	
3	11.5	50	50	5	50	50	
4	12.0	50	50	5	50	50	
5	12.5	50	50	5	50	50	
6	13.0	50	50	5	50	50	
7	13.5	50	50	5	50	50	
8	14.0	50	50	5	50	50	
9	14.5	50	50	5	50	50	
10	15.0	50	50	5	50	50	
11	15.5	50	50	5	50	50	
12	16.0	50	50	5	50	50	
13	16.5	50	50	5	50	50	
14	17.0	50	50	5	50	50	
15	17.5	50	50	5	50	50	
16	18.0	50	50	5	50	50	
17	18.5	50	50	5	50	50	
18	19.0	50	50	5	50	50	
19	19.5	50	50	5	50	50	
20	20.0	50	50	5	50	50	



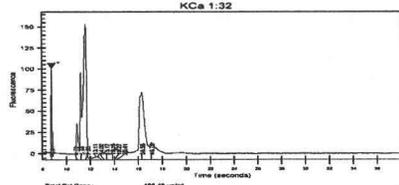
Total Ref Conc: 1592.06 ug/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	%Purity	Height	Conc./Area	Observations
1	10.5	250	250	100	250	250	
2	11.0	50	50	5	50	50	
3	11.5	50	50	5	50	50	
4	12.0	50	50	5	50	50	
5	12.5	50	50	5	50	50	
6	13.0	50	50	5	50	50	
7	13.5	50	50	5	50	50	
8	14.0	50	50	5	50	50	
9	14.5	50	50	5	50	50	
10	15.0	50	50	5	50	50	
11	15.5	50	50	5	50	50	
12	16.0	50	50	5	50	50	
13	16.5	50	50	5	50	50	
14	17.0	50	50	5	50	50	
15	17.5	50	50	5	50	50	
16	18.0	50	50	5	50	50	
17	18.5	50	50	5	50	50	
18	19.0	50	50	5	50	50	
19	19.5	50	50	5	50	50	
20	20.0	50	50	5	50	50	



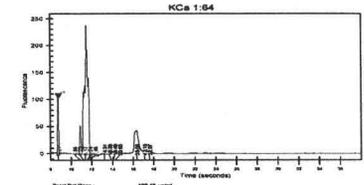
Total Ref Conc: 488.88 ug/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	%Purity	Height	Conc./Area	Observations
1	10.5	100	100	100	100	100	
2	11.0	50	50	5	50	50	
3	11.5	50	50	5	50	50	
4	12.0	50	50	5	50	50	
5	12.5	50	50	5	50	50	
6	13.0	50	50	5	50	50	
7	13.5	50	50	5	50	50	
8	14.0	50	50	5	50	50	
9	14.5	50	50	5	50	50	
10	15.0	50	50	5	50	50	
11	15.5	50	50	5	50	50	
12	16.0	50	50	5	50	50	
13	16.5	50	50	5	50	50	
14	17.0	50	50	5	50	50	
15	17.5	50	50	5	50	50	
16	18.0	50	50	5	50	50	
17	18.5	50	50	5	50	50	
18	19.0	50	50	5	50	50	
19	19.5	50	50	5	50	50	
20	20.0	50	50	5	50	50	



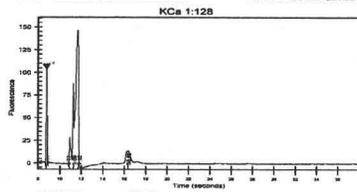
Total Ref Conc: 155.48 ug/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	%Purity	Height	Conc./Area	Observations
1	10.5	100	100	100	100	100	
2	11.0	50	50	5	50	50	
3	11.5	50	50	5	50	50	
4	12.0	50	50	5	50	50	
5	12.5	50	50	5	50	50	
6	13.0	50	50	5	50	50	
7	13.5	50	50	5	50	50	
8	14.0	50	50	5	50	50	
9	14.5	50	50	5	50	50	
10	15.0	50	50	5	50	50	
11	15.5	50	50	5	50	50	
12	16.0	50	50	5	50	50	
13	16.5	50	50	5	50	50	
14	17.0	50	50	5	50	50	
15	17.5	50	50	5	50	50	
16	18.0	50	50	5	50	50	
17	18.5	50	50	5	50	50	
18	19.0	50	50	5	50	50	
19	19.5	50	50	5	50	50	
20	20.0	50	50	5	50	50	



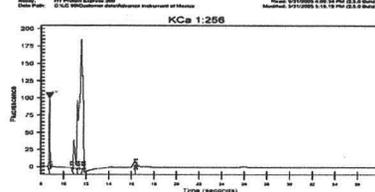
Total Ref Conc: 108.12 ug/ml

Peak	RT (min)	Area	Height	%Purity	Height	Conc./Area	Observations
1	10.5	100	100	100	100	100	
2	11.0	50	50	5	50	50	
3	11.5	50	50	5	50	50	
4	12.0	50	50	5	50	50	
5	12.5	50	50	5	50	50	
6	13.0	50	50	5	50	50	
7	13.5	50	50	5	50	50	
8	14.0	50	50	5	50	50	
9	14.5	50	50	5	50	50	
10	15.0	50	50	5	50	50	
11	15.5	50	50	5	50	50	
12	16.0	50	50	5	50	50	
13	16.5	50	50	5	50	50	
14	17.0	50	50	5	50	50	
15	17.5	50	50	5	50	50	
16	18.0	50	50	5	50	50	
17	18.5	50	50	5	50	50	
18	19.0	50	50	5	50	50	
19	19.5	50	50	5	50	50	
20	20.0	50	50	5	50	50	



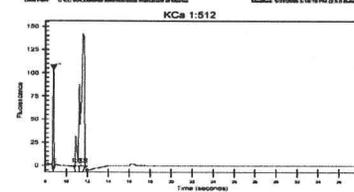
Total Ref Comp: 27.4 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observation
1	10.0	140000	140	1.0	Major Peak
2	27.4	10000	10	1.0	Minor Peak



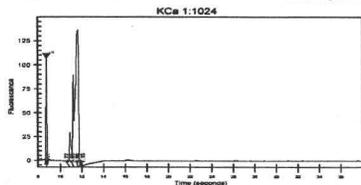
Total Ref Comp: 11.4 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observation
1	10.0	180000	180	1.0	Major Peak
2	11.4	10000	10	1.0	Minor Peak



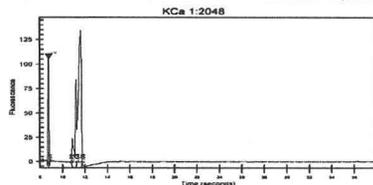
Total Ref Comp: 15.12 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observation
1	10.0	140000	140	1.0	Major Peak
2	15.12	10000	10	1.0	Minor Peak



Total Ref Comp: 10.24 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observation
1	10.0	120000	120	1.0	Major Peak
2	10.24	10000	10	1.0	Minor Peak



Total Ref Comp: 10.24 µg/ml

Peak	Retention Time (min)	Area	Height	Resolution	Observation
1	10.0	120000	120	1.0	Major Peak
2	10.24	10000	10	1.0	Minor Peak

