



UNIVERSIDAD NACIONAL **UN/M**
AUTÓNOMA DE MÉXICO **POSGRADO** 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

APLICACIÓN DEL ESTAMPADO MOLECULAR
EN LA RECUPERACIÓN DE LACTOFERRINA A
PARTIR DE SUERO DE LECHE

T E S I S

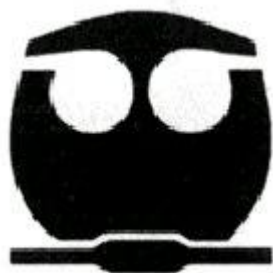
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

IRIS ADRIANA MÉNDEZ PALACIOS

Tutor: DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA



MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2007



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.

Dedicatorias

*Quiero dedicar este trabajo a mi esposo **Rodrigo Pérez** porque él fue la fuerza que mantuvo de pie para poder culminar este proyecto de mi vida.*

Gracias mi amor por permanecer a mi lado, por darme ánimos para continuar y terminar mi maestría, por tu apoyo incondicional, por tus consejos, tu paciencia y sobretodo por tu gran amor.

Siempre te estaré agradecida por todo lo que me has enseñado y por lo que me has amado.

*Este logro es de los dos, porque sin ti no lo hubiera logrado.
Te amo mi Rorro.*

APLICACIÓN DEL ESTAMPADO MOLECULAR EN LA RECUPERACIÓN DE LACTOFERRINA A PARTIR DE SUERO DE LECHE

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Eduardo Bárzana García en el laboratorio de Biotecnología 314 conjunto "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eduardo Bárzana García	Facultad de Química, UNAM
Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Dr. José Mariano García Garibay	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Dr. Mario Calcagno Montans y Georgina Garza Ramos del Departamento de Bioquímica laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de purificación y estabilidad de la proteína Lactoferrina.

Se reconoce la asesoría técnica de la LIBB. Valeria Guzmán Luna en los experimentos de purificación y estabilidad de la proteína Lactoferrina y del Dr. Miquel Gimeno en la síntesis del Estampado Molecular.

Se reconoce la asesoría del Q.F.B. Luis Blancas Mejía y Q.FB. Martín González Andrade.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (34815-N, 41328-Q) y PAEP-UNAM (030539, 202352). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. José Mariano García Garibay	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	M.C. Ángeles Valdivia López	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Ismael Bustos Jaimes	Facultad de Medicina, UNAM

Agradecimientos

A Dios:

Gracias por permanecer a mi lado y por permitirme una vez más cumplir una de las metas que me he propuesto a lo largo de mi vida.

A mis padres:

Mamá sabes que todos los logros que obtenido te los debo a ti. Gracias por ser mi mamá y por todo lo que has hecho por mí. Te amo.

Papá te acuerdas de mi frase “Pa y si no me quedo en la UNAM ¿vas a seguir confiando en mí?”. Una vez más gracias por apoyarme y por creer en mí. Te amo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por darme la oportunidad de estudiar una maestría y darme todas las facilidades para poder concluirla. Es un orgullo pertenecer a la “Máxima casa de estudios”.

Al Dr. Eduardo Bárzana García:

Por su confianza y por dirigir y apoyar el presente proyecto de investigación.

A mi comité tutorial:

Gracias por su guía y sus consejos a lo largo de la maestría.

Al Dr. Alejandro Fernández:

Por su apoyo y sabios consejos, así como, las facilidades otorgadas para la realización de la presente.

A mi amiga Valeria Guzmán:

Por el tiempo dedicado a enseñarme varias metodologías, por su paciencia y su gran ayuda.

A mis compañeros del laboratorio 314 de la Facultad de Química:

Brenda, Polita, Alberto, Francisco y más.....Gracias.

A mis sinodales:

Por su disposición y tiempo en la revisión y corrección de mi trabajo, así como, sus acertadas observaciones al mismo.

INDICE

Capítulo	Página
1. Introducción.....	3
1.1 Justificación.....	4
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
1.3 Hipótesis.....	5
2. Antecedentes.....	6
2.1 Importancia de la leche como alimento funcional.....	6
2.2 Proteínas de la leche.....	7
2.2.1 Caseínas.....	8
2.2.2 Proteínas del suero de leche.....	9
2.2.3 Lactoferrina	10
2.2.3.1 Estructura de la lactoferrina.....	11
• Secuencia de aminoácidos.....	11
• Plegamiento del polipéptido.....	11
• Sitios de unión Fe ³⁺	14
2.2.3.2 Bioactividad de la lactoferrina.....	15
2.3 Técnica de Estampado Molecular.....	16
2.3.1 Monómeros funcionales.....	18
2.3.2 Agentes entrecruzantes.....	19
2.3.3 Aplicaciones del estampado molecular.....	20

Capítulo	Página
3. Metodología.....	22
3.1 Diagrama general.....	22
3.2 Purificación de la lactoferrina por cromatografía de intercambio iónico.....	24
3.3 Determinación de pureza por medio de electroforesis.....	24
3.4 Dicroísmo circular.....	24
3.5 Espectroscopía de fluorescencia	25
3.6 Dinámica Molecular.....	25
3.7 Síntesis del polímero estampado molecularmente.....	26
3.7.1 Extracción de la plantilla.....	26
3.7.2 Determinación de la eficiencia de adsorción del polímero.....	26
4. Resultados y Discusión.....	27
4.1 Purificación del patrón de LF.....	27
4.2 Estudio de estabilidad de la LF determinado por dicroísmo circular.....	30
4.2.1 Naturaleza del solvente.....	30
4.2.2 Temperatura.....	31
4.3 Estudio de estabilidad de la LF determinado por fluorescencia.....	35
4.4 Dinámica Molecular.....	40
4.5 Síntesis del polímero estampado molecularmente.....	42
4.6 Eficiencia de sorción del polímero estampado molecularmente.....	43
5. Conclusiones.....	47
6.- Importancia de nuevos hallazgos y aplicaciones.....	48
7. Bibliografía.....	49

Introducción

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína, monomérica, con una masa molecular alrededor de 80 kDa y un pI = 8 (Farnaud y Evans, 2003). Está presente principalmente en el calostro y suero de leche (Tsuda y col., 2000).

La LF es una de las proteínas con mayor valor agregado del suero de leche. Se ha demostrado que esta proteína posee importantes funciones biológicas; entre las principales se encuentran la actividad anticarcinógena, la capacidad de acarrear minerales como el Fe^{3+} , provocando así que los microorganismos no dispongan de él para su proliferación. Sin embargo, purificarla del suero de leche es complicado, debido a que varias proteínas del mismo poseen una forma y un peso molecular similar.

El estampado molecular es una técnica basada en modelos de reconocimiento molecular existentes en sistemas biológicos. Es una metodología basada en la selección de una molécula a estampar (plantilla), la cual se mezcla con una variedad de monómeros funcionales, de manera que formen un complejo estable, el cual es entrecruzado para fijar la posición de los monómeros funcionales alrededor de la plantilla. La remoción de esta molécula da paso a una cavidad que es selectiva para la plantilla y que no reconoce a ninguna otra molécula (Takeuchi y Haginaka, 1999).

El estampado molecular es una técnica que se ha propuesto para el aislamiento de moléculas biológicamente activas como: azúcares, fármacos, pesticidas, péptidos e incluso proteínas, aunque todos los estudios publicados se han realizado en pequeña escala (Rachkov y Minoura, 2001; Piletsky y col., 2001). En general la dificultad para fabricar materiales estampados se incrementa con el tamaño de la molécula seleccionada (Shiomi y col., 2005).

A la fecha existen una gran variedad de metodologías y monómeros propuestos, pero no se ha establecido una técnica específica, por lo que es necesario realizar aproximaciones empíricas utilizando diferentes monómeros y condiciones dependiendo de la molécula a estampar (Rachkov y Minoura, 2001).

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo general desarrollar un polímero estampado molecularmente (MIP) que permita la recuperación selectiva de LF, ya que ésta es una de las proteínas de mayor valor comercial del suero de leche.

1.1 Justificación.

La lactoferrina (LF) es una de las proteínas con mayor valor comercial del suero de leche debido a que ejerce importantes funciones en el ser humano. Lograr su separación a partir del suero de leche es complicado ya que éste contiene una mezcla muy variada de proteínas con propiedades fisicoquímicas similares a la LF.

El estampado molecular podría ser una herramienta útil para establecer una técnica que permita la recuperación selectiva de esta proteína a partir de suero de leche y con ello se obtendrían numerosas ventajas, como por ejemplo, un aumento en el uso comercial de esta proteína con un menor costo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

❖ Sintetizar un polímero estampado molecularmente (MIP) que permita la recuperación selectiva de la lactoferrina (LF) en mezclas complejas.

1.2.2 Objetivos específicos:

❖ Realizar un estudio de estabilidad de la LF tomando como parámetros temperatura, y naturaleza del solvente.

❖ Encontrar la concentración óptima de agente entrecruzante y de molécula plantilla (LF) para desarrollar un MIP.

❖ Comprobar que el MIP es capaz de adsorber específicamente LF a partir de una solución compuesta por varias proteínas, entre ellas la LF.

1.3 Hipótesis

A partir de grupos funcionales específicos en la estructura de LF, es posible construir un MIP capaz de sorber específicamente a esta proteína, con lo que la técnica del estampado molecular podría aplicarse para su purificación a partir de suero de leche.

Antecedentes

2.1 Importancia de la leche como alimento funcional

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

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

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

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

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

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

2.2 Proteínas de la leche.

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

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

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

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

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

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

2.2.1. Caseínas

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

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

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

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

2.2.2 Proteínas del suero de leche.

El suero de leche o suero de queso, es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Se obtiene tras la separación de las caseínas y de la grasa. Constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta. Su composición varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso de que proceda.

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

A diferencia de las caseínas, las proteínas del suero son compactas, globulares, con un peso molecular que varía entre 14,000 y 1, 000,000 Da y son solubles en un intervalo de pH muy amplio (incluso a pH's ácidos). Además, contienen la mayoría de los aminoácidos y tienen un mejor balance de éstos que las propias caseínas, por lo que su valor nutritivo es mayor (Badui, 1993).

2.2.3 Lactoferrina

Las proteínas de la familia de las transferrinas juegan un papel muy importante en el control de los niveles del hierro libre en los fluidos sanguíneos de los mamíferos. Los dos principales miembros de esta familia son las transferrinas del suero y la lactoferrina. Estas proteínas son glicoproteínas, monoméricas y bilobales y poseen un peso molecular alrededor de 80 kDa. Además, poseen la habilidad de ligar a dos iones Fe^{3+} con ayuda de dos iones CO_3^{2-} ; la relación sinérgica entre el metal y el anión es lo que permite que el Fe^{3+} permanezca unido a la proteína, sin embargo, esta unión es reversible y la combinación de una alta afinidad con el mecanismo de liberación del Fe^{3+} es fundamental en la función de las transferrinas y es lo que caracteriza la química de este tipo de proteínas. Existe una gran similitud entre las transferrinas y la lactoferrina, sin embargo, una importante diferencia entre ambas es que ésta última enlaza al Fe^{3+} con mayor fuerza y lo retiene hasta un pH cercano a 3.5, mientras que las transferrinas del suero lo pierden aproximadamente a un pH de 5.5 (Moore y col., 1997; Abdallah y Chahine, 2000).

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

2.2.3.1. Estructura de la lactoferrina.

- Secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de la LF humana (hLF) presenta un 60% de identidad en relación con la secuencia de aminoácidos de las transferrinas del suero y un 70% en relación con las secuencias provenientes de las especies búfalo, bovino, camello, y cabra (Baker y Baker, 2004).

- Plegamiento del polipéptido

La lactoferrina es una glicoproteína, monómerica y bilobal. Su cadena polipeptídica se compone de 690 residuos de aminoácidos, 10 unidades de monosacáridos, 2Fe^{3+} , 2CO_3^{2-} y 50 moléculas de agua y es plegada en dos lóbulos homólogos (N y C) (figura 1) que se encuentran conectados covalentemente por 3 α -hélices (residuos 334-344 en hLF). El N-lóbulo y el C-lóbulo comprenden los residuos 1-333 y 345-690 respectivamente (Sharma y col., 2001; Moore y col., 1997).

Ambos lóbulos tienen una secuencia de identidad del 40% y son subdivididos en dos dominios cada uno (N1 y N2; C1 y C2) (figura 2). Por tanto son 4 dominios los que comprenden a la molécula de lactoferrina N1 (1-90 y 251-333), N2 (91-250), C1 (345-431 y 593-676) y C2 (432-592) (Baker y Baker, 2004; Moore y col., 1997).

Los lóbulos N y C contienen además un sitio de unión para un átomo de Fe^{3+} , el cual se encuentra situado entre las caras internas de los dominios, (fig 1 y 2).

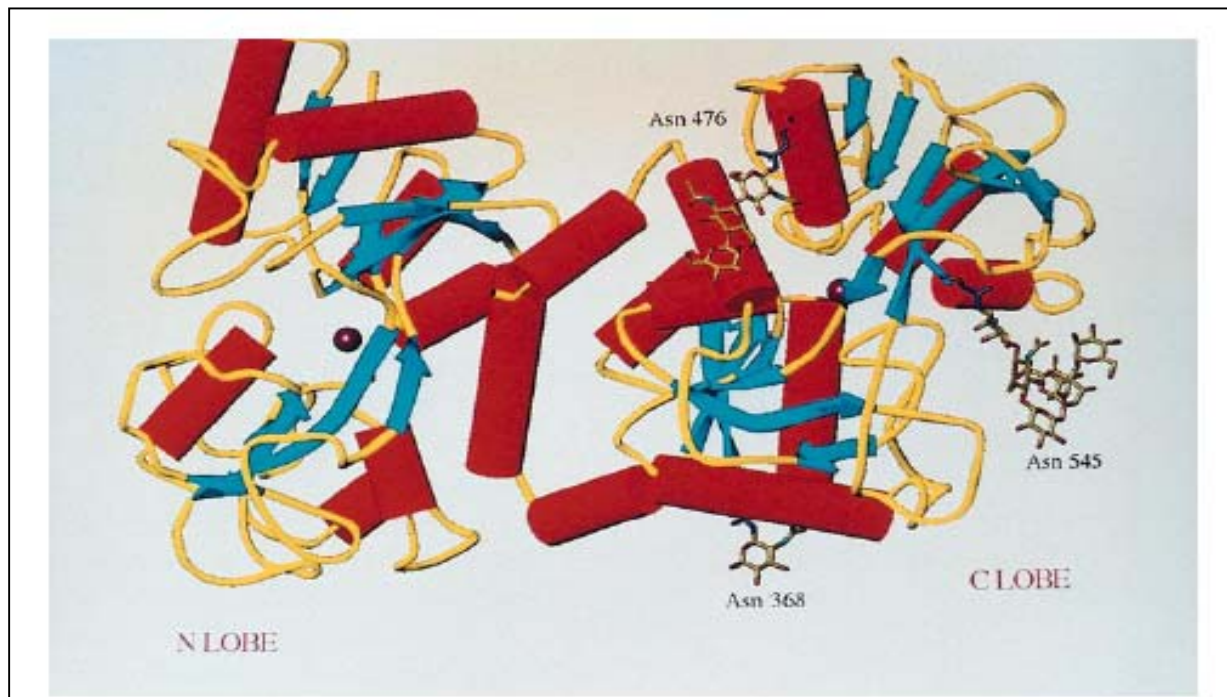


Figura 1. Representación esquemática de la molécula de LF. Las α -hélices son representadas como cilindros, las hojas β como flechas y los átomos de Fe^{3+} como círculos de color púrpura. Representación realizada por el programa Turbo Frodo (Sharma y col., 2001).

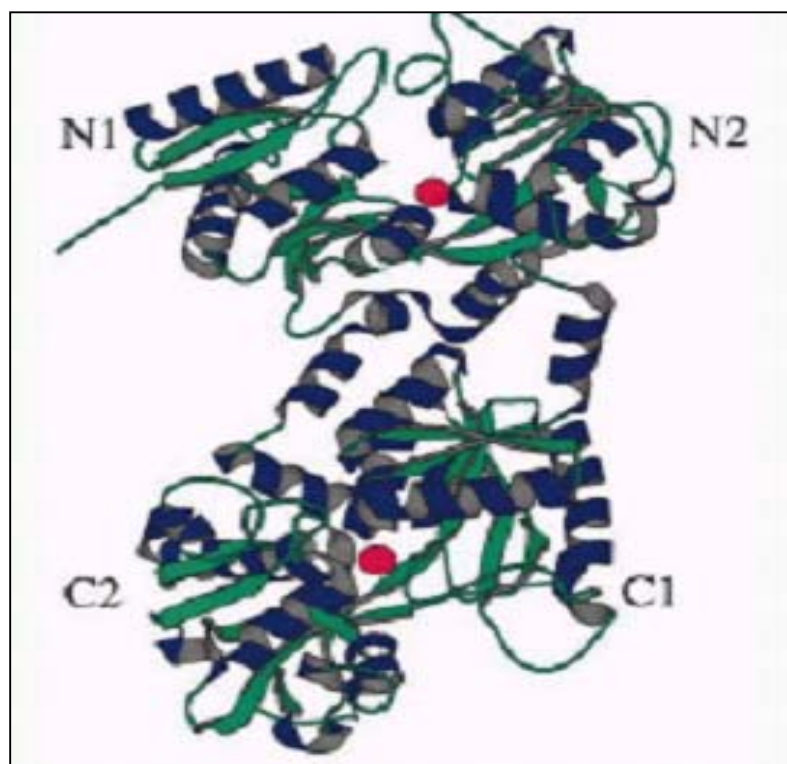


Figura 2. Representación de la molécula de lactoferrina mostrando el plegamiento de los dominios (N1 y N2; C1 y C2) así como la localización de los átomos de Fe^{3+} (círculos rojos) en ambos lóbulos. Representación realizada por el programa BOBSCRIPT (Baker y Baker, 2004).

Los cuatro dominios que conforman la estructura de la lactoferrina poseen una similitud en lo que corresponde a su estructura secundaria. Cada dominio contiene una mezcla central de hojas β (paralelas y antiparalelas) y α -hélices siendo su porcentaje del 24 y 51% respectivamente. Las α -hélices son muy similares en los dos lóbulos a excepción de algunas inserciones que pueden acortar o alargar la cadena de las hélices (figura 3) (Sharma y col., 1998).

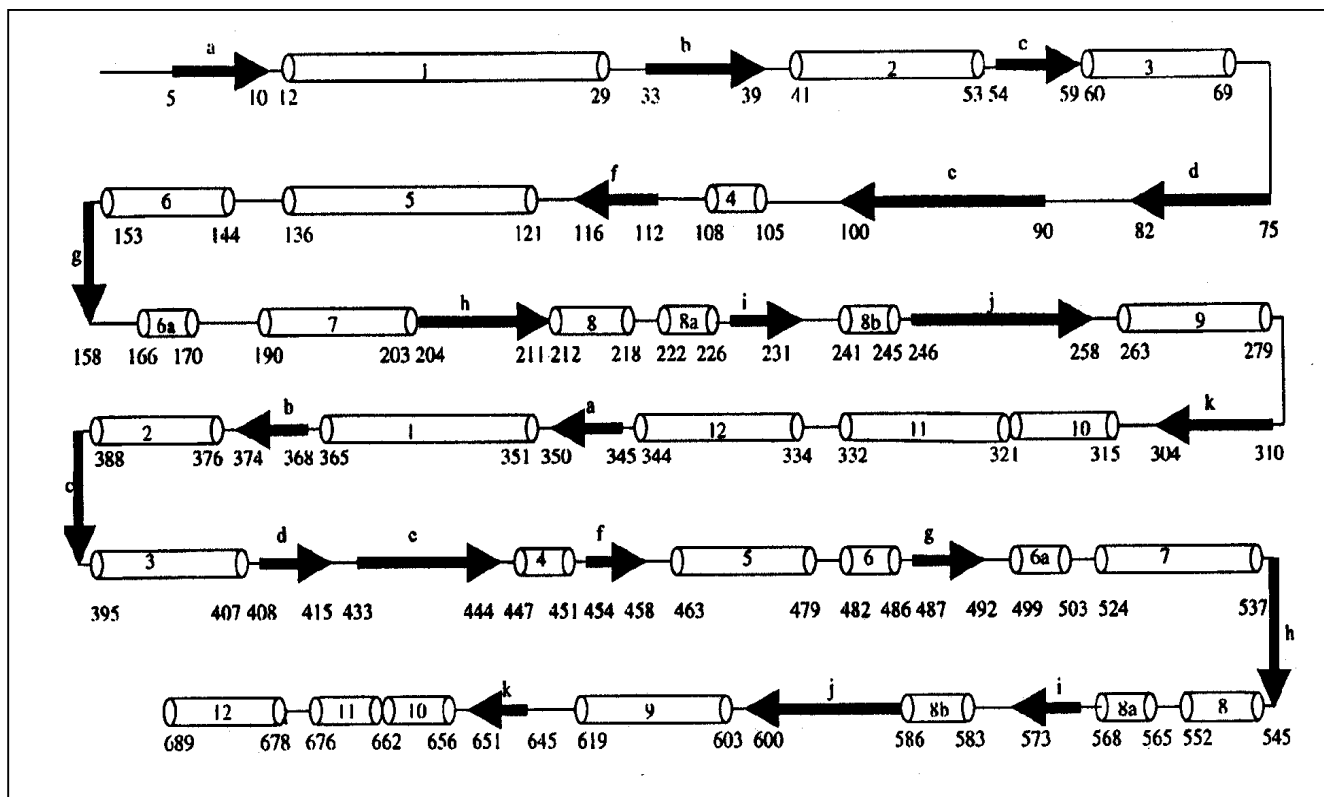


Figura 3. Representación de la estructura secundaria de la lactoferrina bovina. Las α -hélices se encuentran numeradas del 1 al 12 y las hojas β están indicadas de la a a la k. Existen 17 puentes disulfuro dentro de la estructura; 9-45,19-36, 115-198, 157-173, 160-183, 170-181, 231-245, 348-380, 358-371, 405-684, 425-647, 457-532, 481-675, 491-505, 502-515, 573-587 y 625-630 (Sharma y col., 1998).

- Sitios de unión de Fe^{3+} .

La lactoferrina es denominada la proteína roja de la leche debido a que tiene dos sitios activos para ligar un átomo de Fe^{3+} , que le da su color característico.

Cada átomo de Fe^{3+} se encuentra coordinado con cuatro residuos de aminoácidos los cuales corresponden a 2 Tyr, 1 Asp, y 1 His (Tyr 92, Tyr 192, Asp 60, His 253 N-lobulo) y (Tyr 526, Tyr 433, Asp 395, His 595 para el C-lobulo) así como también a un anión CO_3^- (figura 4), (Sharma y col., 2003; Moore y col., 1997). Estos ligandos del Fe^{3+} , son los mismos para cada lóbulo tanto en la lactoferrina como en las transferrinas. La coordinación del Fe^{3+} con este grupo de ligandos posee una química y una geometría perfecta a la de un octaedro, por lo que este sitio de unión posee una alta afinidad por este metal y lo une fuertemente ($K = 10^{-20}$ M) en un proceso reversible (Baker y Baker, 2004).

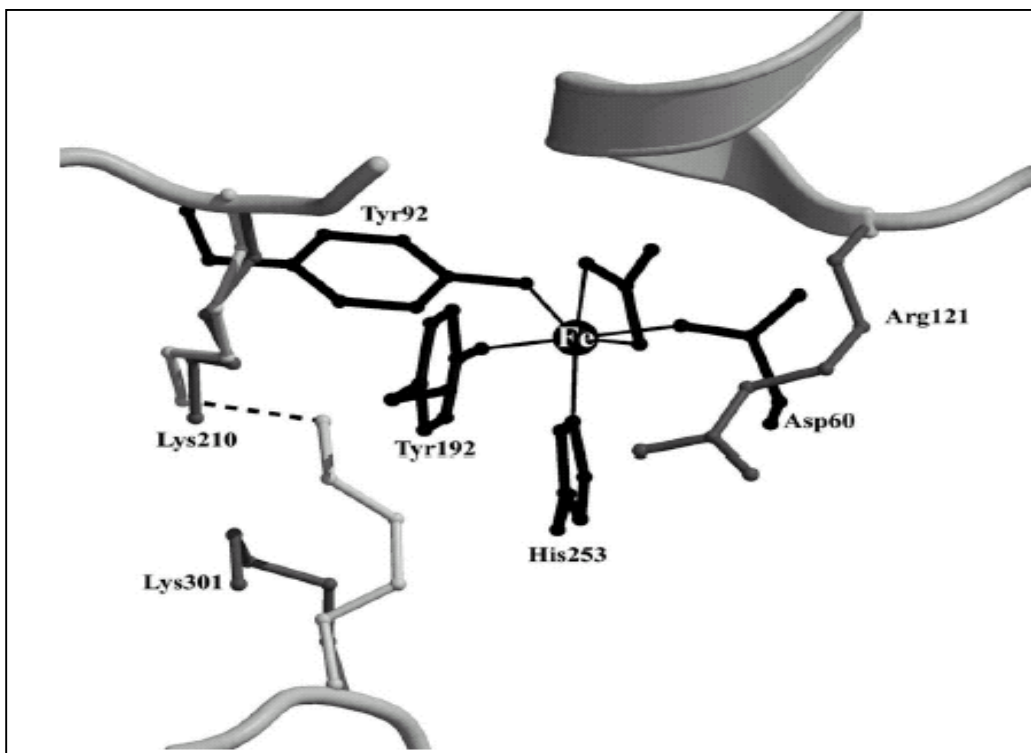


Figura 4. Representación del sitio de unión para el átomo de Fe^{3+} en la molécula de LF, el cual se encuentra coordinado a 2 Tyr, 1 Asp, y 1 His así como también a un anión CO_3^- (Moore y col., 1997).

2.2.3.2. Bioactividad de la lactoferrina.

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

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

Así mismo tiene propiedades anticancerígenas, anti-inflamatorias, anti-virales así como también estimula el sistema inmune (Hsiang y Hsiung, 1999). En 1998 se realizó un estudio, el cual consistía en observar el efecto que poseen las proteínas de la leche en animales que intencionalmente se les produjeron tumores en el colon por inyección de dimetilhidrazina (sustancia que induce cáncer en el colon).

Los resultados que se obtuvieron demostraron que las proteínas del suero de leche (principalmente lactoferrina), tuvieron efectos benéficos retardando la incidencia del cáncer de colon tanto en ratas jóvenes como en ratas maduras, en comparación con otras proteínas como las de la carne o las de soya (Buchhoz y Scheper, 2000).

Esto sugiere que las dietas suplementadas con lactoferrina ejercen una alta protección contra el desarrollo de tumores en el intestino. El mecanismo aparente de ésta actividad anticancerígena se le atribuye a que las proteínas del suero de leche son ricas en aminoácidos sulfurados como cisteína y metionina.

La hipótesis que han establecido es que estos aminoácidos actúan como un sistema protector sobre el DNA (Buchhoz y Scheper, 2000).

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

2.3 Técnica de Estampado Molecular.

La tecnología del estampado molecular o “*Molecular Imprinting Polymer*” (MIP) representa una nueva clase de materiales que han sido creados artificialmente como estructuras receptoras o “cerraduras” para “llaves moleculares”. Resulta ser un método de preparación de polímeros con una selectividad predeterminada para lograr la separación y análisis de una variedad de moléculas biológicamente activas (Rachkov y Minoura, 2001; Albert M, 2001; Castro y col., 2001)).

El estampado molecular consiste en la selección de la molécula a estampar o plantilla, la cual se mezcla con una variedad de monómeros funcionales para construir un complejo monómero-plantilla (llave-cerradura). Las interacciones entre los monómeros funcionales y la molécula objetivo es lo que permite a ambos atarse entre sí. De esta manera, el complejo formado es entrecruzado para fijar la posición de los monómeros alrededor de la plantilla. La remoción de la misma da paso a una cavidad que es selectiva para la molécula estampada y con alta especificidad (Ulbricht y col., 2002; Castro y col., 2001; Takeuchi y Haginaka, 1999).

En la figura 5, se muestra la representación esquemática del proceso de estampado molecular. Al mezclarse en una solución un monómero (o mezcla de monómeros) con funcionalidades químicas complementarias a la plantilla se forman complejos a través de interacciones débiles. La polimerización se lleva a cabo con un agente entrecruzante, seguido por la remoción de la plantilla dando paso a la formación de sitios de reconocimiento complementarios en forma y funcionalidad a la molécula plantilla (Nicholls y col., 2001).

La plantilla, los monómeros funcionales, el entrecruzante y el solvente son elementos clave para obtener un polímero selectivo estampado molecularmente. Todos estos elementos poseen una fuerte influencia en el funcionamiento de los MIPs en términos de afinidad, selectividad, capacidad de enlace, etc. La selección adecuada de los mismos asegurará que los polímeros posean funcionalidades muy específicas dando así como resultado excelentes polímeros estampados molecularmente (Hilt y Byrne, 2004; Zhang y col., 2001)

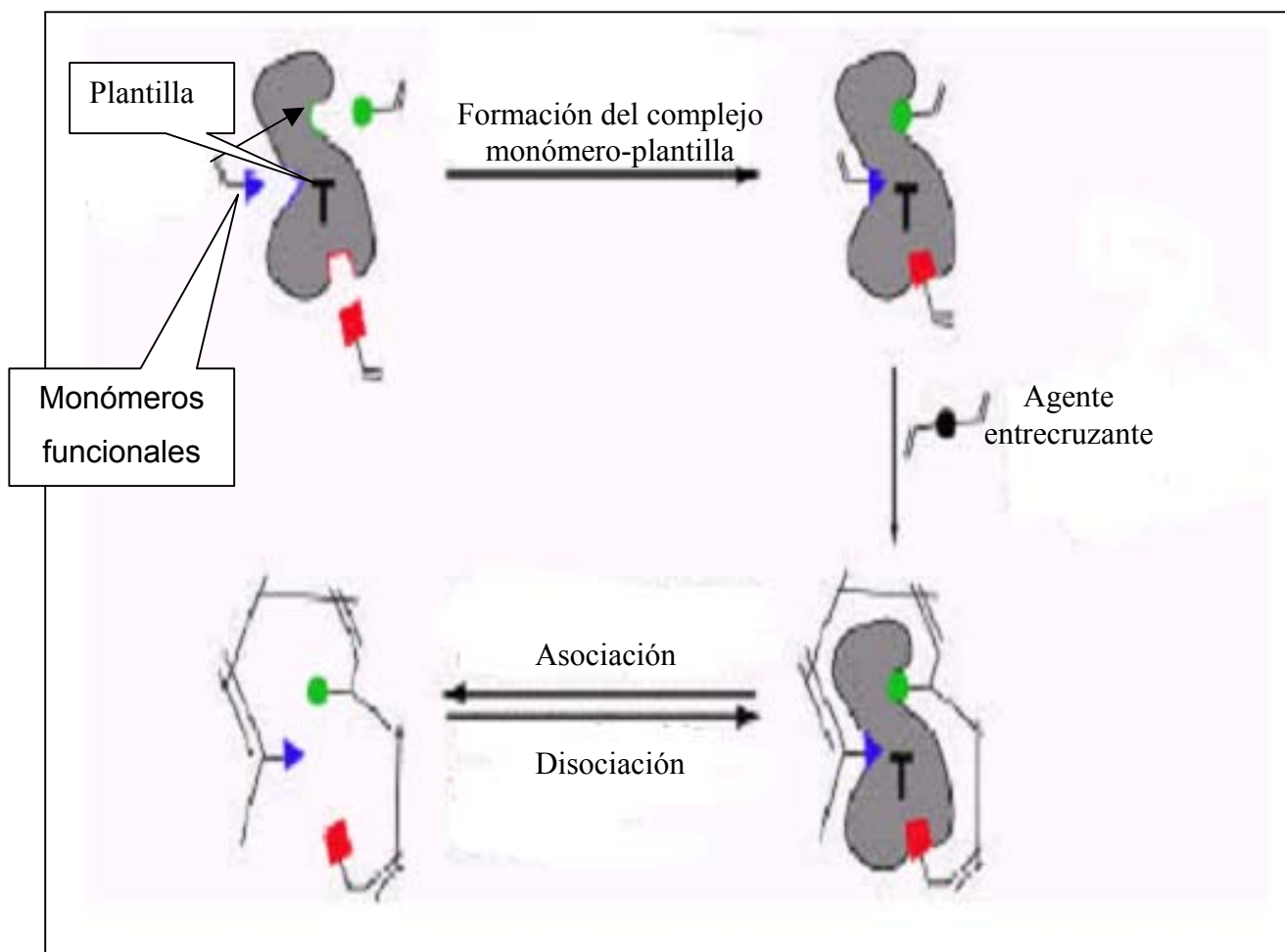
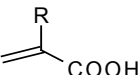
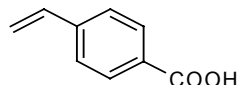
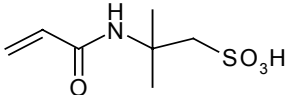
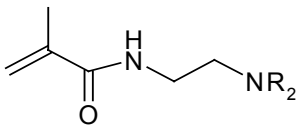
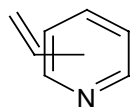

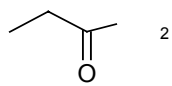


Figura 5. Representación esquemática del proceso de estampado molecular.

2.3.1 Monómeros Funcionales.

La plantilla debe de poseer una estructura química capaz de interactuar con los monómeros funcionales, de tal forma que puedan formar un complejo estable. Hasta ahora el ácido metacrílico (MAA) ha sido el monómero frecuentemente utilizado para la síntesis de MIPs, sin embargo, varios sistemas poliméricos pueden ser desarrollados para usarse en la tecnología de estampado molecular. Por baratos, los sistemas más utilizados son los basados en poliacrilatos o poliacrilamidas. En la tabla 1 se muestran los monómeros funcionales comúnmente utilizados en esta innovadora tecnología (Zhang y col., 2001).

Tabla 1. Monómeros funcionales comúnmente utilizados en la síntesis de polímeros estampados molecularmente (Zhang y col., 2001).

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

2.3.2 Agentes entrecruzantes.

El porcentaje de entrecruzamiento necesario para lograr especificidad es del orden de 70-90%; por ello, solo un número limitado de agentes entrecruzantes pueden ser utilizados (figura 6). No obstante, algunas diferencias entre los agentes de entrecruzamiento han sido probadas con diferentes grados de éxito.

Originalmente los isómeros de divinilbenceno fueron utilizados para el entrecruzamiento de estireno y otros monómeros funcionales en poli-estireno. Después se encontró que sistemas basados en ácido acrílico o metacrílico pueden ser preparados con mayor especificidad si se utiliza como agente entrecruzante el etilenglicol dimetacrilato (EDMA) y el trimetilopropano trimetacrilato (TRIM)) (Nicholls y col., 2001). En la figura 6 se muestran los agentes entrecruzantes comúnmente utilizados.

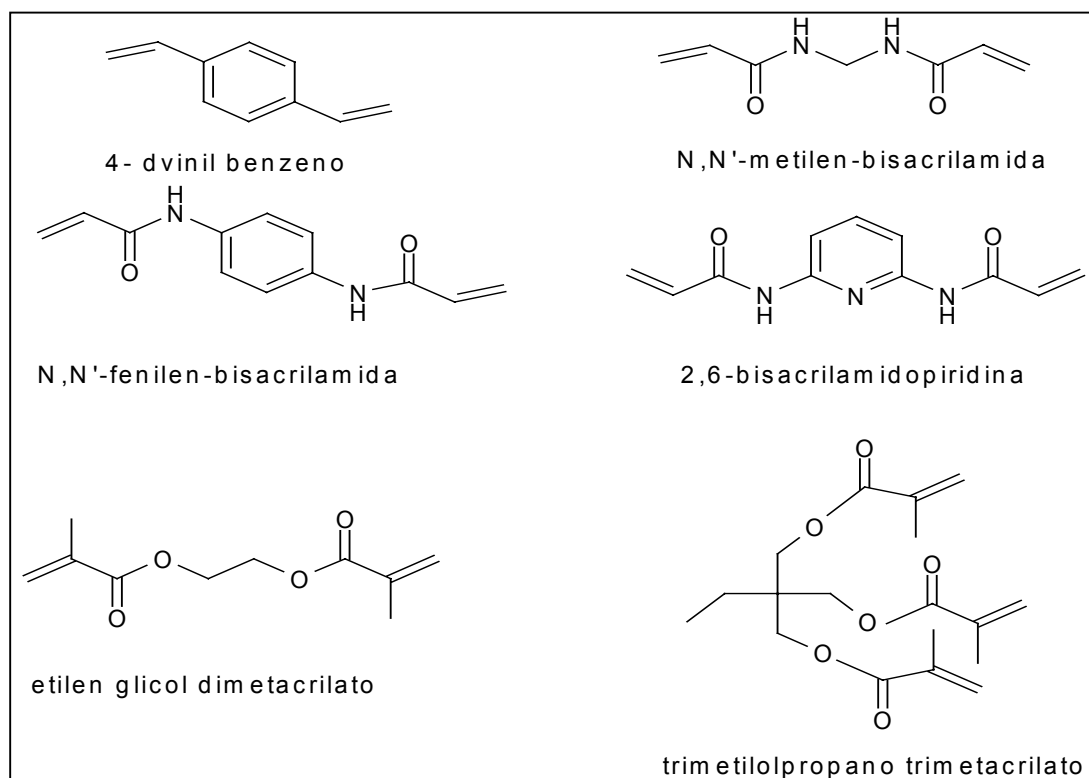


Figura 6. Agentes entrecruzantes comúnmente utilizados en la técnica de Estampado Molecular (Zhang, 2001).

2.3.3 Aplicaciones del estampado molecular.

La molécula objetivo o plantilla puede ser en principio, cualquier tipo de molécula; desde moléculas sencillas de bajo peso molecular, hasta moléculas grandes como proteínas o ácidos nucleicos. Como se menciono previamente, la dificultad de fabricar materiales estampados se incrementa con el tamaño de la molécula seleccionada principalmente en macromoléculas como lo son las proteínas (Shiomi y col., 2005; Rachkov y Minoura, 2001; Chen y col., 2001).

Actualmente se han reportado impresiones moleculares de moléculas como: azúcares, esteroides, herbicidas, alcaloides, drogas, péptidos y proteínas como la lizosima y la seroalbúmina, que son proteínas de bajo peso molecular (Hawkins y col., 2005; Pang y col., 2005; Ou y col., 2004), sin embargo, todos los estudios publicados se han realizado en pequeña escala (Piletsky y col., 2001).

En la figura 7, se muestra el proceso de estampado molecular para el aislamiento de la morfina, utilizando como monómero funcional ácido metacrílico (Hilt y Byrne, 2004).

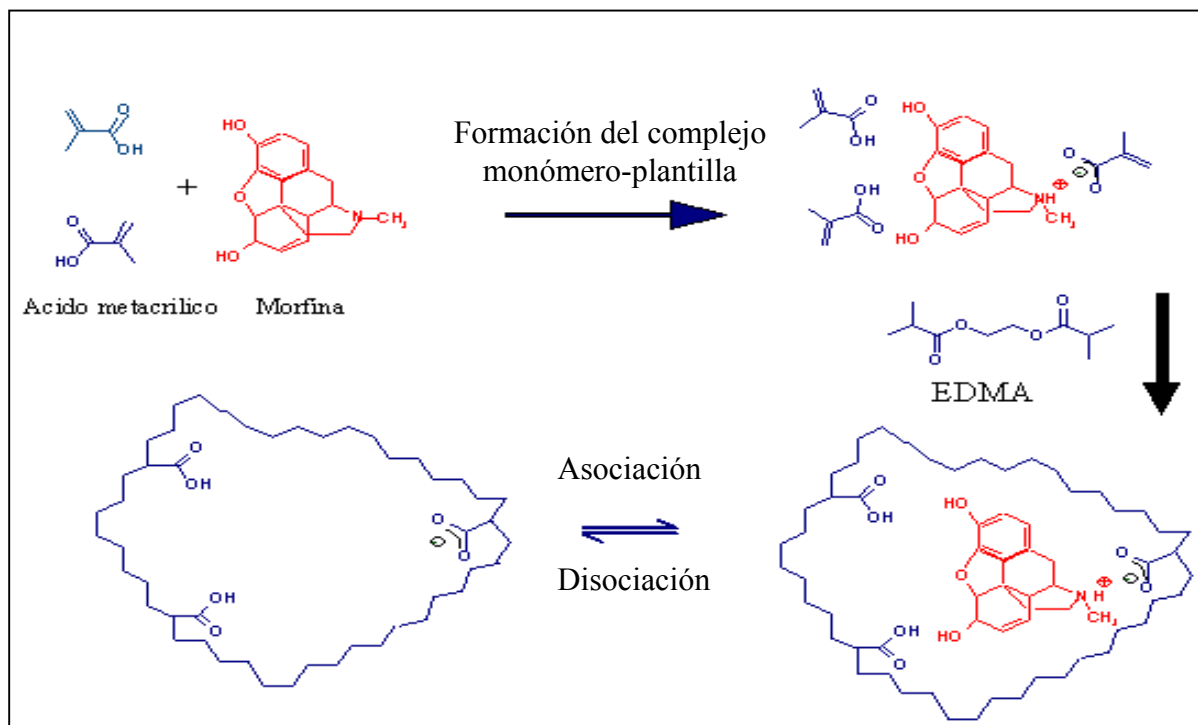


Figura 7. Proceso de Estampado molecular para el aislamiento de la morfina, utilizando como monómero funcional ácido metacrílico y como plantilla morfina (Hilt y Byrne, 2004).

La tecnología del estampado molecular se ha utilizado para la fabricación de adsorbentes cromatográficos, membranas, anticuerpos artificiales y componentes de sensores con el objetivo de lograr la separación de ciertas moléculas (Ulbricht y col., 2002; Zhang y col., 2001; Piletsky y col., 2001;). Un ejemplo de ello se muestra en la figura 8, donde se observa el funcionamiento de una membrana hecha a base de un polímero estampado molecularmente capaz de enlazar selectivamente péptidos que contengan residuos de alanina e histidina a partir de una mezcla de péptidos con aminoácidos diferentes (Krotz y Shea, 2004). Esto es una aproximación sintética del estampado molecular a la cromatografía de afinidad.

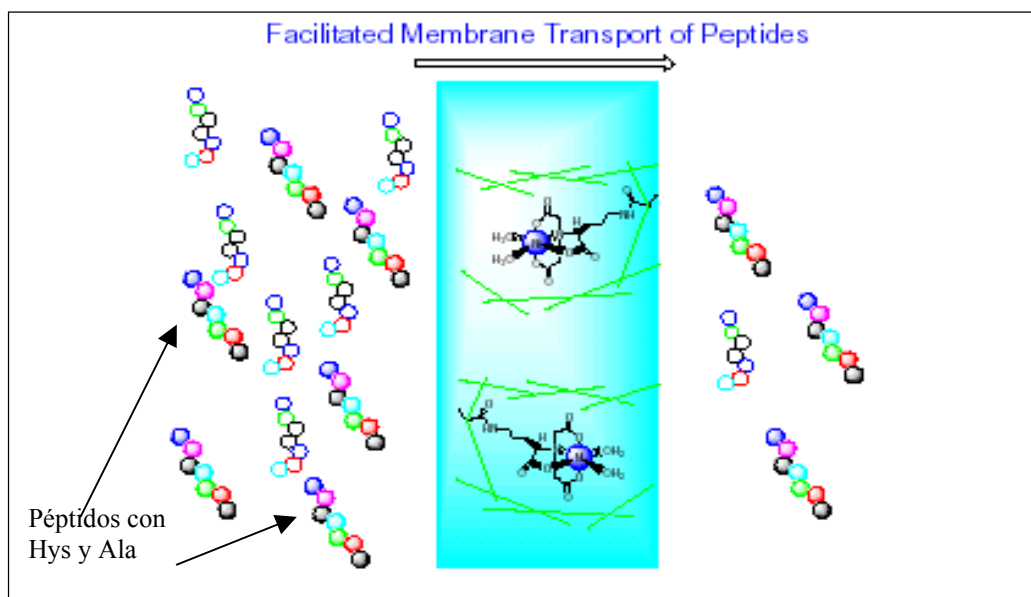
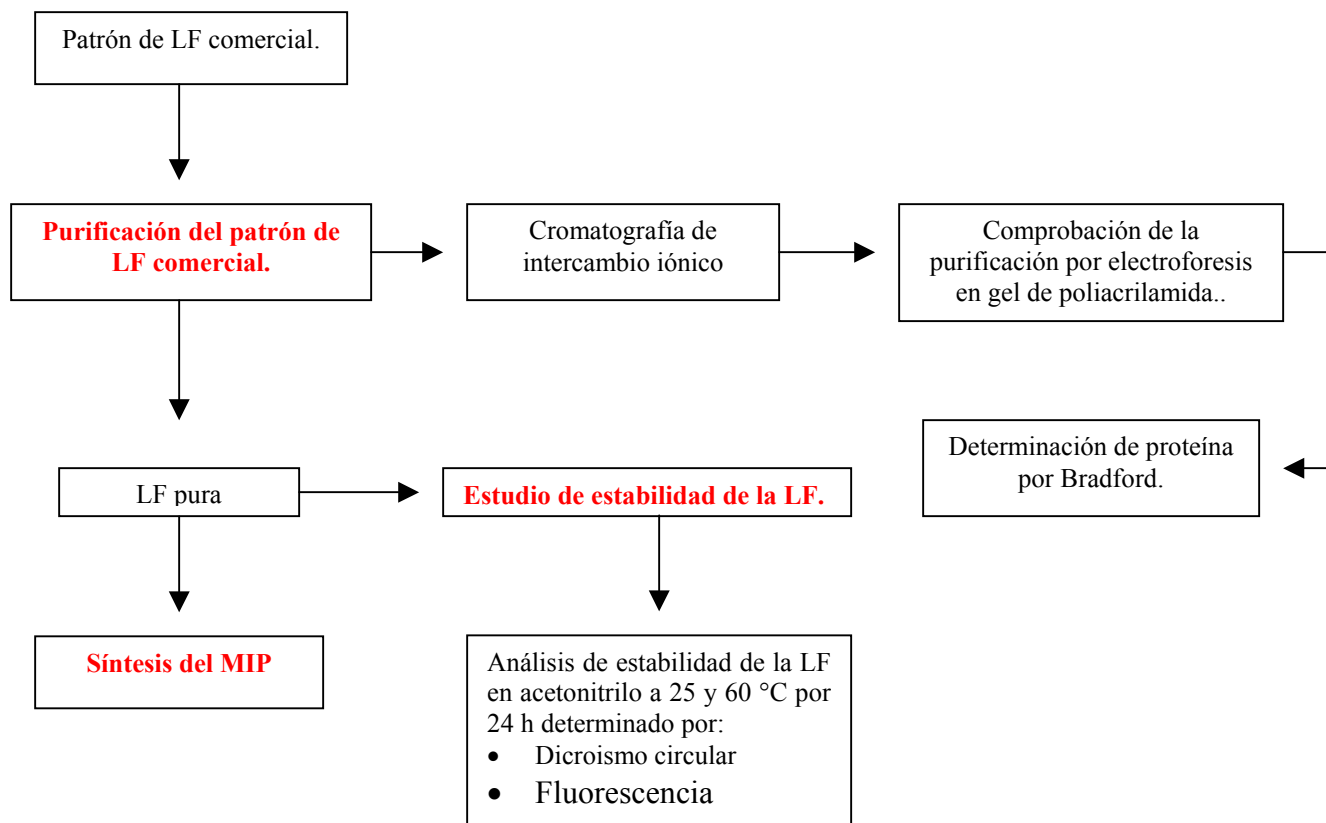


Figura 8. Uso de membranas hechas a base de un MIP selectivo para péptidos que contienen histidina y alanina (Krotz y Shea, 2004). Aproximación sintética del estampado molecular a la cromatografía de afinidad.

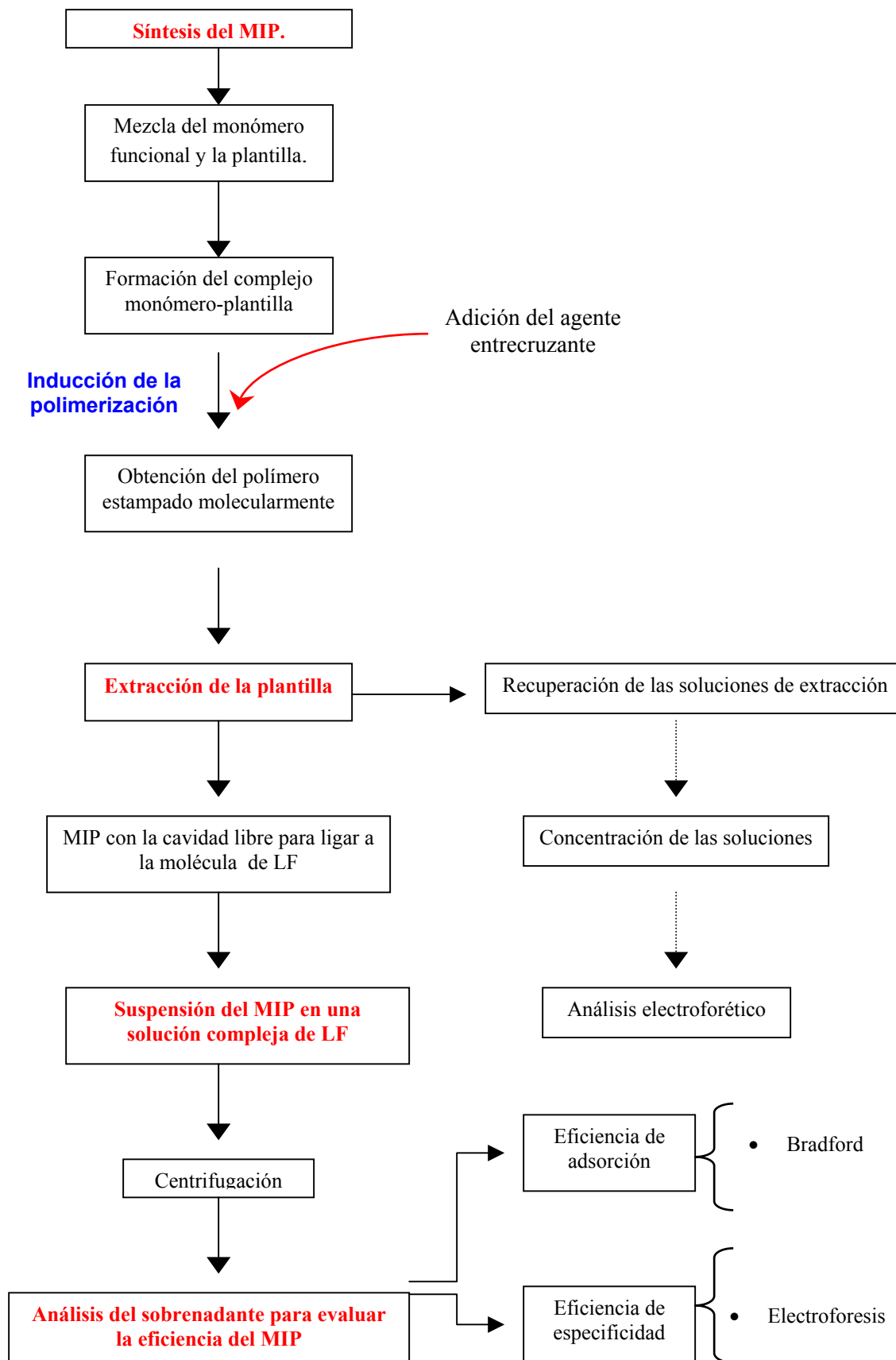
A la fecha existen una gran variedad de metodologías y monómeros propuestos, pero no se ha establecido una técnica específica, por lo que es necesario realizar aproximaciones empíricas utilizando diferentes monómeros y condiciones dependiendo de la molécula a estampar (Rachkov y Minoura, 2001).

Metodología

3.1 Diagrama general



Metodología



3.2. Purificación del patrón de LF (NutriScience, E.U.A.) por cromatografía de intercambio iónico.

Se solubilizaron 100 mg del patrón de LF (NutriScience, E.U.A.) en 10 mL de amortiguador A (Tris 50mM pH 8.5). La muestra se inyectó a una columna de carboximetil (CM)-sefarosa, previamente equilibrado con amortiguador A y controlada por un equipo de FPLC (Fast Pressure Liquid Chromatography). La LF se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0.5 M en amortiguador A. En cada una de las fracciones, la proteína se cuantificó por absorbancia a 280 nm. El volumen total de corrida fue de 400 mL a una velocidad de 0.5 mL/min. recolectando 100 fracciones de 4 mL cada una. Las de mayor absorbancia y pureza se juntaron y concentraron para su caracterización posterior. La concentración de las muestras de proteína se determinó mediante el método de Bradford.

3.3. Determinación de pureza medio de electroforesis en gel de poliacrilamida.

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

3.4. Dicroísmo circular.

Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-715 (ubicado en la Fac de Medicina) equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de la temperatura. Las muestras utilizadas fueron soluciones de acetonitrilo (AC)/H₂O (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65 y 75 % de AC/H₂O respectivamente, a una concentración de LF de 0.57 mg/mL y fueron incubadas a 60 °C por 24 h. Estas muestras fueron colocadas en una celda de 0.1 cm de recorrido óptico para ser medidas en UV lejano y cercano (190-260, 250-340nm respectivamente) utilizando un ancho de banda de 2nm. Cada espectro fue el promedio de tres barridos consecutivos y fueron corregidos restándoles la señal del amortiguador. Cabe mencionar que la medición para el UV cercano se utilizó una concentración de LF de 0.37 mg/mL .

Cabe mencionar que para realizar el estudio de dicroísmo circular en el UV lejano y cercano se utilizaron diferentes concentraciones de LF según el intervalo sugerido en el DC (Creighton, 1997), siendo 0.57 y 0.37 mg/mL respectivamente, siendo éstas las que arrojaron los espectros de mayor calidad.

3.5. Espectroscopia de Fluorescencia.

Las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorómetro ISS PCI (ubicado en la Fac de Medicina) excitando a una longitud de onda de 295 nm y midiendo emisión en un rango de 300 a 400 nm, en ambos se empleó un ancho de banda de 8 nm. A cada espectro de fluorescencia le fue restada su correspondiente línea base. Las muestras utilizadas fueron soluciones de acetonitrilo (AC)/H₂O (0, 20, 40, 60, 80 y 90% de AC/H₂O respectivamente) a una concentración de LF de 0.25 mg/mL y para triptofano 0.2 mM. Todas las muestras fueron incubadas a 60 °C por 24 horas.

3.6 Dinámica molecular.

Se realizó una dinámica molecular (DM) de la estructura de la lactoferrina (LF) incubada en agua a 25 y 60 °C, utilizando el programa NAMD2 versión 2.6b1 para linux-amd64 corriendo en un procesador MD-X86. Para realizar este análisis se consultó el PDB (Protein Data Bank código 1SQY).

La DM consistió de 56,613 átomos de la molécula solvatada en una caja de agua según el modelo TIP3P (Wriggers et al. 1998). La trayectoria total constó de 500, 000 pasos con un tiempo inicial de 3.16 s/paso resultando un tiempo total de 18.33 días. Durante el curso de la DM se diseñó que cada 2000 pasos el programa arrojara una imagen de la estructura de la LF resultando un total de 250 fragmentos.

3.7 Síntesis del polímero estampado molecularmente (MIP).

Para desarrollar el polímero estampado molecularmente se utilizó como monómero funcional acrilamida (AC), etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) y bisacrilamida como agente entrecruzante y azobisisobutironitrilo (AIBN) como catalizador de la reacción. Así mismo, se utilizó un patrón de LF comercial (NutriScience, E.U.A.) como fuente de LF mismo que se purificó por cromatografía de intercambio iónico para así obtener LF pura y ser utilizada como molécula plantilla. La reacción de polimerización se llevó a cabo a una temperatura de 55 °C bajo una atmósfera inerte durante 1h. (Pang y col., 2005; Ou y col., 2004).

3.7.1 Extracción de la plantilla.

La extracción de la plantilla se llevó a cabo realizando lavados del MIP con una solución de agua acidulada (H₂O/HCl) con agitación vigorosa. Posteriormente la muestra se centrifugó y se recolectaron los sobrenadantes (soluciones de extracción) para ser concentrados y finalmente analizados (Pang y col., 2005).

3.7.2. Determinación de la eficiencia de adsorción del MIP.

Después de haber desprendido la plantilla del polímero estampado, éste se resuspendió en una mezcla de proteínas (entre ellas LF) de concentración conocida.

La eficiencia de adsorción se determinó midiendo la disminución de proteína libre. Para ello se realizó una centrifugación y se tomó una alícuota de los sobrenadantes determinando en ellos la disminución de proteína mediante la técnica de Bradford. La eficiencia del MIP con respecto a la especificidad se determinó por un análisis electroforético (Pang y col., 2005; Shiomi y col., 2005) utilizando el programa Molecular Analyst Software, versión 1.5.

Resultados y Discusión

4.1 Purificación del patrón de LF (NutriScience, E.U.A.)

El Estampado molecular es una técnica basada en la especificidad, por lo que requiere que la molécula a estampar posea un alto grado de pureza. Por ello, se realizó una purificación del patrón de lactoferrina comercial (NutriScience, E.U.A.). Para ello, se empleó cromatografía de intercambio iónico donde se solubilizaron 100 mg del patrón en 10 mL de amortiguador A (Tris 50mM pH 8.5). La muestra se inyectó a una columna de carboximetil (CM)-sefaraosa, con un gradiente salino de NaCl 0.5 M. El volumen de corrida fue de 400 mL a una velocidad de 0.5 mL/min. Cabe mencionar que este procedimiento se repitió 5 veces con la finalidad de obtener la mayor cantidad de LF pura para su posterior uso en el estampado molecular. El diagrama de elución se presenta en la figura 9.

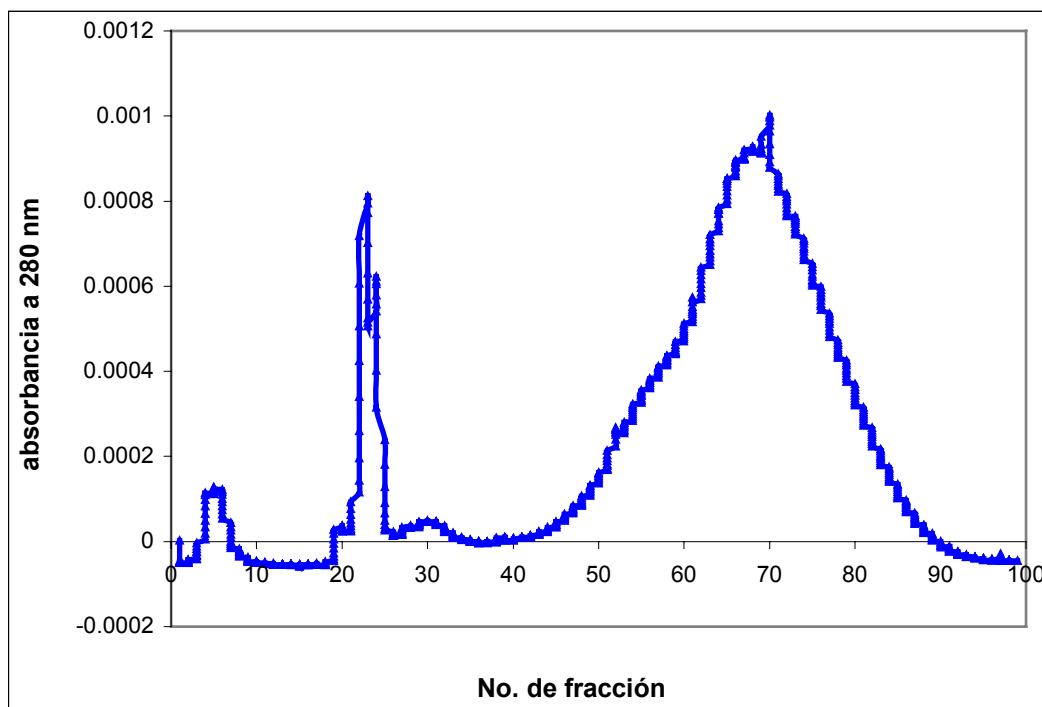


Figura 9: Cromatograma obtenido de la purificación del patrón de LF (NutriScience, E.U.A.) mediante cromatografía de intercambio iónico pH 8.5.

Para determinar la pureza de las fracciones se corrieron electroforesis en gel de poliacrilamida T= 12% inyectando un estándar de peso molecular con un rango de 200 a 7 kDa, así como fracciones al azar. Los geles obtenidos se presentan en las figuras 10 y 11.

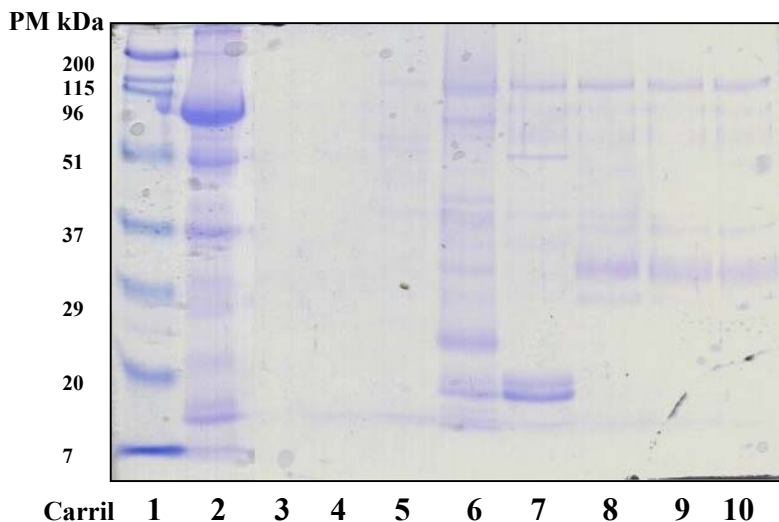


Fig 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida T=12% teñido con azul de coomasie.

Carriles:

- 1.- Estándar de PM
- 2.- LF sin purificar
- 3.- fracción 2
- 4.- fracción 7
- 5.- fracción 21
- 6.- fracción 23
- 7.- fracción 25
- 8.- fracción 29
- 9.- fracción 30
- 10.- fracción 31.

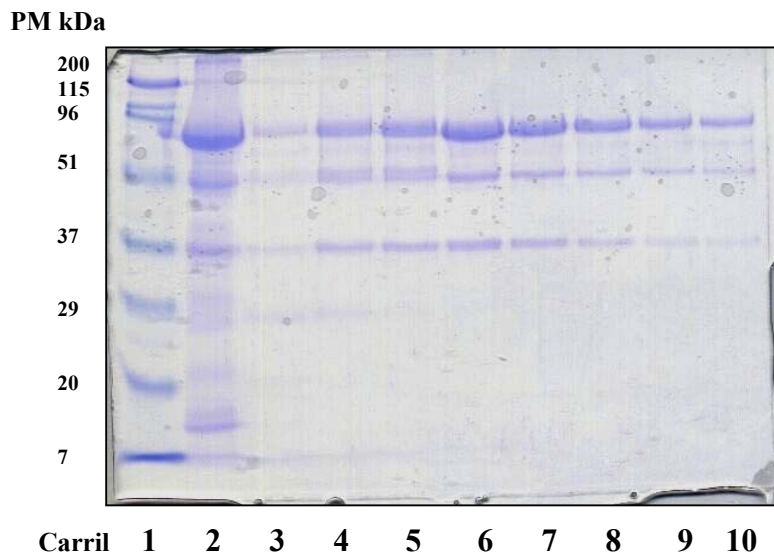


Fig 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida T=12% teñido con azul de coomasie.

Carriles:

- 1.- Estándar de PM
- 2.- LF sin purificar
- 3.- fracción 42
- 4.- fracción 54
- 5.- fracción 58
- 6.- fracción 60
- 7.- fracción 77
- 8.- fracción 82
- 9.- fracción 85
- 10.- fracción 87

En la figura 10 se observan las diferentes impurezas que contiene el patrón de LF. Las fracciones donde se encontró mayoritariamente LF con un PM aproximado de 80 kDa y con un menor número de impurezas fueron las 60 a la 87, (fig 11 carril 6 al 10). Aunque se observa la presencia de otras dos proteínas en estas fracciones, la concentración de las mismas es mínima comparada con la de la LF. Por lo que se decidió concentrar las fracciones de la 60 a la 90 de las cinco purificaciones realizadas al patrón de LF.

Es importante mencionar que probablemente la cromatografía de afinidad fuera más adecuada para la purificación de esta proteína, sin embargo, no se contaba con las condiciones para explorar esta metodología. Por tanto, se decidió proceder al estampado molecular con esta muestra con un mínimo porcentaje de impurezas.

Para determinar la concentración final de LF se realizó una curva patrón de seroalbúmina en un rango de 0.2 a 1 mg/mL mediante la técnica de Bradford, obteniendo la siguiente ecuación:

$$P \text{ (mg/mL)} = \text{Abs}_{595\text{nm}} - 0.061307 / 1.051641$$

$$R = 0.9940$$

Los miligramos totales de LF que se lograron obtener de las cinco purificaciones realizadas al patrón fueron aproximadamente 200 mg, cantidad de LF que se utilizó como plantilla para realizar el estampado molecular y los estudios de estabilidad.

4.2 Estudio de estabilidad de la lactoferrina determinado por dicroísmo circular.

Es importante mencionar que se realizó un estudio de estabilidad de la lactoferrina con respecto a la naturaleza del solvente y la temperatura, porque las condiciones de polimerización a las que se sintetiza el MIP son demasiado severas para una proteína, (solvente acetonitrilo y Temp. de 60° C) que podrían provocar una desnaturalización de la misma y con ello un MIP específico para una estructura diferente a la nativa, y alejada del objetivo general del proyecto. Por ello, fue necesario asegurar que las condiciones de polimerización no afectaron la estructura de la lactoferrina.

4.2.1 Naturaleza del solvente

Para analizar la estabilidad de la lactoferrina con respecto al solvente, se llevó a cabo un estudio de dicroísmo circular para determinar si existe algún cambio en la estructura secundaria (α -hélice y hoja β) de la lactoferrina en el intervalo del UV lejano 190-230 nm, al ser disuelta en diferentes soluciones de acetonitrilo (AC)/H₂O (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 75% AC/H₂O respectivamente) para una concentración constante de proteína (0.57 mg/mL). Los espectros obtenidos se presentan en la figura 12.

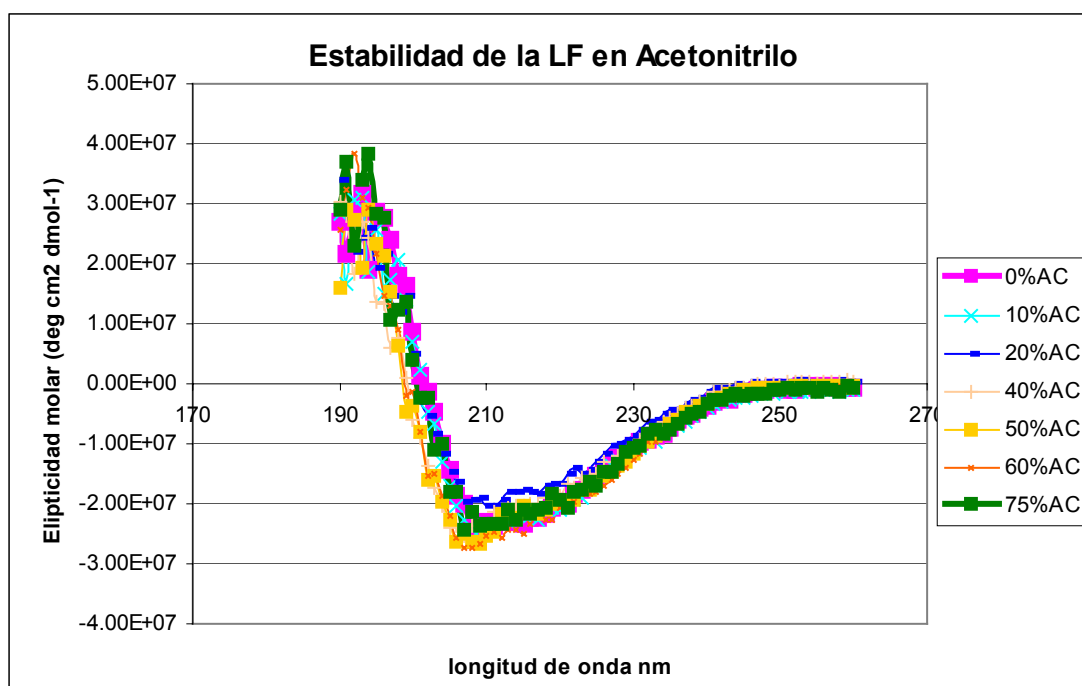


Figura 12. Estabilidad de la LF en diferentes soluciones acetonitrilo (0-75% AC/H₂O) medido por dicroísmo circular UV lejano 190 a 260 nm.

Se puede observar en la figura 12, que al incrementar el porcentaje de acetonitrilo no ocurre un cambio drástico en el espectro de la estructura nativa de la LF (línea rosa), lo cual sugiere que este solvente produce un cambio conformacional mínimo en la estructura secundaria de la LF.

4.2.2 Temperatura

Para analizar la estabilidad de la lactoferrina con respecto a la temperatura, se realizaron estudios de dicroísmo circular y de fluorescencia para determinar algún cambio en su estructura secundaria y terciaria al ser disuelta en diferentes soluciones de acetonitrilo (AC) (0, 20, 40, 60, 80 y 90% AC/H₂O) y ser incubada a temperaturas de 25 y 60 °C durante 24 h.

Para el caso de dicroísmo circular en la región del UV lejano (190-260 nm) la concentración de LF utilizada fue de 0.57 mg/mL, y para el UV cercano (250-340 nm) fue de 0.37 mg/mL. Los resultados de este estudio se muestran en las figuras 13, 14 y 15.

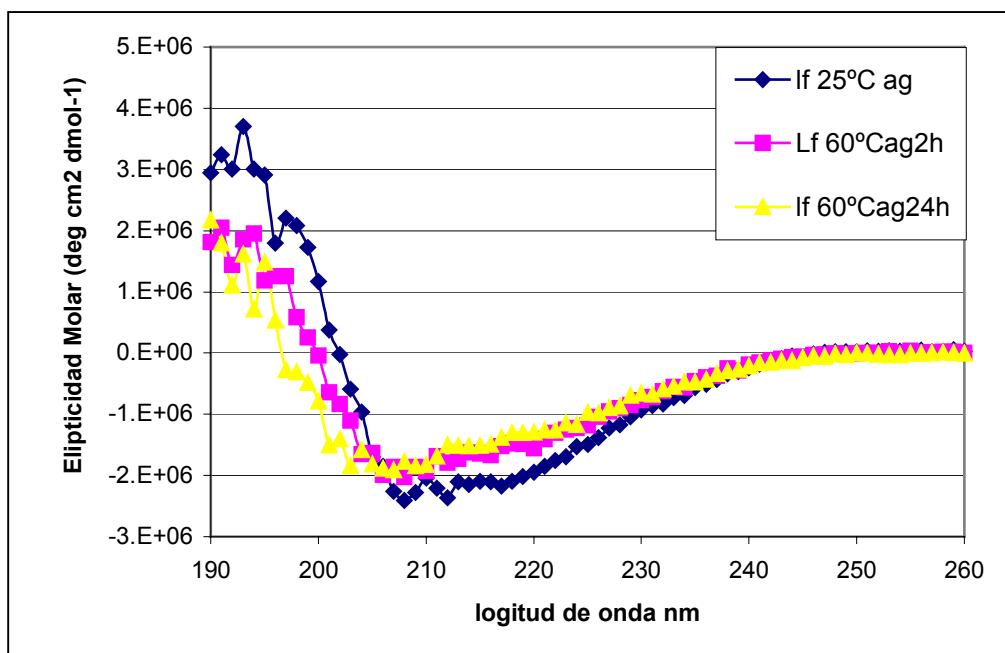


Figura 13. Espectro de LF en agua incubada a temperaturas de 25 y 60 °C durante 24 hrs, determinado por dicroísmo circular UV lejano 190 a 260 nm.

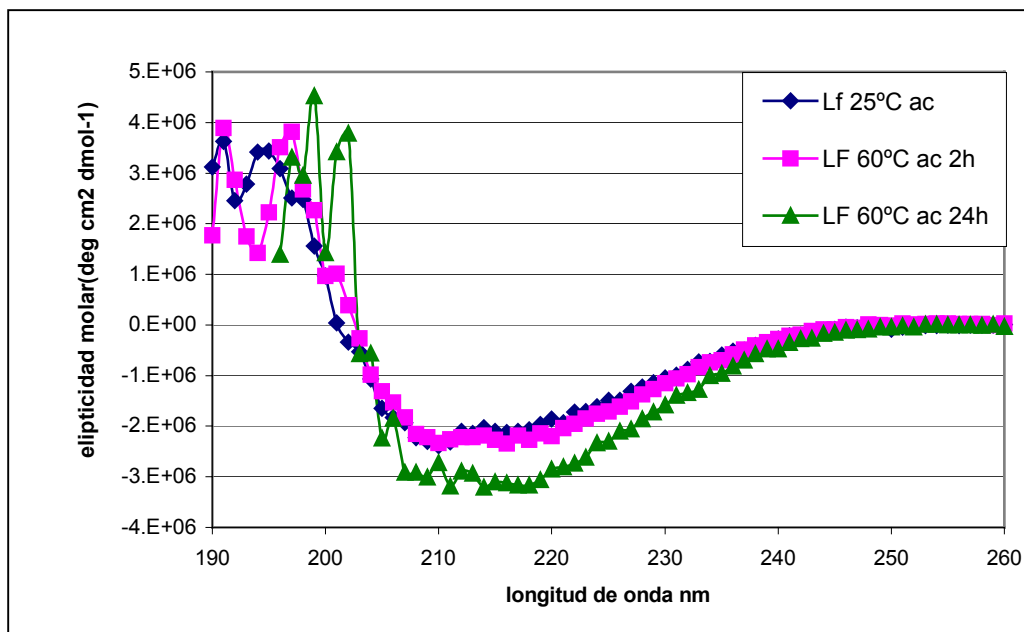


Figura 14. Espectros de LF en una solución 75% AC/H2O incubada a temperaturas de 25 y 60 °C durante 24 hrs, determinado por dicroísmo circular UV lejano 190 a 260 nm.

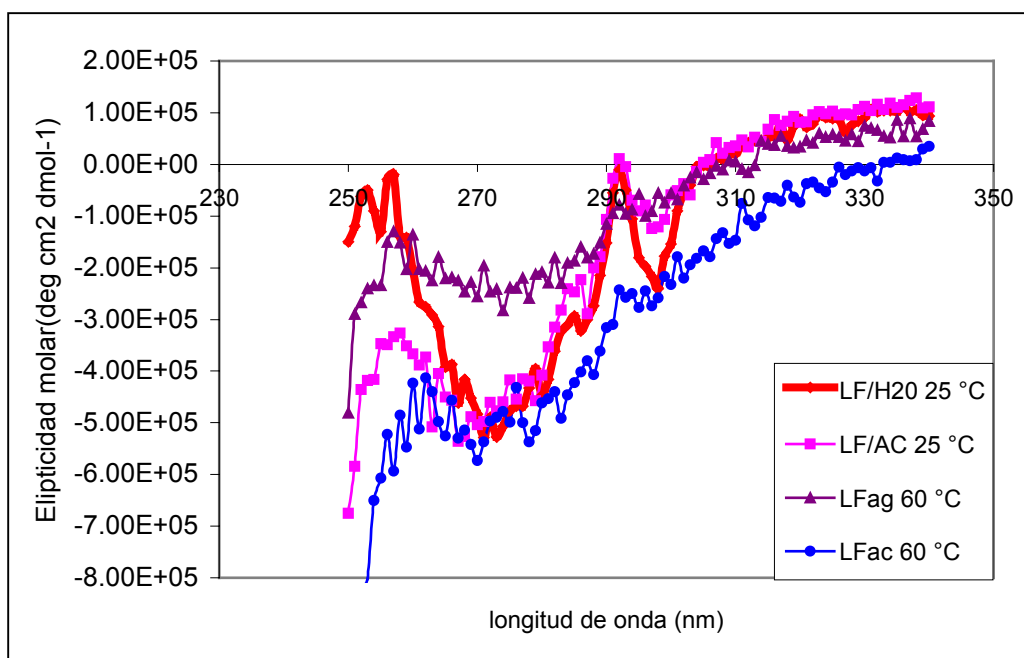


Figura 15. Espectros de LF en una solución 90% AC/H2O incubada a temperaturas de 20 y 60 °C durante 24 hrs, determinado por dicroísmo circular UV cercano 250 a 340 nm.

En la figura 13 se observa el espectro de dicroísmo circular (UV lejano) de la lactoferrina disuelta en agua e incubada a temperaturas de 25 y 60 °C durante 24 h. La temperatura podría ser un factor que desnaturalize la estructura de esta proteína; sin embargo, los resultados sugieren que la estructura secundaria de la LF permanece después de haberla sometido a las condiciones mencionadas, debido a que es mínimo el cambio en los espectros. Además, el efecto que se produce al incubarla a 60°C durante 2 o 24 h es muy parecido, ya que los espectros siguen la misma tendencia, y no corresponden a espectros de una proteína desnaturalizada (Creighton, 1997; Curtis, 1990).

En la figura 14 se observa el espectro de dicroísmo circular de la LF (UV lejano) disuelta en acetonitrilo e incubada a temperaturas de 25 y 60 °C durante 24 hrs. Los resultados de este espectro sugieren dos efectos inusuales:

1°. El acetonitrilo probablemente sea un solvente que no ocasione ningún daño a la estructura secundaria de la LF. Por el contrario, podría aumentar su nivel de estructuración al cabo de 24 h. Este comportamiento se puede observar en el espectro de la LF (línea verde) con respecto al de la línea azul. Comparando estos dos espectros se observa que el verde posee una menor elipticidad molar, lo que sugiere que no se pierde estructura secundaria ya que el espectro no tiende a cero por el contrario, la proteína muestra un aumento en su nivel de estructuración.

2°. Se observa también que la temperatura tampoco es un factor que afecte en forma drástica la estructura secundaria de esta proteína en el intervalo estudiado.

Se obtienen intensas bandas por DC en la región del UV cercano (250-340nm) cuando una proteína se encuentra en su estado nativo debido a que las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos permanecen inmovilizadas en un ambiente asimétrico. Cuando una proteína se encuentra desnaturalizada, las bandas de estos aminoácidos son muy pequeñas. Las señales y magnitudes que proporcionan los aminoácidos aromáticos en esa región del UV no pueden ser calculadas y resulta muy complejo analizar los picos individuales del espectro. Usualmente no pueden ser asignadas a transiciones de cadenas laterales de aminoácidos específicos. Sin embargo, la región del UV cercano representa un buen criterio para evaluar a una proteína en su estado nativo y desnaturalizado, lo cual puede ser utilizado como una huella digital para evaluar la conformación correcta del estado nativo de una proteína, (Creighton, 1997).

En la figura 15 se observa el espectro de dicroísmo circular (UV cercano 250 a 340 nm) de la lactoferrina disuelta en agua y en acetonitrilo al ser incubada a temperaturas de 25 y 60 °C durante 24 hrs. Los resultados de este estudio sugieren que la LF no se encuentra desnaturalizada cuando es sometida a las condiciones adscritas, debido a que su espectro (línea azul) no tiende a una elipticidad molar de cero. Si se compara este último con el espectro de la estructura nativa (líneas roja y azul) se observan cambios entre ellos, lo cual podría indicar que los aminoácidos aromáticos se encuentran expuestos en diferentes ambientes, lo que es lógico ya que al aumentar la cantidad de acetonitrilo en una solución se produce una disminución en la constante dieléctrica modificando el ambiente al que se exponen los aminoácidos (Creighton, 1997).

Cuando la LF es disuelta en agua e incubada a 60 °C 24 h, además de experimentar cambios en los ambientes de los aminoácidos aromáticos sufre un cambio conformacional disminuyendo su nivel de estructuración (línea morada) sin llegar a una desnaturalización completa. Esto sugiere, que la proteína podría preferir estar disuelta en acetonitrilo que en agua.

4.3 Estudio de estabilidad de la lactoferrina determinado por fluorescencia.

Los resultados del estudio de la estructura de la LF determinado por la fluorescencia se presentan en las figuras 16, 17, 18 y 19. La concentración de LF utilizada fue de 0.25 mg/mL y para triptofano 0.2 mM. Cabe señalar que este último se utilizó como blanco para tener un punto de comparación y poder determinar como cambia el triptofano cuando se somete a las condiciones adscritas.

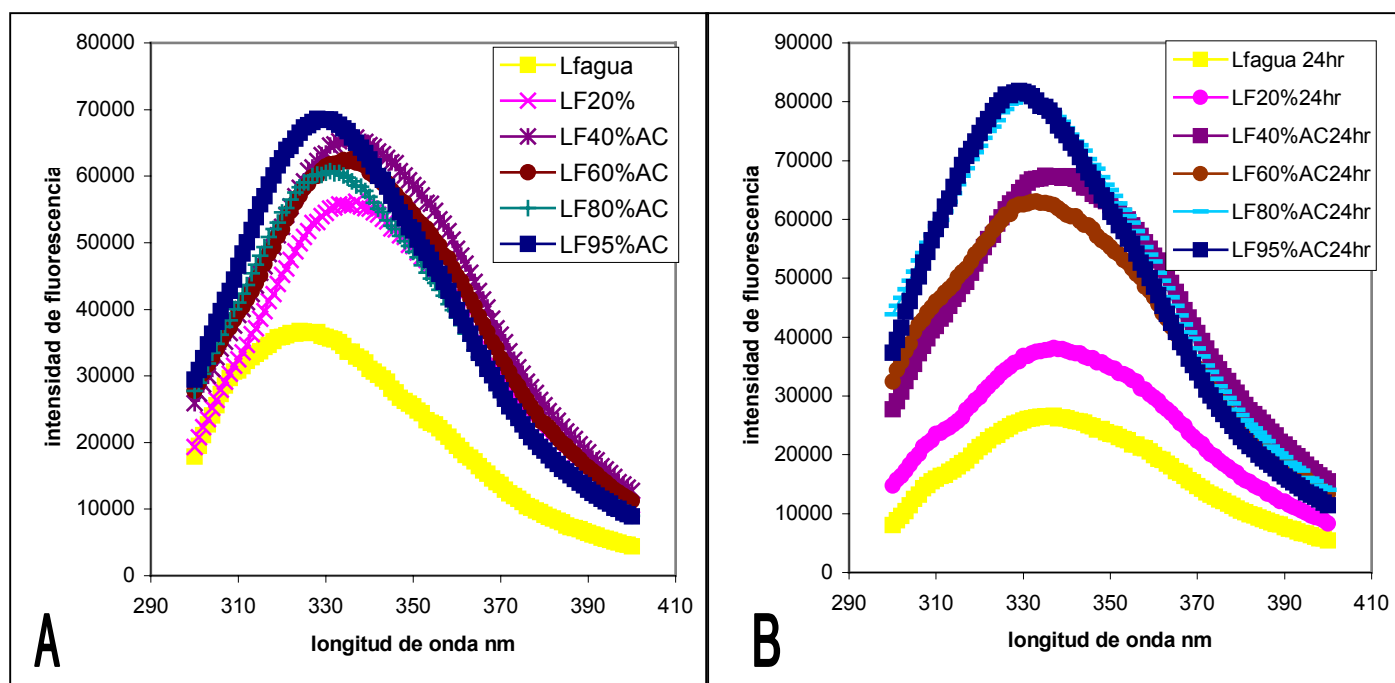


Figura 16. Espectros de fluorescencia de la estructura de la LF en agua y en soluciones de 20, 40, 60, 80, y 95% AC. A) Temperatura de 25 °C. B) Temperatura de 60°C incubados 24h.

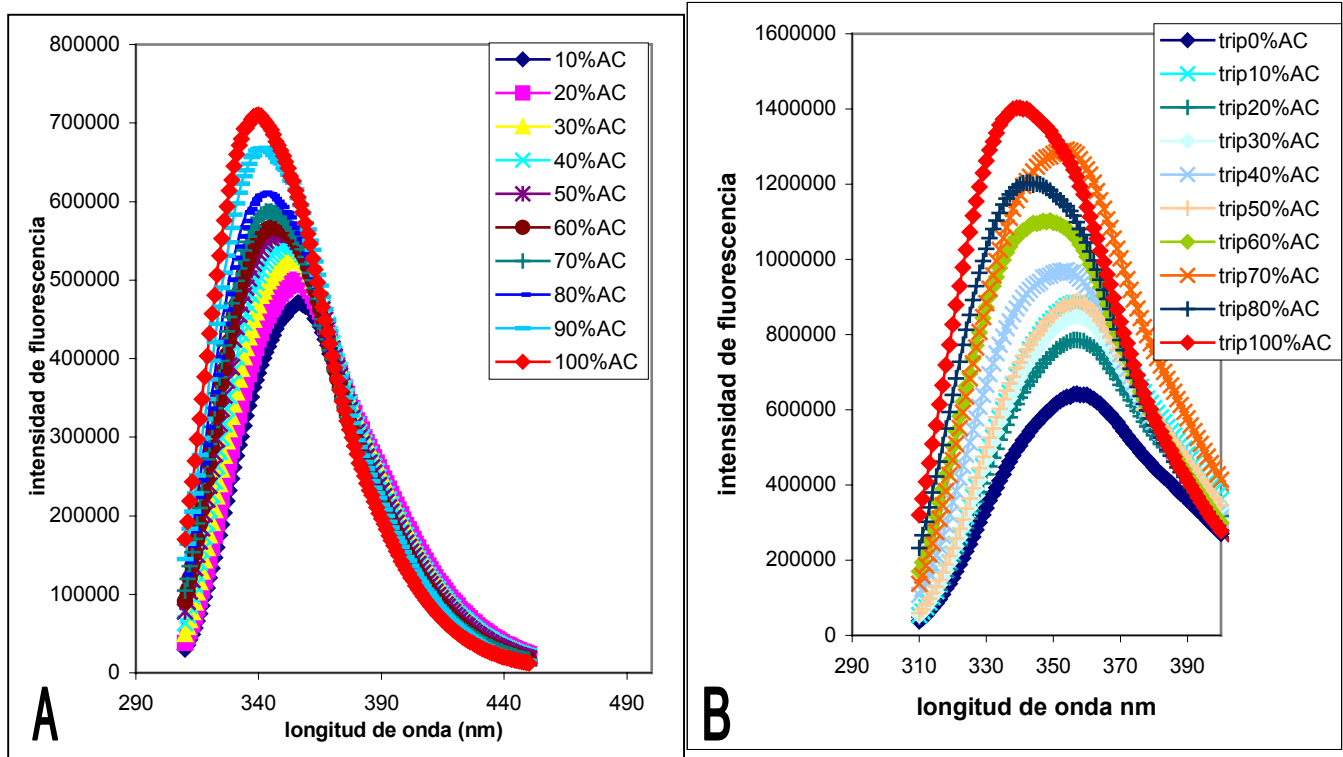


Figura 17. Espectros de fluorescencia del triptofano en agua y en soluciones de 20, 40, 60, 80, y 95% AC. A) Temperatura de 25 °C. B) Temperatura de 60°C incubados 24h.

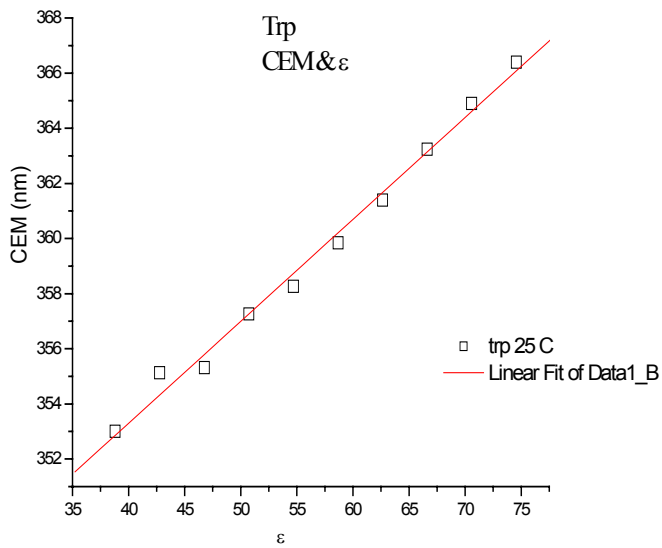


Figura 18: CEM en función de la constante dieléctrica (ϵ). Trp a 25°C

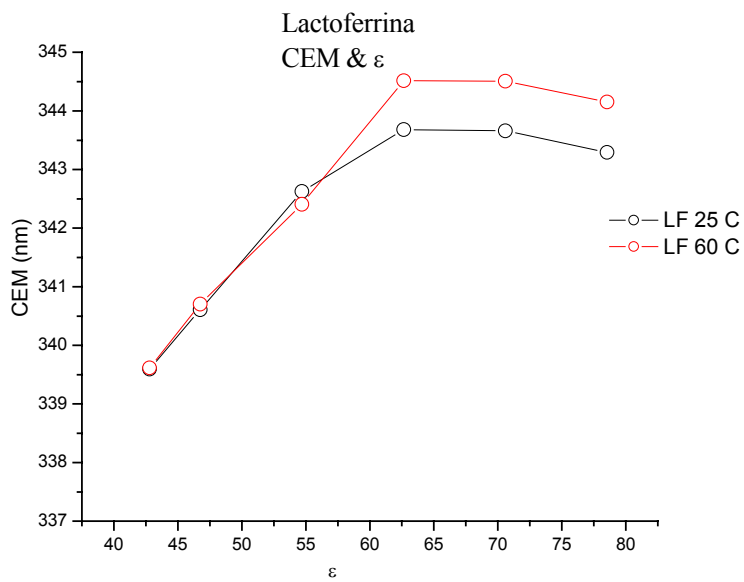


Figura 19: CEM en función de la constante dieléctrica (ϵ). LF a 25 y 60°C

En las figuras 16 y 17 (panel A y B) se muestran los espectros de fluorescencia de la LF como del triptofano al ser disueltos en agua y en soluciones de 20, 40, 60, 80 y 95 %AC incubadas a temperaturas de 25 y 60 °C durante 24 h respectivamente.

Generalmente cuando una proteína experimenta una desnaturalización ésta va acompañada de grandes cambios tanto en la intensidad de fluorescencia (tendencia a cero) como, en la longitud de onda de máxima absorción (aprox 350 nm, valor máximo de absorción para el caso del triptofano en solución acuosa (Creighton, 1997).

En la figura 16 la LF exhibe un incremento en la intensidad de fluorescencia cuando se aumenta la cantidad de AC. Este comportamiento podría ser un indicativo de que una solución al 95 %AC no produce la desnaturalización de la misma. Sin embargo, existe un cambio en el ambiente al que están expuestos los triptofanos de la LF, ya que se observa un desplazamiento del máximo de fluorescencia hacia el rojo de 324 (línea amarilla) a 330 nm (línea azul figura 16 A), lo que indica que el ambiente es más hidrofóbico, probablemente la estructura terciaria de la proteína se modifique pero, sin llegar a un estado desnaturalizado (340 nm, longitud de onda de máxima de absorción para el triptofano disuelto en 100% de acetonitrilo, figura 17 A línea roja).

Cuando este mismo análisis se efectúa al cabo de 24 hrs para muestras incubadas a una temperatura de 60 °C se observa el efecto contrario; existe un desplazamiento del máximo de fluorescencia de 340 nm (línea amarilla) a 330 nm (línea azul figura 16 B), lo cual podría indicar que el ambiente al que están expuestos los triptofanos cambia a ser un ambiente hidrofílico.

Utilizando los datos de la intensidad de fluorescencia de los espectros obtenidos fue posible calcular el CEM (centro espectral de masa) de la LF como del triptofano, para determinar de una forma más exacta si la proteína después de someterla a las condiciones de temperatura y solvente mencionadas presenta un CEM de una proteína en estado desnaturalizado.

Las figuras 18 y 19 muestran el CEM del triptofano como de la LF en función de la constante dieléctrica (ϵ) respectivamente. Al aumentar la cantidad de acetonitrilo disminuye la constante dieléctrica del medio.

En la figura 19 se observa que ambas gráficas siguen la misma tendencia. El CEM cambia a longitudes de onda menores al disminuir la ϵ del medio de 78.54 a 42.77. El valor de CEM que presenta la estructura nativa de la LF (línea negra) y la incubada a 60 °C 24 h (línea roja) disminuyen de 343.2 a 339.5nm y de 344.2 a 339.5 nm, siendo la diferencia de 3.5 y 4.5nm respectivamente. Según datos reportados, cuando una proteína está desnaturalizada el CEM se encuentra entre 348-356 nm (Creighton, 1997). Lo cual sugiere, que esta proteína no experimenta una desnaturalización cuando se encuentra en acetonitrilo; así mismo, el parámetro de temperatura no produce diferencias notables con respecto al cambio de la constante dieléctrica, por lo que podría no ser afectada en su totalidad la estructura nativa de esta proteína.

4.4 Dinámica Molecular.

Se llevo a cabo una simulación de dinámica molecular (DM) de la estructura de la lactoferrina (LF) incubada en agua a 25 y 60 °C, utilizando el programa NAMD2 versión 2.6b1 para linux-amd64 corriendo en un procesador MD-X86 (Wriggers y col., 1998). Para realizar este análisis se consultó el PDB (Protein Data Bank código 1SQY).

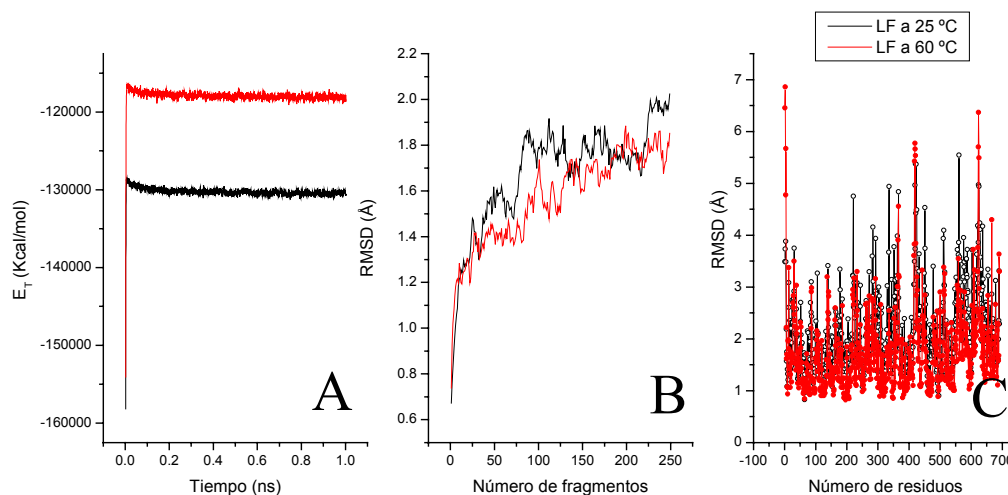


Fig 20. Dinámica molecular de la LF realizada con el programa NAMD 2.6b1 para Linux-amd64, a una temperatura de 298 K (25 °C) y 333 K (60 °C). a) Energía total contra tiempo. B) RMSD de los C_α contra número de fragmentos. C) RMSD C_α contra numero de residuos.

En la figura 20 A se muestra la energía total (Kcal/mol) teórica de los sistemas, donde se observa un comportamiento estable para ambos experimentos (LF a 25 y 60 C°) durante el tiempo que dura la dinámica molecular.

La DM se diseño que cada 2000 pasos el programa arrojara una imagen de la estructura de la LF resultando un total de 250 fragmentos. La figura 20 B muestra las RMSD (root-mean-square-deviations) en función del número de fragmentos obtenidos. Donde se observa que las fluctuaciones son constantes, lo que sugiere que el procedimiento es confiable.

En la figura 20 C se muestran las RMSD en función del número de residuos de la LF. Durante el tiempo que dura la DM existen algunos residuos de la estructura de la LF que son flexibles y que poseen mayor movilidad que otros, debido a que se observan picos altos con una mayor RMSD en la gráfica (Likic, 2003).

Al sobreponer las imágenes obtenidas de la estructura de la LF en la DM después de haber sido monitoreada en las condiciones de temperatura a 25 y 60 °C no se observa un cambio drástico en ambas estructuras lo que sugiere, que esta proteína es estable y mantiene su estructura global aún a altas temperaturas (figura 21).

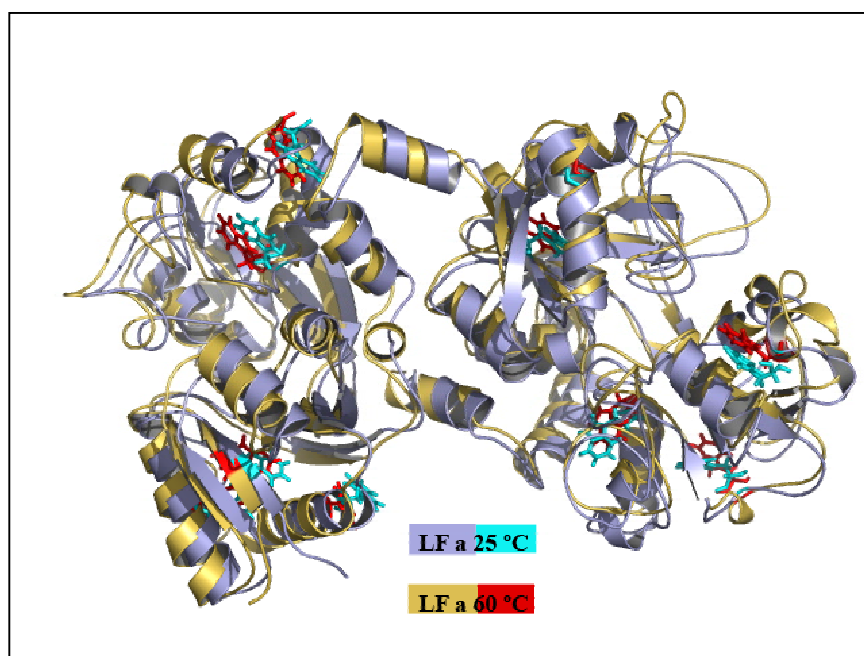


Figura 21. Estructuras tridimensionales de la lactoferrina (LF) después de haber realizado la DM.

4.5 Síntesis del polímero estampado molecularmente.

Para desarrollar el estampado molecular se utilizó como plantilla LF pura donde se sintetizaron seis polímeros estampados molecularmente utilizando acrilamida (AC) como monómero funcional, etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) y bisacrilamida como agente entrecruzante y azobisisobutironitrilo (AIBN) como catalizador de la reacción.

Para la síntesis del MIP se varió la relación entrecruzante: monómero funcional, así como, la concentración de LF pura al momento de estampar.

Los MIP's denominados 1.1 y 1.2 se sintetizaron con bisacrilamida en una relación 1:8 con respecto a la acrilamida, y la concentración utilizada de LF fue de 20 y 40 mg/mL respectivamente.

Los MIP's denominados 2.1 y 2.2 se sintetizaron con bisacrilamida en una relación 1:10 con respecto a la acrilamida, y la concentración utilizada de LF fue de 20 y 40 mg/mL respectivamente.

Los MIP's denominados 3.1 y 3.2 se sintetizaron con EGDMA en una relación 1:12 con respecto a la acrilamida, y la concentración utilizada de LF fue de 20 y 40 mg/mL respectivamente.

Para cada polímero estampado molecularmente se sintetizó su respectivo blanco (B) ausencia de la molécula plantilla (LF pura) denominándolos B₁, B₂ y B₃ respectivamente. Esto se realizó con la finalidad de comparar la capacidad de sorción no específica de los polímeros obtenidos. En teoría los blancos, al no tener plantilla no poseen una cavidad específica capaz de ligar LF.

Las condiciones de polimerización en cuanto a tiempo y temperatura fueron de 60 °C durante 1 h.

4.6 Eficiencia de adsorción del polímero estampado molecularmente.

Los MIP's así como sus respectivos blancos, fueron suspendidos en una mezcla de proteínas de concentración conocida (patrón de LF comercial NutriScience, E.U.A.) a una concentración de 1 mg/mL), para determinar la eficiencia de adsorción de los polímeros sintetizados midiendo la disminución de proteína libre en solución. Es importante mencionar que para la determinación de este parámetro fue necesario centrifugar los polímeros para después tomar una alícuota de los sobrenadantes (SN) restantes, determinando en ellos la disminución de proteína mediante la técnica de Bradford. Para ello se realizó una curva patrón de seroalbúmina en un intervalo de 0.2 a 1 mg/mL , obteniendo la siguiente ecuación:

$$P \text{ (mg/mL)} = \text{Abs}_{595\text{nm}} - 0.03658 / 1.0051641$$
$$R = 0.9970$$

Cabe mencionar que los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados en cuanto a la eficiencia de adsorción de los MIP's y sus B's se presentan en la figura 22.

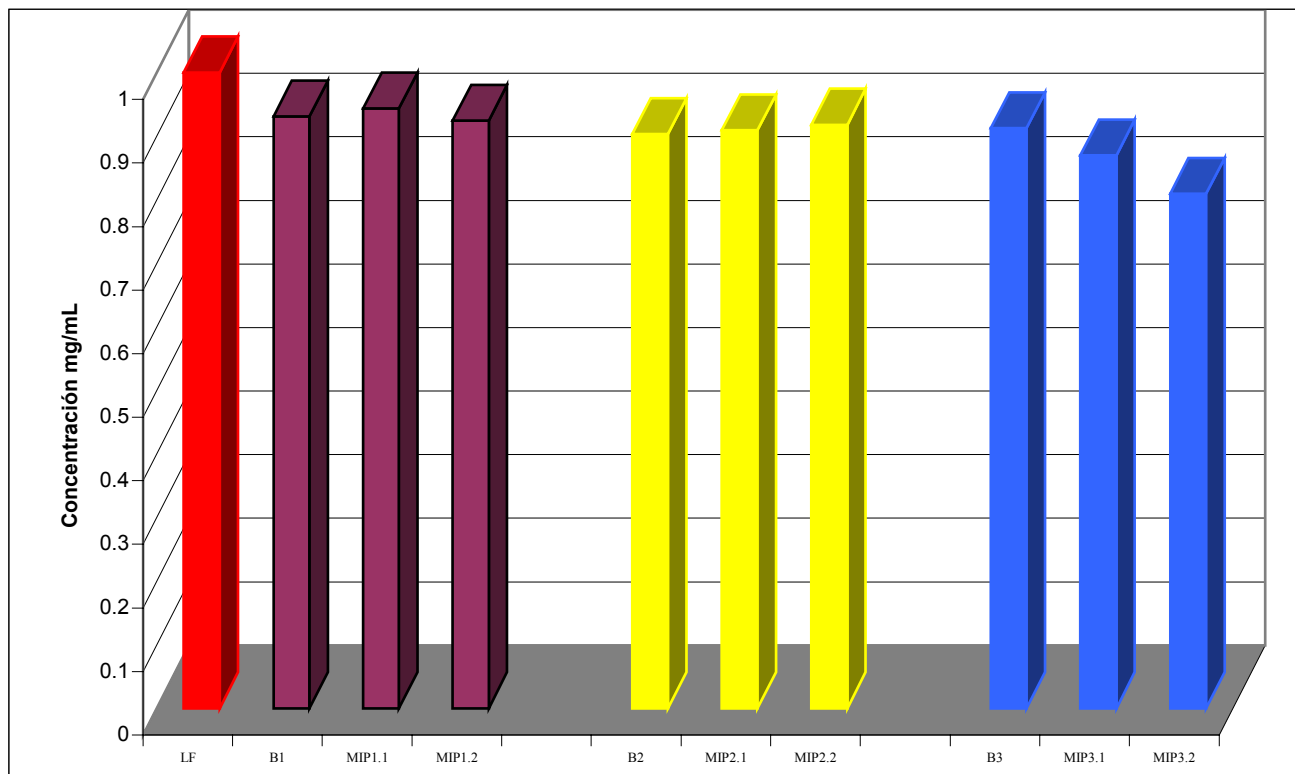


Figura 22.- Concentración de proteína (determinada por la técnica de Bradford) (mg/mL) presente en los SN de los polímeros estampados molecularmente (MIP_{1.1}, MIP_{1.2}, MIP_{2.1}, MIP_{2.2}, MIP_{3.1}, MIP_{3.2}) así como la de sus respectivos blancos (B₁, B₂ y B₃) después de haber sido suspendidos en una mezcla de proteínas (LF NutriScience, E.U.A. 1 mg/mL).

El análisis estadístico aplicado a estos datos arrojó que solo la concentración del SN perteneciente al MIP_{3.2} era diferente ($\alpha=0.06$), por tanto no existe diferencia significativa en las demás concentraciones, incluyendo la de su propio blanco (B₃) con respecto al patrón inicial. Por tanto, la disminución de proteína en el SN del MIP_{3.2} demuestra que solo éste polímero es el único que posee la capacidad de adsorber proteína después de enfrentarse a una mezcla de proteínas que incluye LF.

La cantidad de proteína adsorbida por este polímero fue de 0.2 mg/mL, mientras que su blanco adsorbe la mitad 0.1 mg/mL, con respecto al patrón de LF siendo su concentración de 1 mg/mL.

Después de determinar la eficiencia de adsorción de los polímeros B₃ y MIP_{3,2} fue necesario lavar los polímeros B₃ y MIP_{3,2} para comprobar que además de tener la capacidad de adsorber proteína, también fueran capaces de desprenderla.

De acuerdo a la literatura, las interacciones que se producen entre el polímero y la proteína son de carácter débil como lo son: los puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas entre otras. Por tanto, es posible extraer a la proteína del polímero realizando una serie de lavados con agua ácida bajo una agitación vigorosa (Shiomi y col., 2005).

Este tratamiento se aplicó a los polímeros B₃ y MIP_{3,2}. Posteriormente las muestras se centrifugaron y se recolectaron los sobrenadantes, (soluciones de extracción) para ser concentrados y finalmente analizados mediante la técnica de electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida con una T=12%. Las muestras inyectadas al gel de electroforesis fueron: un estándar de peso molecular (PM) y las soluciones de extracción del B₃ y MIP_{3,2} denominadas SE_{B3} y SE_{MIP3,2} respectivamente. Los resultados se presentan en la figura 23.

PM kDa

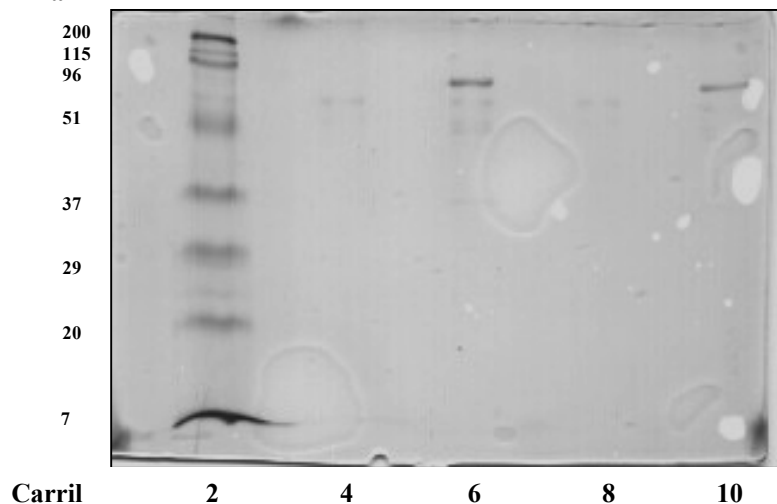


Fig 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida T=12% teñido con azul de coomasie.

Carriles:

2.- Estándar de PM

4.- SE_{B3}

6.- SE_{MIP 3,2}

8.- SE_{B3} dilución 1:2

10.- SE_{MIP 3,2} dilución 1:2

Como se observa en la figura 23, carriles 6 y 10 (muestras SE_{MIP 3,2}) existe una banda con un peso molecular aproximado de 80 kDa, lo cual sugiere la presencia de la proteína LF. Este no es el caso para las soluciones de extracción del blanco (carriles 4 y 8) donde no se percibe ninguna banda cercana a este PM. Esto comprueba que efectivamente el MIP_{3,2} adsorbió LF de manera selectiva y que además se logró su purificación por extracción de la misma del polímero estampado molecularmente.

Para poder determinar la cantidad de LF extraída del MIP_{3,2} se inyectó un estándar de la proteína seroalbúmina (SA) a diferentes concentraciones (0.25-0.1 mg/mL) en un gel de electroforesis. Así mismo, se inyectaron las muestras SE_{B3} y SE_{MIP3,2} y finalmente muestras de LF impura y LF parcialmente pura a una concentración de 0.5 mg/mL como punto de comparación.

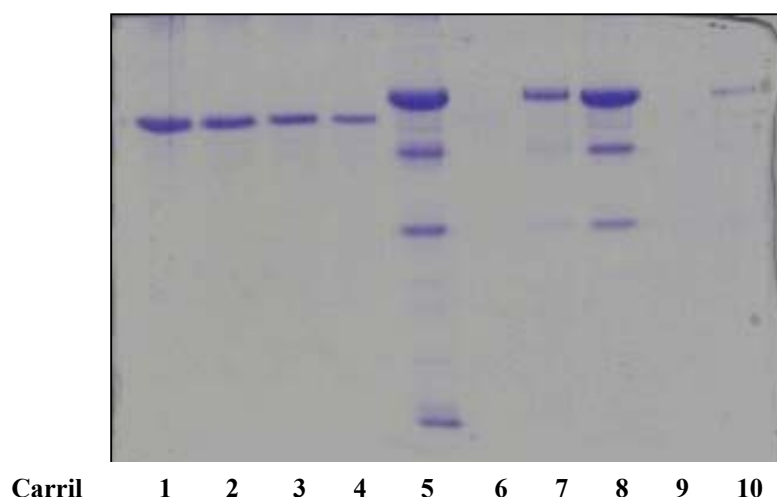


Fig 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida T=12% teñido con azul de coomasie.

Carriles:

- 1.-Estándar de SA 0.25 mg/mL
- 2.-Estándar de SA 0.2 mg/mL
- 3.-Estándar de SA 0.15 mg/mL
- 4.-Estándar de SA 0.1 mg/mL
- 5.-LF imp 0.5 mg/mL
- 6.- SE_{B3}
- 7.- SE_{MIP 3,2}
- 8.- LF pura 0.5 mg/mL
- 9.- SE_{B3} dilución 1:2
- 10.- SE_{MIP 3,2} dilución 1:2

Utilizando el programa Molecular Analyst Software versión 1.5 se determinó, a partir de las concentraciones de SA, que la concentración final de LF extraída del MIP_{3,2} fue de 0.17 mg/mL, lo cual indica que de la proteína total adsorbida por el MIP_{3,2} (0.2 mg/mL) 0.17 mg/mL corresponde a lactoferrina. El gel resultante se presenta en la figura 24.

Con los resultados de este ensayo se comprueba la funcionalidad y especificidad del MIP_{3,2} ya que este polímero fue capaz de adsorber LF a partir de una mezcla de proteínas y que además lo hizo de forma específica, pues se observa su preferencia por la LF (carriles 7 y 10). Así mismo, se observa que en los carriles 6 y 9 correspondientes a las soluciones de extracción del blanco (B₃), no se observa ninguna banda. Esto comprueba que solo el MIP_{3,2} tiene cavidades específicas para ligar a la molécula de lactoferrina que le otorgan la especificidad buscada.

Conclusiones

- 1.- Se realizó una purificación parcial por cromatografía de intercambio iónico a pH de 8.5 del patrón de LF (NutriScience, E.U.A.) obteniendo 200 mg de LF parcialmente pura con un mínimo porcentaje de impurezas.
- 2.- Los resultados en cuanto al estudio de estabilidad de la LF determinados por Dicroísmo circular y Fluorescencia, sugieren que esta proteína experimenta cambios locales en su estructura cuando se encuentra disuelta en acetonitrilo y a 60 C°. Sin embargo, no hay evidencia de que la proteína experimente una desnaturalización o una pérdida total de su estructura nativa. El solvente acetonitrilo parece estabilizarla y al mismo tiempo aumentar su nivel de estructuración.
- 3.- Los resultados de la dinámica molecular muestran que la LF después de ser analizada a dos diferentes temperaturas (25 y 60°C) se mantiene estable y no se modifica drásticamente su estructura, lo que se podría corroborar los resultados experimentales.
- 4.- Se concluye que las condiciones a las que se realiza la síntesis del polímero estampado molecularmente (solvente y temperatura) si producen cambios locales en la estructura de la LF. Sin embargo, la estructura global de la proteína se mantiene, por lo que fue posible sintetizar un MIP con sitios específicos de reconocimiento para la LF en su estado nativo.
- 5.- De seis polímeros estampados molecularmente solo uno demostró poseer la capacidad de adsorber proteína. El MIP_{3,2} (hecho a base de acrilamida como monómero funcional y EGDMA como agente entrecruzante) mostró capacidad para ligar específicamente lactoferrina a partir de una mezcla de proteínas. La cantidad de proteína total adsorbida por el MIP_{3,2} fue de 0.2 mg/mL siendo 0.17 mg/mL lactoferrina. Se desprende que la técnica de estampado molecular es promisorio para la recuperación de lactoferrina a partir del suero de leche.
- 6.- Ante la problemática que existe para estampar molecularmente a una proteína es importante resaltar la importancia de esta investigación pues es la primera vez que se logra la separación específica de LF. De hecho, representa el primer resultado exitoso reportado por la técnica de estampado molecular para una proteína de este peso molecular (80 kDa).
- 7.- El presente estudio sirvió para abrir puertas a otras investigaciones que tengan como fin la purificación de esta proteína de alto valor agregado a partir del suero de leche mediante la novedosa técnica del estampado molecular.

Importancia de nuevos hallazgos y sus aplicaciones.

La lactoferrina (LF) es la proteína de mayor valor agregado del suero de leche. Recientemente ha crecido mucho el interés comercial por esta proteína, porque posee características nutracéuticas y funciones biológicas interesantes, tales como su actividad bacteriostática por su capacidad de fijar el hierro de la leche. Además, se ha reportado que ejerce un efecto bactericida y posee propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, así como también, estimula el sistema inmune y favorece el crecimiento de flora benéfica en el tracto intestinal (Tomé y Debbabi, 1998). Actualmente el kilogramo de esta proteína tiene un precio aproximado de \$1,500.00 dólares americanos; este costo tan elevado se debe, además del interés comercial que existe, a la dificultad para lograr su separación y purificación a partir del suero de leche, ya que esta proteína se encuentra en baja concentración y mezclada con muchas otras proteínas.

En este trabajo se lograron dos avances muy importantes:

- A) Se desarrolló una metodología basada en el estampado molecular para la recuperación de lactoferrina que no ha sido reportada previamente. El estampado molecular ha sido utilizado en la recuperación de compuestos de bajo peso molecular, sin embargo, son muy escasos los reportes de estampados moleculares para macromoléculas como los son las proteínas (Pang y col., 2005; Ou y col., 2004). La dificultad para realizar un estampado molecular aumenta con el tamaño de la molécula a estampar, por lo que cabe resaltar la importancia de esta investigación debido a que se logró la recuperación de una proteína con un peso molecular de 80 kDa.
- B) El otro aspecto importante fue demostrar que la técnica del estampado molecular es promisoría para separar LF a partir de una mezcla de proteínas, lo que ha sido difícil de lograr por otras técnicas, a juzgar por el alto costo de la proteína y por la baja pureza de los productos comerciales disponibles.

El desarrollo a gran escala de este sistema permitiría contar con una técnica de purificación para la LF a partir del suero de leche, y con ello el aumento en el uso comercial de esta proteína de alto valor agregado a partir de una disminución en su costo de recuperación.

Bibliografía

- 📖 Abdallah F. y Chahine J. (2000). *Transferrins : Iron release from lactoferrin*. Journal of Molecular Biology 303, 255-266.
- 📖 Alais C. (1998). *Ciencia de la leche. Principios de la técnica lechera*. Continental, SA de CV. México, pp 40-50, 70-90.
- 📖 Amiot J., Bergeron L., Blais A., Bonin G. y Boudreaw A. (1992). *Ciencia y Tecnología de la leche. Principios y Aplicaciones*. Acribia, SA. de CV. España, Zaragoza, pp 1-3, 20-25, 31-32.
- 📖 Albert M. (2001). *Molecularly imprinted polymers; new molecular recognition, materials for selective solid-phase extraction of organic compounds*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 370, 795-802.
- 📖 Badui D. (1993). *Química de los Alimentos*. 3ª edición. Alhambra. México, pp 321-340.
- 📖 Baker H., Baker E. (2004). *Lactoferrin and Iron: structural and dynamic aspects of binding and release*. *Biometals* 17, 209-216.
- 📖 Blackberg L. y Hernell O. (1980). *Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step*. FEBS Letters 109, 180-184.
- 📖 Buchhoz H. y Scheper T. (2000). *Whey Proteins of milk; components functional in foods*. International Dairy Journal 9, 226-231.
- 📖 Castro B., Whitcombe M., Vulfson E., Duhalt R. y Bárzana E. (2001). *Molecular imprinting for the selective adsorption of organosulphur compounds present in fuels*. *Analytica Chimica Acta* 435, 83-90.
- 📖 Chen W., Sung C. y Lin F. (2001). *Molecular recognition in imprinted polymers; thermodynamic investigation of an analyte binding using microcalorimetry*. Journal of Chromatography A 923, 1-6.
- 📖 Creighton T. (1997). *Protein Structure*. 2a. edición. Oxford University Press. United States, pp 261-295.
- 📖 Curtis J. (1990). *Protein Secondary structure and circular dichroism*. *PROTEINS; Structure, function and genetics* 7, 205-214.

- 📖 Farnaud S. y Evans R. (2003). *Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties*. *Molecular Immunology* 40, 395-405.
- 📖 Fox P. y McSweeney P. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic and Professional. Reino Unido, pp 1,21-40, 56-62.
- 📖 García-Garibay M., Quintero R. y López M. (1993). *Biotecnología Alimentaria*. Limusa. México, DF., pp 153-156, 196-198.
- 📖 Hawkins D., Stevenson D. y Reddy S. (2005). *Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs)*. *Analytica Chimica Acta* 542, 61-65.
- 📖 Hilt J. y Byrne M. (2004). *Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules*. *Advanced DRUG DELIVERY Reviews* 56, 1599-1620.
- 📖 Hsiang S. y Hsiung Y. (1999). *Various forms of mouse lactoferrins, purification and characterization*. *Journal of Chromatography B* 726, 45-52.
- 📖 Krotz J. y Shea K. (2004). *Imprinted polymer membranes for the selective transport of targeted neutral molecules*. *Journal of the American Chemical Society* 118, 8154.
- 📖 Likic V., Strehler E. y Gooley P. (2003). *Dynamics of Ca²⁺ saturated calmodulin D129N mutant studied by multiple molecular dynamics simulations*. *Protein Science* 12, 2215-2229.
- 📖 Moore S., Anderson B., Groom C., Haridas M. y Baker E. (1997). *Three-dimensional Structure of diferric bovine Lactoferrin at 2.8 Å Resolution*. *Journal of Molecular Biology* 274, 222-236.
- 📖 Nicholls I., Adbo K., Andersson H., Ankarloo J. (2001). *Can we rationally design molecularly imprinted polymers?*. *Analytica Chimica Acta* 435, 9-18.
- 📖 Ohashi A., Murata E., Yamamoto K., Majita E. y Sano E. (2003). *New functions of lactoferrin and β-casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306, 98-103.
- 📖 Ou S., Wu M., Chou T. y Liu C. (2004). *Polyacrylamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme*. *Analytica Chimica Acta* 504, 163-166.

- 📖 Pang X., Cheng G., Li R. y Lu S. (2005). *Bovine serum albumin-imprinted polyacrylamide gel beads prepared via inverse-phase seed suspension polymerization*. *Analytica Chimica Acta* 550, 13-17.
- 📖 Pedersen L. y Mollerup J. (2003). *Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins*. *Journal of Chromatography B* 790, 161-173.
- 📖 Piletsky S., Alcock S. y Turner A. (2001). *Molecular imprinting: at the edge of the third millennium*. *TRENDS in Biotechnology* 19 (1), 9-12.
- 📖 Rachkov A. y Minoura N. (2001). *Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544, 255-266.
- 📖 Riechel P., Weiss T., Weiss M. y Ulber R. (1998). *Determination of the minor whey protein bovine Lactoferrin in cheese whey concentrates with capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A* 817, 187-193.
- 📖 Scopes R. (1986). *Protein Purification. Principles and practice*. E.U.A., pp 240-243, 245-253.
- 📖 Sharma A., Paramasivam M., Srinivasan a., Yadav M. y Singh T. (1998). *Three-dimensional Structure of Mare Diferric Lactoferrin at 2.6 Å Resolution*. *Journal of Molecular Biology* 289, 303-317.
- 📖 Sharma S., Kumar P., Betzel C. y Tej P. (2001). *Structure and function of proteins involved in milk allergies*. *Journal of Chromatography B* 756, 183-187.
- 📖 Shiomi T., Matsui M., Mizukami F. y Sakaguchi K. (2005). *A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes*. *Biomaterials* 26, 5564-5571.
- 📖 Spreer. (1992). *Lactología Industrial*. 6ª edición. Acibia, SA. de CV. España, Zaragoza, pp. 527-530.

- 📖 Takeuchi T. y Haginaka J. (1999). *Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers*. Journal of Chromatography B 728, 1-20.
- 📖 Tomé D. y Debabbi H. (1998). *Physiological Effects of Milk Protein Components*. International Dairy Journal 8, 383-392.
- 📖 Tsuda H., Sekine K., Kuhara T. y Takasuka N. (2000). *Milk and dairy products in cancer prevention; focus on bovine Lactoferrin*. Mutation Research 462, 227-233.
- 📖 Ulbricht M., Belter M., Langenhangen U. y Weigel W. (2002). *Novel molecularly imprinted polymer MIP, composite membranes via controlled surface and pore functionalizations*. Desalination 142, 293-295.
- 📖 Varnam A. y Sutherland J. (1994). *Milk and milk products. Technology, chemistry and microbiology*. Chapman and Hall. Gran Bretaña, pp 10-15.
- 📖 Walstra P. y Jenness R. (1987). *Química y Física Lactológica*. Acribia, SA de CV. España, pp 24-30, 90-102.
- 📖 Walstra P., Geurts T., Noomen A., Jellema A. y Boekel M. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Acribia, SA de C.V. España, pp 39-43, 108-114.
- 📖 Wriggers W., Mehler E., Pitici F., Weinstein H., (1998). *Structure and dynamics of calmodulin in solution*. Biophys. J. 74, 1622-1639.
- 📖 Zhang T., Liu F., Chen W., Wang J. y Li K. (2001). *Influence of intramolecular hydrogen bond of templates on molecular recognition of molecularly imprinted polymers*. Analytica Chimica Acta 450, 53-61.