



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

Propiedades fisicoquímicas y reológicas de disoluciones
acuosas de lactoferrina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA

JACQUELINE ALVARADO HERNÁNDEZ

ASESORAS

DRA. VIRGINIA AGUSTINA DELGADO REYES

DRA. MARÍA GUADALUPE SOSA HERRERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES.Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Propiedades fisicoquímicas y reológicas de disoluciones acuosas de lactoferrina

Que presenta la pasante: Jacqueline Alvarado Hernández
Con número de cuenta: 409079034 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Octubre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	I.A. Francisco Javier López Martínez	
VOCAL	I.A. Miriam Edith Fuentes Romero	
SECRETARIO	Dra. Virginia Agustina Delgado Reyes	
1er. SUPLENTE	Dra. Esther Agacino Valdés	
2do. SUPLENTE	I.A. Maritza Rocandio Pineda	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la fortaleza y sabiduría que me dio en cada momento, por ser el pilar de mi vida.

A mis padres, por su apoyo, amor, paciencia y consejos a lo largo de este camino ya que sin ellos no hubiera podido lograr una de las metas más importantes de mi vida.

A mis amigas “el futbolito” que estuvieron compartiendo conocimientos y aventuras en nuestra vida universitaria, por sus consejos para seguir adelante, por cada día de diversión que tuvimos y su valiosa amistad.

A mi novio que me alentó a terminar con este proyecto, que me dio palabras para no rendirme y continuar con una nueva meta.

A mi asesoras Virginia Delgado y Guadalupe Sosa por brindarme su apoyo en la redacción de esta tesis, por su paciencia y enseñanzas.

Al proyecto PAPIITIN118214, 2014, DGAPA, UNAM, “Propiedades reológicas y fisicoquímicas de biomoléculas funcionales de interés en la formación de sistemas coloidales alimenticios”, que me permitió la investigación de este, y al apoyo económico de las Becas de Titulación para ex alumnos de la UNAM.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	vi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	
1.1 Proteínas lácteas	1
1.1.1 Propiedades funcionales de las proteínas	3
1.1.2 Lactoferrina	6
1.2 Propiedades fisicoquímicas de proteínas	15
1.2.1 Adsorción de proteínas	15
1.2.1.1 Concentración de adsorción crítica	20
1.2.1.2 Técnicas o métodos de evaluación de la tensión superficial	21
1.2.2 Tamaño de partícula	23
1.2.2.1 Técnicas o métodos de evaluación del tamaño de partícula	26
1.2.3 Propiedades de carga de partícula	28
1.2.3.1 Técnicas o métodos de evaluación de potencial zeta	30
1.3 Reología	31
1.3.1 Clasificación reológica de los materiales	34
1.3.2 Propiedades reológicas de disoluciones	37
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	
2.1 Objetivos	39
2.2 Materiales	39
2.3 Métodos	40
2.3.1 Preparación de las muestras	40
2.3.2 Determinación de las propiedades fisicoquímicas	40
2.3.3 Comportamiento reológico	43
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Propiedades fisicoquímicas	45
3.2 Comportamiento reológico	55
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1.1 Composición proteínica comparativa de la leche humana y de vaca (g/L).	7
1.2 Comparación entre diferentes formas de lactoferrina.	9
1.3 Composición de lactoferrina bovina (Lf)	10
1.4 Niveles máximos de uso de lactoferrina bovina en alimentos.	14
1.5 Propiedades cuantificables de los métodos estáticos y dinámicos.	23
1.6 Diámetro de partícula, diámetro equivalente y tamaño geométrico.	27
1.7 Valores de potencial zeta y estabilidad de dispersiones.	31
1.8 Ecuaciones de los modelos reológicos.	37
3.1 Valores de densidad relativa y absoluta de las disoluciones de lactoferrina.	45
3.2 Valores de tensión superficial al equilibrio de disoluciones acuosas de lactoferrina.	48
3.3 Distribución de tamaño de disoluciones acuosas de lactoferrina.	52
3.4 pH de disoluciones de lactoferrina.	53
3.5 Potencial zeta de disoluciones acuosas de lactoferrina.	54
3.6 Viscosidad de disoluciones acuosas de lactoferrina.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
1.1	Funcionalidades de las proteínas de la leche.	5
1.2	Estructura terciaria de lactoferrina bovina.	8
1.3	Funciones propuestas desde el punto de vista nutricional y farmacológico de lactoferrina.	11
1.4	Fuerzas de atracción entre dos líquidos no miscibles.	16
1.5	Respuesta de tensión interfacial dinámica típica de proteína en disolución acuosa diluida de adsorción en interface aceite-agua.	18
1.6	Esquema de adsorción de proteína globular en la interfase aceite-agua en el Régimen I, II y III de la tensión interfacial dinámica.	18
1.7	Concentración de adsorción crítica.	21
1.8	Representación esquemática de la estructura supramolecular de grandes partículas de proteína con pequeñas esferas que representan subpartículas.	24
1.9	Diferencia entre difusión libre y difusión de partícula restringida.	25
1.10	Doble capa eléctrica.	29
1.11	Deformación lineal de una barra rectangular.	32
1.12	Deformación bajo corte o cizalla de una barra rectangular.	33
1.13	Deformación típica de un elemento finito.	34
1.14	Clasificación del comportamiento reológico.	35
1.15	Curvas de fluidos típicos, independientes del tiempo.	36
3.1	Tensión superficial de disoluciones de lactoferrina en función del tiempo.	47
3.2	Tensión superficial en función del logaritmo natural de la concentración de adsorción crítica de disoluciones acuosas de lactoferrina.	50
3.3	Distribución de tamaño de partícula a diferentes concentraciones de lactoferrina.	51

3.4	Curva de comportamiento al flujo de disoluciones acuosas de lactoferrina a diferentes concentraciones.	56
3.5	Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de disoluciones acuosas de lactoferrina a diferentes concentraciones.	56
3.6	Viscosidad en función de la concentración de disoluciones de lactoferrina	57

RESUMEN

La lactoferrina es una glicoproteína multifuncional de unión a hierro perteneciente a la familia de las transferrinas producida por diversas especies de animales mamíferos; ha sido estudiada sobre su estructura, metabolismo y actividad biológica principalmente. En el presente trabajo se determinaron las propiedades fisicoquímicas y reológicas de disoluciones acuosas de lactoferrina, con la finalidad de identificar las propiedades funcionales de la misma para su aplicación en productos alimenticios. Se estudiaron a diversas concentraciones y a una temperatura de 25 °C. Dentro de las propiedades fisicoquímicas se estudiaron la adsorción en interfase por medio de la tensión superficial, la distribución de tamaño de partícula, el potencial zeta y el pH. En el estudio reológico se incluyó la caracterización del comportamiento al flujo de las disoluciones acuosas de lactoferrina en un intervalo de concentración de 0.1% a 15%, observándose un fluido con comportamiento newtoniano donde la viscosidad incremento (1.0 a 5.10 mPa·s) en función de la concentración.

Para la evaluación de las propiedades fisicoquímicas, se realizó un barrido a 10 concentraciones de lactoferrina (0.0001, 0.0003, 0.001, 0.003, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.3 y 0.5 % p/p), a las cuales se les determinó la densidad y tensión superficial, se observó un decremento en la tensión superficial de las disoluciones con el incremento de la concentración, determinando la concentración crítica de adsorción a un valor de 0.01 %.

INTRODUCCIÓN

La leche puede ser considerada como el primer alimento funcional en la vida, ya que contiene, no sólo nutrientes para el recién nacido, sino también los componentes esenciales para el desarrollo de órganos y de la fisiología normal. Por ello, el objetivo de diversas investigaciones es identificar y producir los componentes favorables de la leche para mejorar la nutrición y las intervenciones terapéuticas específicas (Conesa y col., 2010). Las proteínas de la leche son vehículos naturales que evolucionaron para entregar micronutrientes esenciales (por ejemplo, calcio y fosfato), bloques de construcción (aminoácidos), así como componentes del sistema inmunitario (inmunoglobulinas, como la lactoferrina). La estructura anfifílica de la mayoría de las proteínas de la leche confiere excelentes propiedades de superficie (Livney, 2010). Su capacidad para adsorberse en la interfase aceite-agua y estabilizar emulsiones es influenciada por su estructura, flexibilidad, estado de agregación, pH, fuerza iónica (particularmente iones calcio), y temperatura (Livney, 2010). Algunas proteínas lácteas o de la leche también son llamadas proteínas bioactivas (Lonnerdal, 2013), dentro de las cuales destaca una molécula importante aislada de la leche y suero de leche de bovino, la lactoferrina, que es una proteína multifuncional con propiedades inmunomoduladoras, antibacterianas, y anticancerígenas con un alto potencial biológico para el organismo (McSweeney y Fox, 2003). Las fuentes por excelencia de lactoferrina bovina nativa son la leche (bLf) y el calostro de bovino que contienen 0.2 mg/mL y 1.5 mg/mL, respectivamente (Drago, 2007), por lo que el consumo de esta proteína es importante en los primeros años de los seres humanos. En los últimos 25 años, la investigación de lactoferrina bovina (bLf) se ha destacado en avances notables que han ampliado su valor para promoción de la salud (Tomita y col.,

2009), sin embargo, a pesar de haber sido descubierta en el año de 1960, fue hasta el año de 1984 que se comenzó a investigar la estructura de lactoferrina humana; a partir de estas investigaciones, la empresa Morinaga Milk Industry inició en el año de 1986 la comercialización de fórmulas lácteas adicionadas con lactoferrina bovina y en el año de 1997 comercializó un yogurt adicionado con la misma. Hasta la fecha, las investigaciones realizadas sobre lactoferrina han sido enfocadas al estudio de sus propiedades nutraceuticas dentro del área farmacéutica, debido a sus propiedades como antimicrobiano en distintas cepas de microorganismos causantes de enfermedades e infecciones (Mine y col., 2010). Sin embargo, el estudio de esta proteína es insuficiente en el ámbito de alimentos sobre todo con relación a sus propiedades físicas o fisicoquímicas, y dado a sus atributos nutraceuticos y a las investigaciones recientes en aplicaciones como la fortificación de la leche (Nandi y col., 2002) y debido a que existen aportes de que se ha investigado el uso de lactoferrina derivada de la leche de vaca como ingrediente en alimentos seleccionados, incluyendo leche en polvo, yogurt, helados, sorbetes, y gomas de mascar (Parlamento Europeo y del Consejo, 2012), es importante caracterizar la lactoferrina, a través de estudios reológicos, y fisicoquímicos, con la finalidad de identificar su funcionalidad y aplicación en la formulación de productos alimenticios.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 Proteínas lácteas

La leche es un fluido secretado por hembras de todas las especies de mamíferos, inicialmente para completar los requerimientos nutricionales del neonato como: energía (suministrado por lípidos y lactosa), aminoácidos esenciales y grupos amino para la biosíntesis de aminoácidos no esenciales (suministrado por proteínas), ácidos grasos esenciales, vitaminas y elementos inorgánicos, y por supuesto agua. Así mismo, la leche contiene diferentes factores que contribuyen a la protección del neonato y la glándula mamaria de enfermedades, además de diversas funciones fisiológicas, estas funciones son aportadas por proteínas y péptidos. Los péptidos y proteínas fisiológicamente más importantes incluyen las inmunoglobulinas, enzimas, inhibidores enzimáticos, factores de crecimiento, hormonas y agentes antibacteriales (McSweeney y Fox, 2003).

Las proteínas de la leche humana en gran medida se pueden clasificar en tres grupos: caseínas, proteínas de suero de leche, y mucinas (proteínas de membrana de glóbulos de grasa de la leche). Las proteínas del suero de leche y las caseínas constituyen la mayor parte y su contenido cambia de relación en el transcurso de la lactancia, mientras que las mucinas representan un pequeño porcentaje del total de proteínas y su concentración varía poco durante la lactancia (Wada y Lönnerdal, 2014). Cabe destacar que ejercen actividades fisiológicas en beneficio de la salud, las cuales incluyen la asistencia en la digestión de los lípidos e hidratos de carbono (lipasas estimulantes de sales biliares y amilasa) y las limitaciones en la digestión de proteínas (α_1 -antitripsina), la facilitación de la absorción de nutrientes (β -caseína, α -lactoalbúmina, lactoferrina), actividad antimicrobial (suministrado por inmunoglobulina A, lisozimas, lactoferrina, lactoperoxidasa y κ -caseína), efecto prebiótico (κ -caseína y lactoferrina), entre otros (Wada y Lönnerdal, 2014).

A diferencia de la mayoría de otros componentes orgánicos encontrados en la leche, las inmunoglobulinas (Ig) no son sintetizadas por las células epiteliales mamarias, sino

que éstas son sintetizadas por los linfocitos B y se conocen también como anticuerpos, estas son proteínas producidas por el sistema inmunitario que tienen una especificidad definida para partículas extrañas (inmunógenos) que estimulan su síntesis. Las inmunoglobulinas son un grupo diverso de moléculas que reaccionan y reconocen un amplio intervalo de estructuras antigénicas específicas y que dan lugar a una serie de efectos resultado de la eliminación final del antígeno presentado. Por lo que algunas inmunoglobulinas tienen funciones protectoras adicionales (Baynes y Dominiczak, 2008). Sin embargo, las propiedades funcionales y físicas de las inmunoglobulinas en las secreciones mamarias pueden ser afectadas por otras proteínas encontradas en la leche como lo son las proteínas de unión a hierro (McSweeney y Fox, 2003).

Las proteínas con unión a hierro ejercen muchas funciones fisiológicas en sistemas biológicos, ya que estas proteínas están implicadas en el transporte de hierro en el cuerpo el cual es almacenado en varios compartimientos. Otras proteínas con unión a hierro son las enzimas, que requieren de hierro como un co-factor para su actividad.

En los últimos años se han realizado varios estudios centrados en las principales proteínas de la leche por sus propiedades para la entrega de agentes bioactivos y la utilización de estas como vehículos naturales para su entrega, las cuales podemos definir como proteínas bioactivas, que son proteínas con funciones más allá de la nutrición e incluyen la actividad enzimática, la mejora de absorción de nutrientes, la estimulación del crecimiento, modulación del sistema inmune y defensa contra los patógenos (Lonnerdal, 2013). Algunas de las actividades fisiológicas provistas por las proteínas bioactivas de la leche en el tracto gastrointestinal incluyen:

- Aumento de la absorción de nutrientes.
- Inhibidores de enzimas tales como inhibidores de la tripsina que pueden limitar la digestión.
- Estimulación del crecimiento.
- Modulación del sistema inmune.
- Defensa contra patógenos.

1.1.1 Propiedades funcionales de las proteínas

Las proteínas no sólo son fuentes de aminoácidos sino que, debido a su naturaleza polimérica, su presencia influye decididamente en las características reológicas y de textura del alimento, que hacen que éste sea más aceptado por el consumidor. En términos, generales, las propiedades funcionales se definen como cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecta y modifica algunas características de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto, por ejemplo, son propiedades funcionales la hidratación, el espumado, la emulsificación, la gelificación, entre otros; éstas dependen fundamentalmente de factores intrínsecos propios de la molécula (conformación, relación y disposición de los aminoácidos, hidrofobicidad, ionización, carga eléctrica, forma, peso molecular, entre otros), así como de factores extrínsecos del medio que los rodea, y que en ocasiones puede modificarse (pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica) (Badui, 2006).

Las proteínas de la leche se pueden unir a una variedad de moléculas e iones en diferentes grados de afinidad y especificidad. Muchas de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, incluyen su capacidad de unirse a iones y a pequeñas moléculas, principalmente por medio de enlaces hidrófobos; así como también tienen propiedades de auto-ensamblaje y de superficie; capacidad de formación de gel, a través de diversos mecanismos de reticulación; hidratación del gel en respuesta a la liberación desencadenada de pH y comportamiento de contracción, y sus interacciones con otras macromoléculas, para formar complejos y conjugados con combinaciones sinérgicas de las propiedades de sus componentes, como se ilustra en la Figura 1.1. (Livney, 2010), y se describen a continuación:

- a) Unión iónica, las proteínas lácteas se unen a una variedad de moléculas con diferentes grados de afinidad y especificidad, por ejemplo, la lactoferrina comúnmente se une a iones Fe^{+3} , aunque también puede unirse a otros iones metálicos como el cobre, cromo, manganeso y el aluminio *in vivo*.
- b) Las proteínas lácteas se unen a moléculas hidrofóbicas, por diversos mecanismos, interacciones hidrofóbicas, atracción de Van der Waals y enlaces hidrógeno.

- c) La estructura anfifílica de la mayoría de proteínas de la leche confiere excelentes propiedades superficiales.
- d) Las principales proteínas lácteas tienen la propiedad de auto ensamblaje y co-ensamblaje; por su forma natural de organización en micelas; ésta puede ser mejorada mediante la formación de conjugados covalentes con polisacáridos.
- e) Las proteínas lácteas tienen excelentes propiedades de gelificación, y en este proceso se ve involucrado el potencial de iones hidronio u oxhidrilo, así como el punto isoeléctrico.
- f) Hidratación del gel en respuesta a la liberación desencadenada de pH.
- g) Los conjugados de la reacción de Maillard, por lo general entre los grupos ϵ -amino en las proteínas y los residuos de carbonilo del extremo reductor en sacáridos, generalmente tienen propiedades superiores de estabilización de la superficie, en comparación con sus componentes pre-conjugados. Un conjugado de una proteína que tiene dominios hidrófobos y un polisacárido es una forma de un co-polímero de bloque, que puede auto ensamblar o adsorber a una interfase aceite-agua como un agente tensioactivo, y al mismo tiempo formar un estabilizador con su bloque de polisacárido.
- h) Formación de complejos electrostáticos, las proteínas del suero de leche y caseínas combinan su habilidad para interactuar con biopolímeros aniónicos o catiónicos cargados oportunamente, para estabilizar emulsiones primarias.

Por ejemplo, las proteínas el suero de leche y las caseínas tienen las siguientes características (Thompson y col., 2009):

- ⊗ Solubilidad a pH de 4.6; las caseínas son insolubles bajo estas condiciones.
- ⊗ Coagulabilidad después de proteólisis limitada.
- ⊗ La estabilidad térmica de las proteínas del suero es típica en proteínas globulares.
- ⊗ Varias de las proteínas del suero de leche tienen una función biológica.
- ⊗ Las proteínas existen en la leche en monómeros o como pequeñas estructuras cuaternarias, mientras que las caseínas existen como grandes agregados.

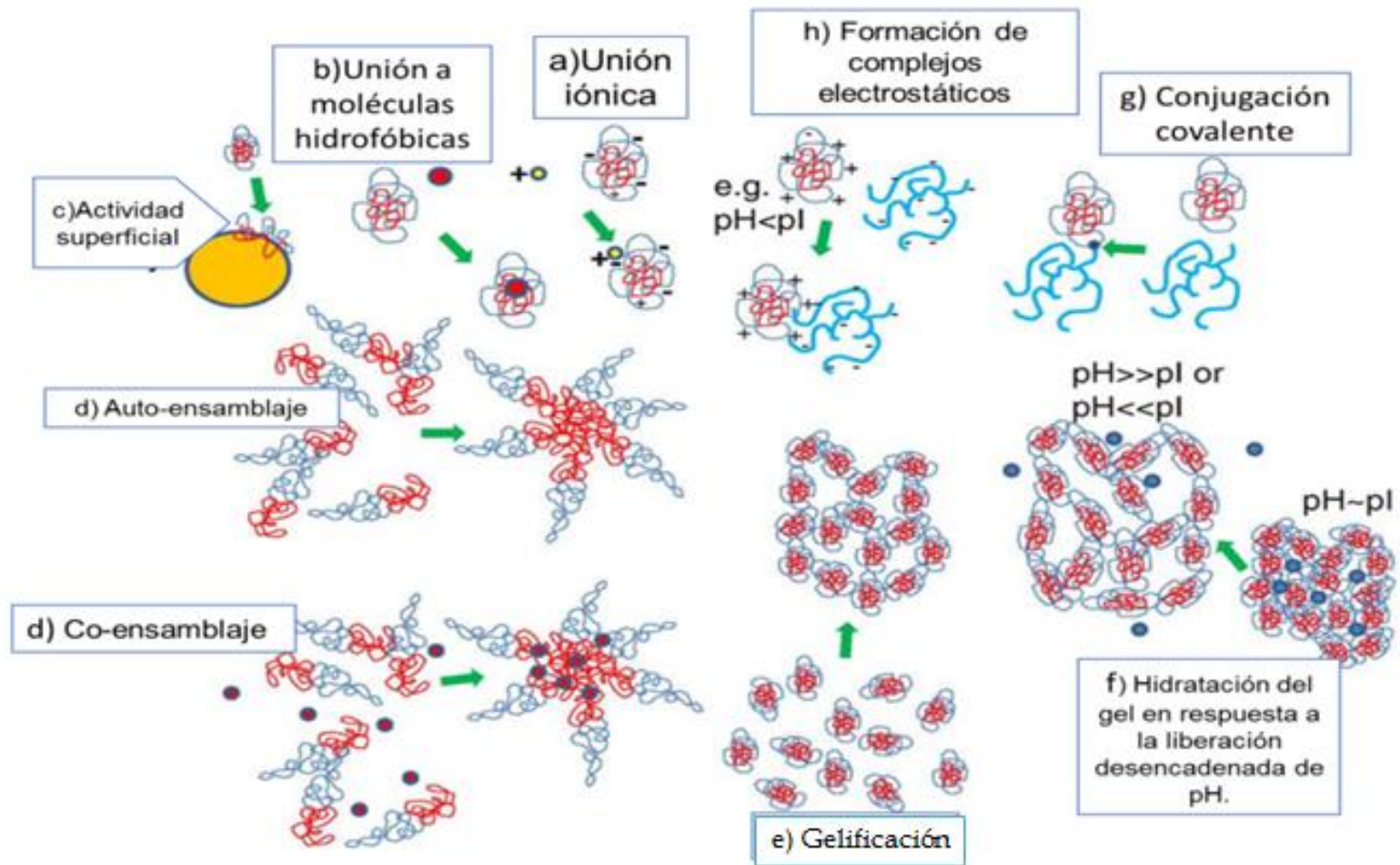


Figura 1. 1 Funcionalidades de las proteínas de la leche (adaptado de Livney, 2010).

Dentro de las características de las proteínas lácteas encontramos a la lactoferrina que es una proteína con función biológica y propiedades funcionales.

1.1.2 Lactoferrina

La lactoferrina fue identificada primero en leche de bovino por Sørensen y Sørensen (1939) y subsecuentemente fue aislada en leche humana y caracterizada por Johansson (1960); desde entonces la lactoferrina de origen humano y bovino, ha sido sujeta a numerosos estudios estructurales y funcionales, así como de su actividad biológica (McSweeney y Fox, 2003).

La lactoferrina (Lf) es una glucoproteína de unión a hierro de la familia de las transferrinas (proteínas transportadora específica de hierro en el plasma) que es expresada en la mayoría de los fluidos biológicos (Cuéllar y Falabella, 2004) y es el mayor componente del sistema inmune innato de los mamíferos (Mine y col., 2010). Es una proteína globular de la leche bovina con un punto isoeléctrico inusualmente alto ($pI > 8$), el cual puede dar lugar a las propiedades funcionales novedosas en alimentos y otros productos, por su carácter catiónico en un amplio intervalo de pH (Tokle y McClements, 2011).

Origen

Inicialmente, se pensaba que la lactoferrina era exclusivamente una proteína de la leche, posteriormente se identificó en otras secreciones corporales, incluyendo, la saliva, lágrimas, bilis, líquido pancreático, semen, el moco de los bronquios, moco nasal, y las vías cervicales (Conesa y col., 2010). La leche humana, la de cerdos y la de ratones es rica en lactoferrina, mientras que la leche de vaca contiene bajas concentraciones como se muestra en el Cuadro 1.1, por lo que el consumo de esta proteína es importante en los primeros años de los seres humanos; y posiblemente la adición de esta proteína a sistemas alimenticios, aumentará el nivel de lactoferrina en consumo. La fuente por excelencia de lactoferrina bovina (bLf) nativa son la leche y el calostro de bovino que contiene 0.2 mg/mL y 1.5 mg/mL respectivamente (Drago, 2007).

Cuadro 1. 1 Composición proteínica comparativa de la leche humana y de vaca.

Proteínas	Leche humana (g/L).	Leche de vaca (g/L).
Caseína	3.6	26
α_{s1}		10
α_{s2}		2.6
B		9.3
K		3.3
Γ		0.8
β lactoglobulina	Trazas	3.2
α lactoalbúmina	2.8	1.2
Seroalbúmina	0.6	0.4
Lisozima	0.4	Trazas
Lactoferrina	2.0	0.1
Inmunoglobulina	1.0	0.7

(Cheftel y col., 1985)

Estructura de lactoferrina

La lactoferrina es una glucoproteína monomérica no hémica de unión a hierro de 80 kDa, que representa cerca de 690 aminoácidos y comparten identidades de por lo menos 65%. Todas las lactoferrinas, como cualquier miembro de la familia de las transferrinas, poseen una doble secuencia de repetición interna con aproximadamente 40% de identidad, lo que indica una evolución de duplicación de genes (Mine y col., 2010).

La proteína contiene enlaces disulfuro intramoleculares, pero está ausente de los grupos sulfhidrilo libres. La lactoferrina bovina contiene cuatro glicanos ligados con un enlace tipo N, que se componen de diferentes cantidades de ácido N-acetil-lactosamínico, galactosa, manosa, L-fucosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-

galactosamina y residuos de ácido N-acetil-neuramínico. A diferencia de la lactoferrina humana, la lactoferrina bovina también contiene glucanos del tipo oligomanosas (Claire, 2013).

La estructura tridimensional de lactoferrina bovina se muestra en la Figura 1.2. La proteína comprende de dos lóbulos homólogos correspondientes a sus terminales amino y carboxilo conectados por un giro de tres α -hélices. Cada lóbulo se subdivide en dos dominios, con un sólo sitio de unión a hierro. Cada átomo de hierro (Fe^{+3}) está coordinado a cuatro proteínas ligantes, es decir, dos tirosinas, un aspartame, y una histidina; así como a un anión sinérgico normalmente carbono *in vivo* (Farnaud y Evans, 2003).

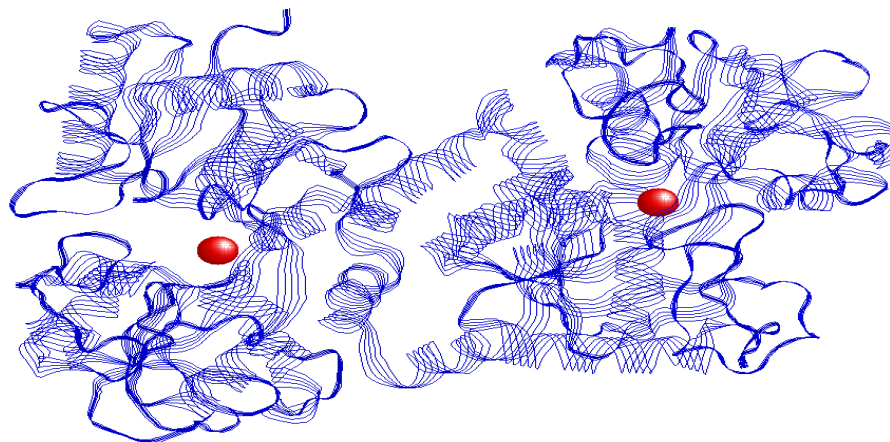


Figura 1. 2. Estructura terciaria de lactoferrina bovina (Serrano G., 2014).

En el caso de la lactoferrina bovina su estructura es una sola cadena polipeptídica con 17 enlaces disulfuro intermoleculares, pero no tiene residuos de cisteína libre. La lactoferrina se une principalmente a Fe^{2+} o Fe^{3+} , pero también se puede unir a Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} . La lactoferrina puede existir libre de hierro (Fe^{+3}) llamada apo-lactoferrina, o saturada con hierro (Fe^{+3}) nombrada holo-lactoferrina (McCarthy y col., 2013), su conformación depende de si se encuentra unida a hierro o no. La apo-lactoferrina tiene una conformación abierta, mientras que la holo-lactoferrina tiene una

conformación cerrada por lo cual es más resistente a la proteólisis y a la desnaturalización térmica (Claire, 2013).

Propiedades fisicoquímicas de lactoferrina

De acuerdo con Bokkhim y col. (2013), las tres formas de lactoferrina bovina (bLf), la apo, nativa y holo, tienen un contenido de hierro del 0.9%, 12.9% y 99.7%, respectivamente, las cuales se caracterizan por sus propiedades fisicoquímicas específicas. El color, la tensión superficial, las propiedades térmicas, la carga de la partícula y el comportamiento reológico de lactoferrina se ven afectados dependiendo de su forma.

Las investigaciones realizadas por Bokkhim y col. (2013), en disoluciones acuosas de lactoferrina al 1% p/p, de distintas formas de lactoferrina bovina, dependiendo de la saturación de hierro y su conformación, muestran cambios significativos en sus propiedades fisicoquímicas, tales son la tensión superficial que tiende a decrecer con la disminución en el contenido de hierro y el pH, como se muestra en el Cuadro 1.2. En el mismo se presenta una comparación entre diferentes formas de lactoferrina ya sea apo, holo o nativa, mientras que en el Cuadro 1.3 se muestra la composición de apo-lactoferrina.

Cuadro 1. 2 Comparación entre diferentes formas de lactoferrina (Lf).

Lactoferrina	Proteína (%)	Hierro (µg/g Lf)	Saturación de hierro (%)	Sodio (µg/g Lf)	pH natural (1% p/p)	Tensión superficial (mN m ⁻¹)
Apo-lactoferrina	94 ± 4	12 ± 1.6	0.9 ± 0.1	1317	5.7 ± 0.1	53.1 ± 1.6
Nativa-lactoferrina	96 ± 3	81 ± 1.1	12.9 ± 0.1	1300	5.4 ± 0.1	56.5 ± 0.7
Holo-lactoferrina	98 ± 1	1395 ± 38.4	99.7 ± 2.7	74	6.2 ± 0.1	59.3 ± 0.9

Cuadro 1. 3 Composición de lactoferrina bovina (bLf).

Componentes	Cantidad
Humedad	menos de 4.5%
Cenizas	menos de 1.5%
Arsénico	menos de 2 mg/kg
Hierro	menos de 350 mg/kg
Proteínas	más del 93.0%
de las cuales lactoferrina bovina	más del 95.0%
de las cuales otras proteínas	menos del 5.0%
pH (solución al 2%, 20 °C)	de 5.2 a 7.2
Solubilidad (solución al 2%, 20°C)	Completa

(Parlamento Europeo y del Consejo , 2012)

Actividad multifuncional

Desde que la lactoferrina fue identificada como una proteína de unión a hierro, muchas de sus funciones biológicas inicialmente sugeridas fueran relacionadas con esta propiedad. La lactoferrina fue encontrada para unirse específicamente a las biopsias intestinales y fue propuesta para estar implicada en la regulación de la absorción de hierro en la mucosa (McSweeney y Fox, 2003).

En estudios clínicos y en animales se ha descubierto que la lactoferrina posee diversas propiedades antimicrobianas además de que su administración oral exhibe actividades reguladoras sobre la inflamación y diversos componentes humorales y celulares del sistema inmunitario, ésto podría deberse a su estructura con unión a hierro.

Las diversas actividades multifuncionales que se ilustran en la Figura 1.3, y que se han adjudicado a esta proteína han estimulado un creciente interés en la industria

farmacéutica, biotecnológica y alimentaria por su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades asociadas a disfunciones metabólicas, y debido a su capacidad de secuestrar el Fe^{3+} y su expresión de virulencia de ciertas bacterias patógenas, le confieren a la lactoferrina propiedades bacteriostáticas (Drago, 2007).

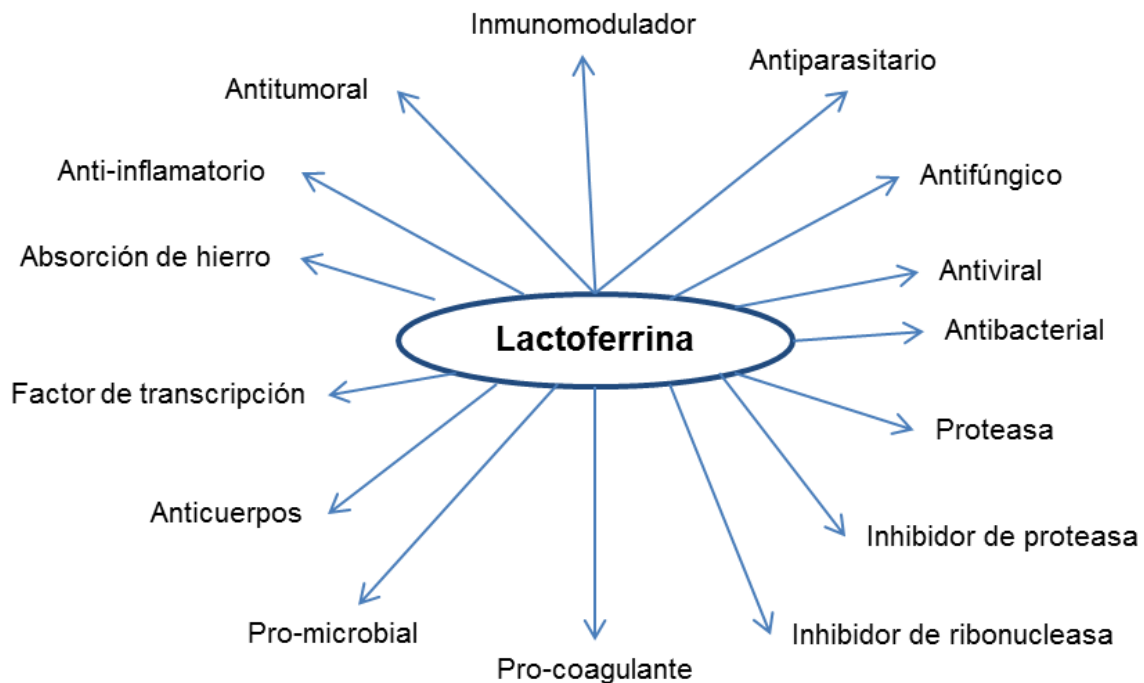


Figura 1. 3 Funciones propuestas desde el punto de vista nutricional y farmacológico de lactoferrina (Adaptado de Farnaud y Evans, 2003).

En relación con otros efectos de la lactoferrina, se han llevado a cabo varios estudios que muestran que la lactoferrina favorece el establecimiento de bifidobacterias en el intestino de recién nacidos. A lo largo del tiempo se han propuesto muchas funciones y aún continúan siendo propuestas para la lactoferrina, aunque algunas de ellas están claramente relacionadas con sus propiedades de unión a hierro (Drago, 2007) y que se describen a continuación.

Actividad antiinflamatoria y pro-inflamatoria

El efecto antiinflamatorio se le atribuye a su capacidad de inducir la secreción de mediadores antiinflamatorios como la interleucina (IL), y paralelamente, inhibe la liberación de potentes mediadores pro inflamatorios como IL-1, TNF (factor de necrosis tumoral) (Drago, 2007).

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de la lactoferrina está relacionada con su facultad de captar iones Fe^{3+} , (catalizadores de reacciones óxido-reducción). Por tal motivo se han hecho diversos estudios adicionando apo-lactoferrina recombinante humana o lactoferrina bovina a leche infantil de fórmula, en la que se observó una atenuación de la formación de radicales libres y peróxidos de lípidos. Estos resultados sugieren que la adición de la lactoferrina a la leche o alimentos infantiles tendría un efecto dual como antioxidante y antimicrobiano (Drago, 2007).

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de la lactoferrina está bien establecida. Sin embargo, la lactoferrina es ahora conocida por poseer un segundo tipo de actividad antimicrobiana, bactericida frente a la bacteriostática, que es el resultado de una interacción directa entre la proteína y la bacteria (Farnaud y Evans, 2003). Otros estudios han demostrado que la lactoferrina es bactericida sólo cuando está en su estado libre de hierro y que lactoferrina saturada con hierro tiene una actividad antimicrobiana reducida. La lactoferrina juega un papel importante en la inmunidad innata en una amplia gama de patógenos; los cuales incluyen: bacterias, virus, hongos y parásitos. Adicionalmente, posee actividad bactericida asociada a su capacidad de alterar la permeabilidad de bacterias, pues al ser una proteína exhibe carga positiva que le permite unirse a estructuras con carga negativa, afectando su integridad (Mohamed y col., 2005).

Aplicación en alimentos

Las investigaciones de la lactoferrina realizadas en el área de alimentos son mínimas, fue en 1986 cuando la empresa Morinaga Milk Industry realizó el primer alimento adicionado con lactoferrina, siendo éste un nuevo avance en fórmulas lácteas para infantes. Los bebés amamantados son más saludables que los bebés alimentados con fórmula, lo que puede deberse en parte a la falta de componentes como la lactoferrina humana (hLf) en la fórmula infantil. Por lo tanto, la fortificación de la leche artificial con proteínas bioactivas tales como lactoferrina humana recombinante (rhLf) proporciona beneficios para la salud (Nandi y col., 2002).

Recientemente se han realizado estudios en emulsiones aceite en agua, estabilizadas por lactoferrina o en combinación de proteínas, como es lactoferrina/ β -caseína. Esta investigación fue realizada por Tokle y McClements (2011) sobre propiedades fisicoquímicas de lactoferrina como estabilizante; determinaron el efecto del pH, la adición de sales y temperatura. Algunos de los factores con los cuales llevaron a cabo su experimentación, fue con proceso térmico de 30-90 °C durante una exposición de 20 min, adición de sales como NaCl y CaCl₂ (0-200 mM), así como variación de pH en un intervalo de 2 a 9 en el cual se mantuvo estable la emulsión, sin embargo, encontraron que las emulsiones eran altamente inestables a pH mayores de 5 cuando se calentaba a 50 °C. La estabilidad de las emulsiones para la adición de sales dependió del pH y el tipo de sal, los cuales fueron atribuidos a la unión de iones conjugados y a los efectos electrostáticos. Se concluyó que en emulsiones estabilizadas por lactoferrina, a un pH de 3, se mantuvieron estables en niveles altos de sal (200 mM NaCl o CaCl₂). Estos resultados fueron interpretados en términos de la influencia de las condiciones ambientales sobre las interacciones coloidales entre glóbulos de grasa recubiertos con proteína. En particular, se observaron cambios en la atracción hidrofóbica causada por la desnaturalización térmica de las proteínas globulares adsorbidas, y cambios en la repulsión electrostática causada por alteraciones en la solución de pH y/o fuerza iónica. Estos resultados sugieren que los sistemas a base de emulsiones con buena estabilidad fisicoquímica pueden ser creados usando lactoferrina como emulsificante.

Cuadro 1. 4 Niveles máximos de uso de lactoferrina bovina en alimentos.

Categoría de alimentos	Niveles máximos de uso de bLf
Preparados para lactantes y preparados de continuación (listos para su consumo)	100 mg/ 100 mL
Alimentos a base de leche destinados a niños de corta edad (listos para su consumo)	200 mg/ 100 g
Alimentos elaborados a base de cereales (sólidos)	670 mg/ g
Alimentos para usos médicos especiales	En función de las necesidades de las personas, hasta 3 g/ día
Bebidas a base de leche	200 mg/ 100 g
Mezclas en polvo para bebidas a base de leche (listas para su consumo)	330 mg/ 100 g
Bebidas a base de leche fermentada (incluidas bebidas de yogur)	50 mg/ 100 g
Bebidas no alcohólicas	120 mg/ 100 g
Productos a base de yogur	80 mg/ 100 g
Productos a base de queso	2000 mg/ 100 g
Helados	130 mg/ 100 g
Pasteles y pastas	1000 mg/ 100 g
Caramelos	750 mg/ 100 g
Chicle	3000 mg/ 100 g

(Parlamento Europeo y del Consejo , 2012)

Morinaga Milk Industry Co., Ltd. ha investigado el uso de lactoferrina derivada de la leche de vaca como ingrediente en alimentos seleccionados, incluyendo leche en polvo, yogur, helados y sorbetes, y gomas de mascar. Las categorías de productos a los que la industria Morinaga pretende añadir lactoferrina derivada de leche de vaca y

los correspondientes niveles máximos de uso se resumen en el Cuadro 1.4, se muestran las posibles aplicaciones de lactoferrina en productos alimenticios así como los niveles máximos recomendados para su uso.

1.2 Propiedades fisicoquímicas de proteínas

1.2.1 Adsorción de proteínas

La adsorción es el fenómeno por el cual las moléculas de un soluto se concentran en una superficie por la acción de fuerzas intermoleculares. Con base en la interacción soluto-adsorbente se pueden distinguir cuatro tipos básicos de adsorción: física, iónica, por afinidad e hidrofóbica. Biomoléculas de alto peso molecular, como las proteínas se adsorben con diferentes mecanismos moleculares, siendo algunos de los principales impulsores de dicha adsorción la energía de superficie, las fuerzas intermoleculares, la hidrofobicidad y la interacción iónica o electrostática, por lo que la adsorción que presentan las proteínas, suele definirse como la tendencia de una superficie a disminuir de forma espontánea como resultado de los átomos o moléculas en la superficie que tienden a concentrarse en la interfase y que puede ser alterada mediante la adición de un segundo componente. Estos tienden a acumularse en la superficie en vez de en la mayor parte del líquido, formando una capa monomolecular orientada (o monocapa) (Vogler, 2011; Davies y Rideal, 1963).

Teniendo en cuenta la definición de adsorción podemos continuar la descripción de la tensión superficial y la tensión interfacial que son dos propiedades fundamentales por el cual las interfaces líquido-líquido y aire-líquido son caracterizadas.

Considerando un líquido en contacto con el vapor, como se muestra en la Figura 1.4. Una molécula en el seno de un líquido se somete a fuerzas de atracción en todas las direcciones por las moléculas circundantes y es prácticamente un campo uniforme de la fuerza. Pero para la molécula en la superficie del líquido, la atracción neta hacia la mayoría del líquido es mucho mayor que la atracción hacia la fase de vapor debido a

que las moléculas en la fase de vapor son ampliamente dispersas. Esto indica que las moléculas en la superficie son arrastradas hacia el interior (Ghosh, 2009).

De manera similar, considerando dos líquidos inmiscibles en contacto uno con el otro, las moléculas en la superficie de ambos líquidos experimentan fuerzas desequilibradas de atracción como se explicó en la Figura 1.4. Estas fuerzas desequilibradas en la superficie de separación entre los dos líquidos no miscibles (en la interfase) dan lugar a la tensión interfacial, la cual se puede definir de la misma forma que la tensión superficial (Ghosh, 2009).

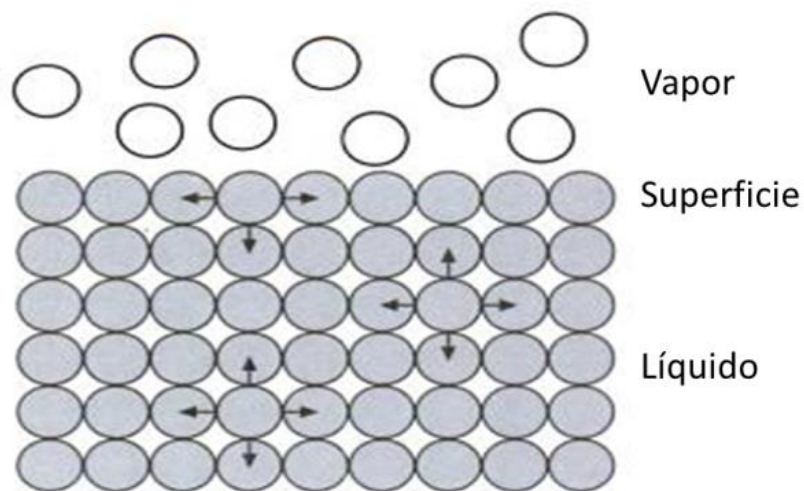


Figura 1. 4 Fuerzas de atracción entre dos líquidos no miscibles (Ghosh, 2009).

Young fue el primero en intentar dar una explicación de tensión superficial en términos de fuerzas atractivas y repulsivas entre las moléculas que constituyen un líquido: la cohesión entre las moléculas de un líquido deben de superar su tendencia a separarse bajo la influencia del movimiento térmico.

Termodinámicamente se define a la tensión superficial (γ_0) como la fuerza ejercida por la superficie del líquido por unidad de longitud que tiende a disminuir o aumentar dicha superficie, y si se relaciona la entropía (S), la temperatura absoluta (T), presión (P),

volumen (V), área superficial (A), potencial químico (μ) y número de moléculas en el sistema (n), la ecuación resultante es la siguiente (Davies y Rideal, 1963):

$$dF = -SdT - PdV + \gamma_0 dA + \mu dn \quad (1)$$

Donde F representa, la energía libre total de Helmholtz; A temperatura constante y un volumen de un determinado número de moles; la ecuación 1 se reduce a (Davies y Rideal, 1963):

$$\gamma_0 = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{T,V,n} \quad (2)$$

Bajo estas condiciones, una contracción espontánea de la superficie ($-\partial A$) disminuirá F , proporcionando una tensión superficial positiva.

De acuerdo a Beverung y col. (1999), en adsorción de proteínas la tensión interfacial dinámica puede ser dividida en tres regímenes de tiempo; que son típicos para muchas proteínas. Estos regímenes se ilustran en la Figura 1.5.

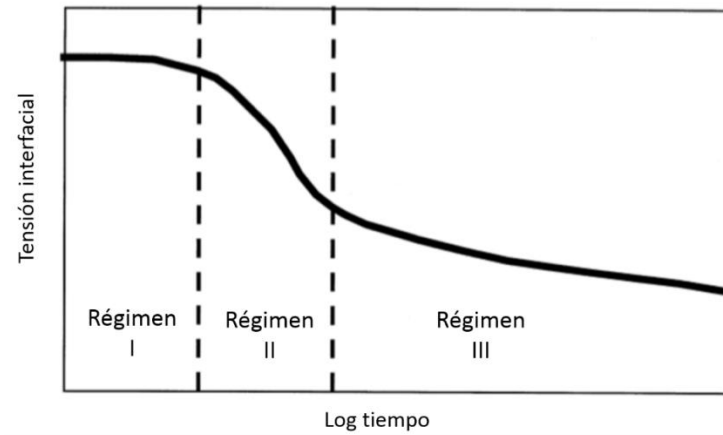


Figura 1. 5 Respuesta de tensión interfacial dinámica típica de proteína en disolución acuosa diluida de adsorción en interfase aceite-agua (Beverung y col., 1999).

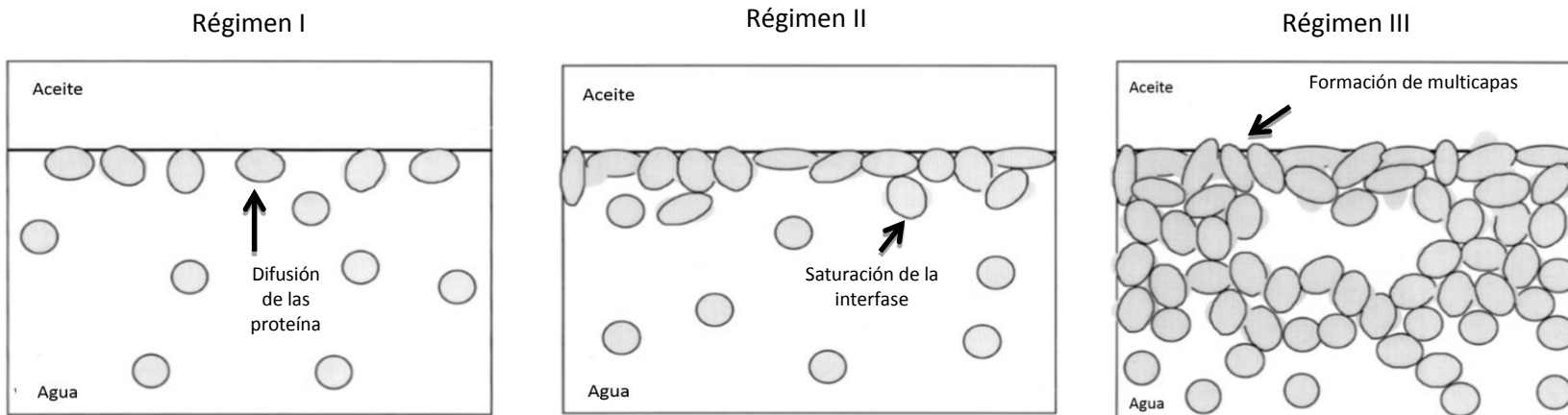


Figura 1. 6 Esquema de adsorción de proteína globular en la interfase aceite-agua en el Régimen I, II y III de la tensión interfacial dinámica (Beverung y col., 1999).

➤ Régimen I

El primer régimen se ha visto en los experimentos de tensión interfacial, es un tiempo de inducción, donde la tensión es la de la disolución pura. Este fenómeno ha sido frecuentemente observado en adsorción de disoluciones proteínicas de baja concentración en interfase aire/agua. Las concentraciones acuosas diluidas, se caracterizan por un pequeño número de moléculas en la interfase, la adsorción surge de la presencia de grupos hidrófobos de superficie, y se producen cambios conformacionales, la Figura 1.6 muestra un esquema de este régimen, donde el período de inducción se caracteriza por difusión de las proteínas a la interfase y la iniciación de los cambios conformacionales de las proteínas adsorbidas. Una vez que se alcanza una concentración crítica de cadenas laterales adsorbidas, el perfil dinámico de tensión se mueve al Régimen II.

➤ Régimen II

En el régimen II se observa una disminución de la tensión interfacial que continúa durante varios segundos; a medida que la interfase se vuelve más saturada con la proteína, se ven cambios tanto en la concentración de tensión superficial e interfacial. La Figura 1.6 muestra el régimen II, donde las proteínas adsorbidas de conformación rígida permiten que las nuevas cadenas laterales desde el interior de la proteína a adsorber aumenten el número de contacto entre la proteína y la fase acuosa. Este fenómeno puede ser el inicio de la adsorción irreversible para una molécula de proteína. La interfase se llena de moléculas de proteínas las cuales se relajan en estructuras menos compactas, causando una disminución de la tensión interfacial, y se origina la formación de multicapas.

Teniendo en cuenta la explicación del período de inducción en el Régimen I, uno puede sospechar que los cambios conformacionales y la desnaturalización de las proteínas adsorbidas son más importantes en la reducción de la tensión que la difusión inicial y adsorción. Si este es el caso, el Régimen II puede ser una indicación de la estabilidad conformacional de las proteínas adsorbidas, es decir, una medida de la cinética de desarrollo interfacial.

➤ Régimen III

El régimen III es una lenta disminución de la tensión atribuido a los cambios conformacionales de la capa adsorbida, que continúa a la formación de un gel (red), como se ilustra en la Figura 1.8, las moléculas adsorbidas en la capa inicial siguen cambiando su conformación en respuesta a entornos favorables para las cadenas laterales, tanto hidrofóbicas e hidrofílicas. Se producen la superposición lateral y el entrelazamiento de esta capa, ya que las moléculas buscan conformaciones energéticamente más favorables. Se construyen múltiples capas en la fase acuosa, como proteínas agregadas y de forma ramificada.

1.2.1.1 Concentración de adsorción crítica

En el momento en que una superficie fresca de una disolución se expone, no hay excedente de soluto adsorbido, y la tensión superficial es similar a la del agua pura. Sin embargo, moléculas de soluto se acumulan continuamente hacia la difusión en la superficie hasta que llegan al equilibrio, la relación de difusión a la superficie y de desorción son iguales (Davies y Rideal, 1963). Para definir la adsorción se puede encontrar la relación entre la concentración de un soluto (C) en el interior de la fase y su concentración o actividad en exceso en la superficie (Γ), en el caso más sencillo de dos componentes (Toral, 1973). Cuando se alcanza la concentración mayor de moléculas en la solución, se le denomina concentración de adsorción crítica como se muestra en la Figura 1.7.

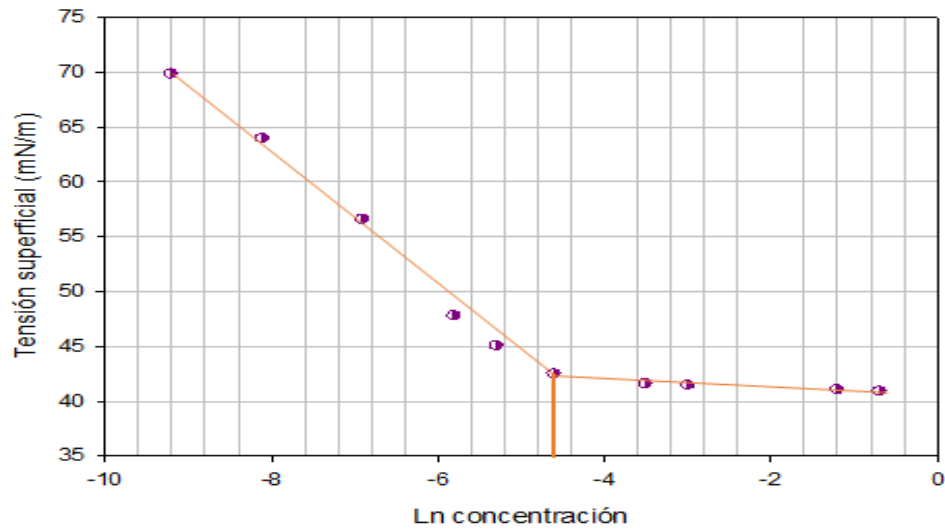


Figura 1. 7 Concentración de adsorción crítica.

1.2.1.2 Técnicas o métodos de evaluación de la tensión superficial

Existen diferentes métodos para evaluar la tensión superficial en la interfase aire/líquido o líquido/líquido, de acuerdo con Salager (2005) de los cuales se pueden clasificar en:

- ⊗ Métodos basados en la medición de una fuerza, de los cuales se puede mencionar el método del anillo y el método de la placa de Wilhelmy. El método de la placa, mide la fuerza hacia abajo que sobre una placa lisa ejerce la superficie o interfase a la cual se desea determinar la tensión, la medida de la fuerza, se hace uniendo la placa a una balanza sensible de torsión, con alguna clase de dispositivo de elevación bien para bajar o elevar la placa hacia la superficie del líquido. El método del anillo se basa en la colocación de un anillo sobre la superficie del líquido y se mide la fuerza requerida para separar el anillo de la superficie.
- ⊗ Métodos basados en la medición de la presión, entre los que tenemos el método de la elevación capilar y método de presión de burbuja. El método de la elevación capilar, el líquido asciende dentro de un tubo de pequeño diámetro

(capilar) hasta que la presión hidrostática debido a la columna de líquido se iguale a la tensión superficial relacionada al ángulo de contacto. Se puede deducir la tensión del valor de la altura alcanzada por el líquido en el capilar. En el método de presión máxima de burbuja, una pequeña burbuja de gas se inyecta por el extremo de un capilar sumergido en un líquido. Mientras la burbuja crece, la presión dentro de ella crece, pero el radio de curvatura disminuye. El valor de presión máxima se logra cuando la burbuja es una semiesfera siendo el radio de curvatura mínimo.

⊗ Métodos basados en las medidas geométricas o deformación de una interfase en un campo gravitacional, de los cuales podemos mencionar el método de la gota pendiente, este método se basa en determinar la tensión superficial de un líquido en forma de una gota colgante; la forma está dada por la ecuación de Gauss-Laplace, que representa una relación entre la curvatura de un menisco líquido y la tensión superficial γ , y está definida por la expresión:

$$\gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P_0 + \Delta \rho g z \quad (3)$$

Donde R_1 y R_2 es el radio de la curvatura, ΔP_0 es la diferencia de presión en un plano de referencia, $\Delta \rho$ es la diferencia de densidad, g es la aceleración de la gravedad, y z es la altura vertical de una medida de caída en un plano de referencia.

La forma que adopta la gota se debe al equilibrio hidrostático que se alcanza como consecuencia del balance entre la tensión interfacial que tiende a minimizar el área superficial de la gota, curvándola, y la gravedad que, por el contrario, tiende a deformarla (Vílchez, 2012).

Durante los procesos de medición para determinar la tensión superficial de los líquidos debe diferenciarse entre los procesos estáticos y procesos dinámicos (Neurtek, 2014). En los procesos estáticos, la superficie limítrofe permanece invariable durante el proceso de medida. Con los métodos de medición dinámicos se crea una nueva superficie o superficie limítrofe a la que se difunden las sustancias tensoactivas durante el proceso de medición. El valor de la tensión superficial depende de la

capacidad que tienen estas sustancias para difundirse a lo largo del tiempo. En caso de los agentes tensoactivos, por ejemplo, esto depende de su estructura química y concentración en el líquido. Como se muestra en el Cuadro 1.5, los métodos estáticos y dinámicos miden diferentes propiedades de los líquidos y/o sólidos.

Cuadro 1. 5. Propiedades cuantificables en los métodos estáticos y dinámicos.

Métodos estáticos	Métodos dinámicos
Tensión superficial e interfacial de líquidos	Tensión superficial e interfacial de líquidos
Energía superficial	Energía superficial
Contornos de gota	Índice de sedimentación
Propiedades de absorción	Energía libre de Gibbs de absorción
Propiedades de humectación	Concentración crítica de micelas
Propiedades de adhesión	
Contribuciones dispersivas y polares de líquidos	
Propiedades humectantes	
Propiedades termodinámicas de soluciones surfactantes	

(Neurtek, 2014).

1.2.2 Tamaño de partícula

El diámetro de partícula de la proteína disminuye y tiende hacia un límite inferior en tamaño a medida que la concentración de proteína se reduce. Esto sugiere que subpartículas pueden estar involucradas en la formación de las partículas de tamaño más grande. Por lo cual, es posible la formación de subpartículas a partir de un número limitado de moléculas de proteína a través de interacciones hidrófobas (y de enlaces de hidrógeno) en oposición a la repulsión de la carga electrostática. Estas subpartículas exhibirán una estructura cuaternaria compacta característica, pero

harán que se formen grandes agregados, más allá de un tamaño crítico o la concentración de proteína, por la asociación de subpartículas en grupos voluminosos y abiertos, permeables al disolvente. Estas partículas que se presentan las podrían presentar una estructura supramolecular compleja, la cual se ilustra en la Figura 1.8 (Boulet y col., 2000).

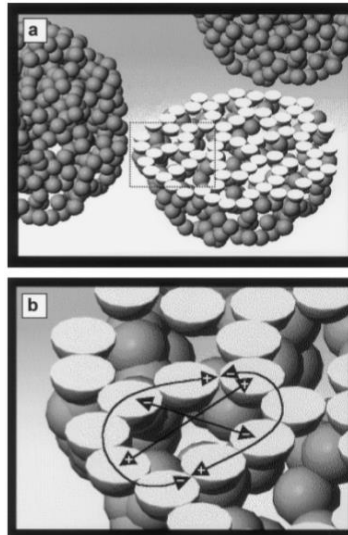


Figura 1. 8 Representación esquemática de la estructura supramolecular de grandes partículas de proteína con pequeñas esferas que representan subpartículas (a); ampliación de área cerrada que muestra las fuerzas de atracción y (b) de repulsión electrostáticas que estabilizan la estructura (Boulet y col., 2000).

Una dispersión coloidal tiene partículas mucho más grandes que las moléculas del medio de dispersión, pero son lo suficientemente pequeños para el movimiento browniano, de no ser abrumado por la fuerza de gravedad. La distribución y tamaño de las partículas coloidales son características importantes que rigen el comportamiento de suspensión, con las propiedades de flujo, velocidad de sedimentación, la agregación y la estabilidad. La difusión o movimiento browniano, es el movimiento de partículas en soluciones derivadas como una consecuencia de colisiones aleatorias con las moléculas del solvente. La propiedad que caracteriza el movimiento browniano es el coeficiente de difusión traslacional, sin embargo, el

coeficiente de difusión es representativo del movimiento traslacional, en lugar del movimiento lineal direccional (Malvern Instruments, 2004).

En la Figura 1.9, se muestra un ejemplo de la diferencia entre la difusión de partícula libre y la difusión de partícula restringida derivada de muestras con alta concentración. Cuando la difusión es restringida, la medida del coeficiente de difusión de traslación puede ser diferente para una medición bajo condiciones de difusión libre, principalmente en un tamaño de partícula aparente que difiere del tamaño de partícula físico.

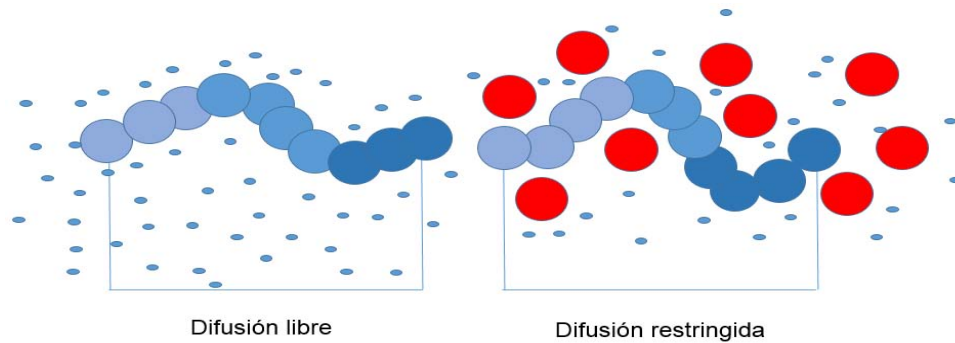


Figura 1. 9 Diferencia entre difusión libre y difusión de partícula restringida (Malvern Instruments, 2004).

En el caso de partículas muy pequeñas, el número de colisiones es tan pequeño que no pueden cancelarse en promedio. Este movimiento molecular de traslación es la causa del fenómeno de difusión. Si se observa el movimiento de una partícula y se registra su posición a intervalos de tiempo, se puede representar una proyección del movimiento browniano en una dirección.

La difusión se debe a la agitación térmica que comunica a cada partícula una energía cinética proporcional a kT . Este término puede considerarse como el producto de la distancia recorrida por una fuerza proporcional kT que actúa sobre la partícula (Toral, 1973).

➤ Ley de difusión de Einstein

En la teoría de Einstein en su forma simplificada permite ver la conexión del fenómeno microscópico (a escala molecular), movimiento browniano, y el fenómeno de difusión que observamos a escala macroscópica en presencia de un gradiente de concentración.

➤ Movimiento browniano rotatorio

Las moléculas o partículas en dispersión tienen un movimiento de rotación en torno a sus ejes que, si no hay fuerzas de alineamiento, están orientados al azar. Se pueden definir coeficientes de difusión rotatoria, que dependen del tamaño y la forma de las moléculas. Bajo la acción de una fuerza de orientación, ocurre alineamiento parcial de partículas asimétricas; este alineamiento representa un equilibrio entre las fuerzas que las alinea y su difusión rotatoria, por tanto, el sistema será anisotrópico (Toral, 1973).

1.2.2.1 Técnicas o métodos de evaluación del tamaño de partícula

Existen varios métodos para el análisis del tamaño de partículas, sin embargo, es importante tener en cuenta que a mayor tamaño y forma no esférica es posible que el diámetro de partícula se cuantifique de acuerdo al Cuadro 1.6:

Hay varios métodos indirectos para estimar el tamaño de partícula de dispersiones coloidales como se muestra a continuación:

Métodos ópticos

- ✓ Método de difracción de luz: Se basa en el patrón de difracción de Fraunhofer, este método puede ser aplicado a tamaños mayores a 1 μm .
- ✓ Método de dispersión de luz: Se aplica a tamaños de partícula $> 0.1 \mu\text{m}$.

Cuadro 1. 6 Diámetro de partícula, diámetro equivalente y tamaño geométrico.

Diámetro de partícula	Diámetro equivalente	Tamaño geométrico
Expresando el tamaño de partícula individual, se suele clasificar en términos de características geométricas de su forma y esfera equivalente hipotética con respecto a alguna propiedad.	Diámetro de área de proyección equivalente	Diámetro de Feret (diámetro unidireccional)
	Diámetro de área de superficie equivalente	Diámetro Martin (diámetro unidireccional)
	Diámetro de volumen equivalente	Diámetro Sieve
	Diámetro de Stokes	
	Diámetro aerodinámico	
	Diámetro de dispersión de luz equivalente	

(Linoya y col., 1991).

Métodos de sedimentación

Este método se basa en la determinación del tamaño de partícula por medio de la velocidad de sedimentación de las partículas en un campo gravitacional. La velocidad de sedimentación está dada por la siguiente ecuación:

$$v = \frac{(\rho_p - \rho_f)gD_p^2}{18\mu} \quad (4)$$

Donde ρ_p y ρ_f son las densidades de las partículas y el medio respectivamente, μ es la viscosidad del medio, D_p es el diámetro de partícula y g la aceleración de la gravedad (Ghosh, 2009).

Métodos de dispersión de luz

El comportamiento de dispersión de luz de una dispersión coloidal ofrece un número de oportunidades para determinar el tamaño de partículas coloidales.

Cuando se hace pasar un rayo de luz a través de una solución coloidal, puede absorberse parte de la luz (se absorbe luz de determinadas longitudes de onda), otra

parte se dispersa y el resto se transmite sin cambios a través de la muestra. Debido a la dispersión de la luz, la solución presenta un aspecto turbio, es a lo que se conoce como efecto Tyndall (Aulton, 2004).

Si el tamaño y forma de una partícula fuera del mismo tamaño, este sistema se le denomina monodisperso, si por el contrario no todas son del mismo tamaño se tiene un sistema polidisperso. En un sistema monodisperso, una dirección de observación dada corresponderá a una intensidad de luz dispersa que puede ser un máximo o un mínimo, pero que será igual para todas las partículas. Por ello, la solución en conjunto dará máximos o mínimos según el ángulo de observación. En cambio si el sistema es polidisperso, la luz dispersada para una dirección dada corresponderá a máximos para unas partículas y a mínimos para otras, lo que solo dará un cambio de intensidad, permaneciendo el color blanco para todos los ángulos de observación (Thompson A., 2009)

1.2.3 Propiedades de carga de partícula

La influencia de cargas eléctricas en superficies es muy importante en la fisicoquímica, por lo cual un grupo importante de fenómenos eléctricos referentes a la naturaleza de la distribución de iones en una solución rodea una superficie cargada. Para empezar, se debe considerar una superficie plana teniendo una densidad de carga uniforme positiva en contacto con una fase de solución que contiene iones positivos y negativos. El potencial eléctrico comienza en la superficie y disminuye a medida que se avanza en la solución en una manera que puede ser determinado (Adamson, 1997).

Cuando se aplican campos eléctricos o de cizallamiento a los sistemas de partículas cargadas, los fenómenos electrocinéticos surgen de una perturbación de la doble capa de equilibrio. Las fuerzas electrostáticas y brownianas intentan restablecer el equilibrio moviendo iones en relación con el líquido y disipando de esta manera la energía (Daubert y col., 2006). Por lo tanto, la doble capa es resultado de la carga espontánea de las superficies de las partículas en un medio líquido (por ejemplo,

debido a la adsorción o la disociación). Se construyen de cargas fijas en la superficie y en la capa de Stern y de iones móviles en la capa difusa (Figura 1.12). Las capas dobles de partículas vecinas interactúan entre sí debido a las fuerzas electrostáticas y osmóticas entre los iones y las superficies. La energía de interacción está determinada por la concentración de iones (o cargas móviles) dentro de la capa difusa y por el campo de potencial correspondiente. La relación entre estos parámetros pueden ser descritas por la ecuación de Poisson-Boltzmann, cuando se tiene en cuenta ningún efecto relacionado con el carácter discreto de carga y el volumen de iones (Schießl y col., 2012).

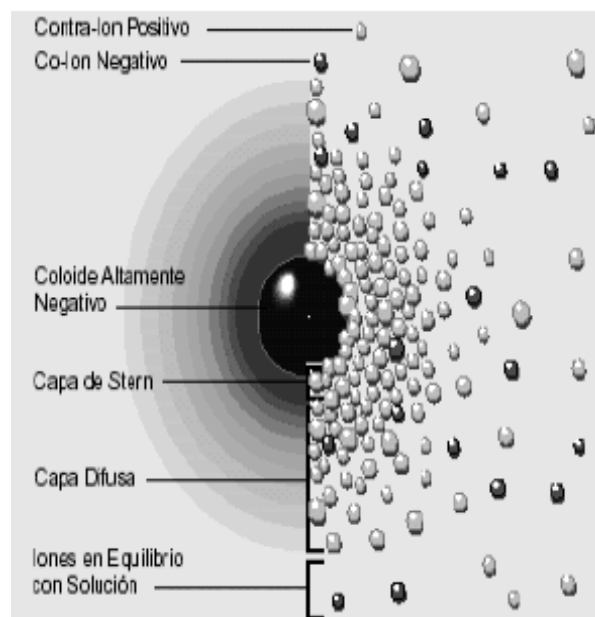


Figura 1. 10 Doble capa eléctrica (Mantilla C., 2008).

La interacción de las capas dobles se produce sólo cuando sus partes difusas se superponen, lo que se traduce en cambios de la concentración de iones y de la distribución potencial. Estas alteraciones en las capas difusas afectan a la disociación y el equilibrio de adsorción y por lo tanto la distribución de carga de superficie.

Un enfoque para el manejo de la capa doble es dividir la región cerca de la superficie en dos o más partes. Esto fue sugerido por primera vez por Stern, que designa una capa compacta de iones adsorbidos a diferencia de la capa difusa de Gouy (Adamson, 1997).

1.2.3.1 Técnicas o métodos de evaluación de potencial zeta

Potencial zeta

El potencial zeta expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las partículas y proporciona información esencial sobre las propiedades electroquímicas de la doble capa eléctrica (EDL) en la interfase entre dos fases, por ejemplo, de los fenómenos de sorción y las interacciones electrostáticas entre las partículas que controlan la agregación o floculación. La capa doble se divide en dos partes, la parte interna, que puede incluir iones adsorbidos, y la difusa, en la que los iones se distribuyen por efecto de las fuerzas eléctricas y el movimiento térmico aleatorio. Las dos partes de la doble capa están separadas por un plano (plano de Stern) aproximadamente a una distancia de un radio de ion hidratado de la superficie: de este modo, los contra-iones pueden mantenerse en la superficie gracias a la atracción electrostática. Además de los iones presentes en la capa de Stern, una determinada cantidad de disolvente se unirá a los iones y a la superficie cargada, esta capa solvatante conocida como superficie o plano de deslizamiento se mantiene junto a la superficie y el borde de la capa, representa el límite del movimiento relativo entre el sólido y el líquido. El potencial existente en el plano de deslizamiento recibe el nombre de potencial zeta o electrocinético (Aulton, 2004). El potencial zeta (ζ) no es estrictamente un potencial límite de fase, ya que se desarrolla totalmente dentro de la región del fluido. Se puede considerar como la diferencia de potencial en un medio uniforme prácticamente de lo contrario entre un punto a cierta distancia de la superficie y un punto en el plano de deslizamiento (Adamson, 1997).

El potencial zeta se utiliza como medida de la carga eléctrica de las proteínas y como un indicador relativo de la estabilidad coloidal de los sistemas de proteína. Si las

partículas en la mezcla tienen grandes valores de potencial zeta negativos o positivos que se repelen entre sí, entonces inhibe la agregación y mejora la estabilidad de los sistemas; si las partículas tienen valores absolutos bajos del potencial zeta, entonces se aglomeran y la dispersión se vuelve inestable.

Se define la estabilidad de las dispersiones con relación al potencial zeta de la siguiente manera.

Cuadro 1. 7. Valores de potencial zeta y estabilidad de dispersiones.

Valores del potencial zeta (mV)	Sistema
0 a \pm 3	Se presenta una máxima aglomeración y precipitación
+5 a -5	Fuerte aglomeración y precipitación
-10 a -15	Umbral de aglomeración
-16 a -30	Umbral de dispersión delicada
-31 a -40	Estabilidad moderada
-41 a -60	Estabilidad relativamente buena
-61 a -80	Muy buena estabilidad
-81 a -100	Estabilidad extremadamente buena

(Beliciu y Mororu, 2011).

1.3 Reología

La Reología es la ciencia de la deformación y el flujo de los materiales, que se relaciona con la manera en que éstos responden al esfuerzo o a la deformación aplicada. Su estudio es importante en diversas industrias.

En la industria alimentaria hay diversas áreas donde se necesitan datos reológicos como puede ser en (Steffe, 1996):

- ⊗ Cálculos de ingeniería de procesos que involucran una amplia gama de equipos, tales como tuberías, bombas, extrusoras, mezcladoras, revestidores, intercambiadores de calor, homogeneizadores, y viscosímetros en línea.
- ⊗ La determinación de la funcionalidad de ingredientes en el desarrollo de productos.
- ⊗ Control de calidad de los productos intermedios o finales.
- ⊗ Pruebas de vida útil.
- ⊗ Evaluación de la textura de los alimentos mediante la correlación de los datos sensoriales.
- ⊗ Análisis de ecuaciones reológicas.

Teniendo en cuenta la definición de reología es esencial definir el esfuerzo y la deformación, que a continuación se explicarán; considerando una barra rectangular que, debido a una fuerza de tensión, es ligeramente alargada (Figura 1.11). La longitud inicial de la barra es L_0 , la longitud alargada es L , y $L = L_0 + \delta L$ que representa el aumento de la longitud.

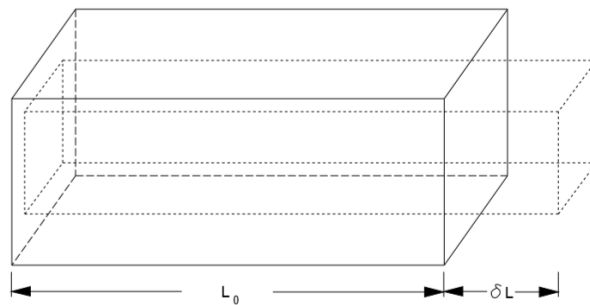


Figura 1. 11 Deformación lineal de una barra rectangular (adaptado de Steffe, 1996).

Por lo cual, la deformación puede definirse como el cambio en el tamaño o forma de un cuerpo debido a esfuerzos internos producidos por una o más fuerzas aplicadas sobre el mismo. Otro tipo de deformación, es la deformación bajo corte o cizalla, esto se puede ilustrar con una barra rectangular (Figura 1.12) de altura h , donde la

superficie inferior es fija y la placa superior se desplaza linealmente en proporción a δL , y el ángulo de cizallamiento puede ser calculado como:

$$\tan(\gamma) = \frac{\delta L}{h} \quad (5)$$

Y la velocidad de cizalla, está dada por el cambio de la deformación con respecto del tiempo, y tiene las unidades s^{-1} .

$$\dot{\gamma} = \frac{\gamma}{\text{tiempo } (\theta)} \quad (6)$$

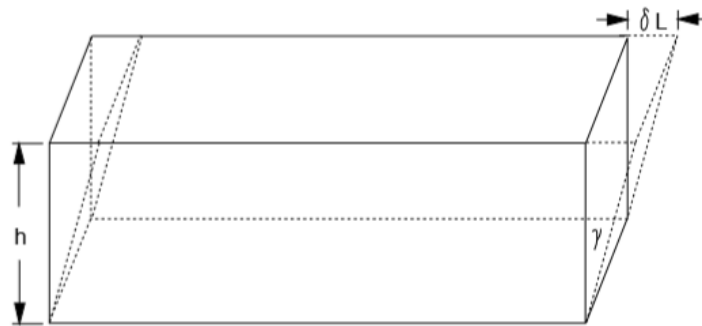


Figura 1. 12. Deformación bajo corte o cizalla de una barra rectangular (adaptado de Steffe, 1996).

Por otro lado, el esfuerzo ($-F/A$) es definido a partir de la deformación producida por acción de una fuerza sobre un material que depende de la magnitud de la fuerza por unidad de área y cuyas unidades son Nm^{-2} o Pa; el esfuerzo puede ser por tensión, compresión o cizallamiento. Para entender completamente el esfuerzo en un material, hay que considerar un pequeño elemento finito (Figura 1.13) que consta de nueve componentes en términos de coordenadas cartesianas (ζ_{ij}), donde el subíndice i , indica la orientación donde actúa la fuerza, y j la dirección de la misma.

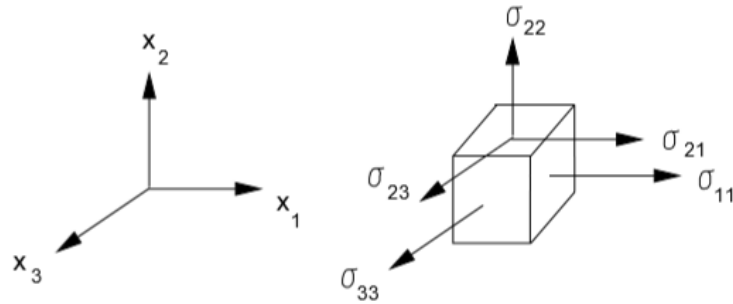


Figura 1. 13. Deformación típica de un elemento finito (Steffe, 1996).

Los esfuerzos normales se consideran positivos cuando actúan hacia afuera (esfuerzos de tensión) y negativos cuando actúan hacia el interior (esfuerzo de compresión). Los componentes del esfuerzo pueden ser resumidos como un tensor de esfuerzo escrito en la forma de una matriz:

$$\sigma_{ij} = \begin{bmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & \sigma_{13} \\ \sigma_{21} & \sigma_{22} & \sigma_{23} \\ \sigma_{31} & \sigma_{32} & \sigma_{33} \end{bmatrix} \quad (7)$$

Un fluido se define como una sustancia que se deforma continuamente bajo la acción de un esfuerzo de cizalla, por tanto, en ausencia de éste, no habrá deformación. La relación entre el esfuerzo de cizalla requerido para inducir una determinada velocidad de deformación de cizalla, caracteriza el comportamiento reológico de un fluido.

1.3.1 Clasificación reológica de los materiales

La clasificación de los fluidos es una forma valiosa para conceptualizar el comportamiento de los mismos, como se muestra en la Figura 1.14.

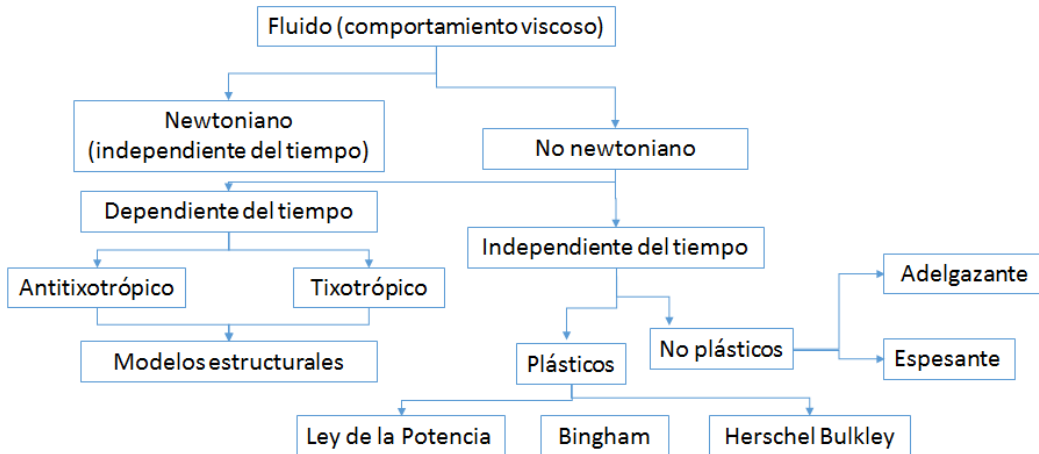


Figura 1. 14 Clasificación del comportamiento reológico (adaptado de Steffe, 1996).

Ley de Newton de la viscosidad

La resistencia derivada de la falta de deslizamiento de las partes de un líquido es proporcional a la velocidad con la cual se separan una de las otras dentro de él; esta necesidad de deslizamiento es lo que se denomina viscosidad, que es una medida de la resistencia a fluir. Según Newton, el esfuerzo de cizalla es proporcional a la velocidad de cizalla, y a esta ecuación se le denomina Ley de Newton

$$\dot{\gamma} = f(\sigma) \quad (8)$$

Existen tres tipos de fluidos: newtonianos, no newtonianos y viscoelásticos, sin embargo, sólo nos enfocaremos a los dos primeros tipos de fluidos.

Fluidos newtonianos

Los fluidos que obedecen a la Ley de Newton son nombrados como newtonianos. En los fluidos newtonianos existe una relación lineal entre el esfuerzo de cizalla y la velocidad de cizalla, esto significa que la viscosidad es constante e independiente de la velocidad de cizalla.

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad (9)$$

Fluidos no newtonianos

Los fluidos que no obedecen la Ley de Newton son denominados no newtonianos, donde la relación entre esfuerzo y velocidad de cizalla no es lineal. Estos fluidos a su vez se diferencian entre independientes y dependientes del tiempo.

a) Independientes del tiempo

Los fluidos independientes del tiempo dependen de un esfuerzo de cizalla inicial, incluyen los que conocemos como plásticos de Bingham, materiales que requieren de un mínimo esfuerzo para comenzar a fluir; fluidos fluidificantes a la cizalla, aquéllos en los que el esfuerzo de cizalla decrece con la velocidad de cizallamiento, usualmente descritos por expresiones de Ley de la Potencia; fluidos espesantes a la cizalla, en los cuales el esfuerzo de cizalla incrementa con la velocidad de cizalla (Hiemenz & Rajagopalan, 1997). Estos fluidos se representan en un reograma típico en la Figura 1.15, y de las cuales las ecuaciones que representan los modelos reológicos se presentan en el Cuadro 1.9 (Steffe, 1996)

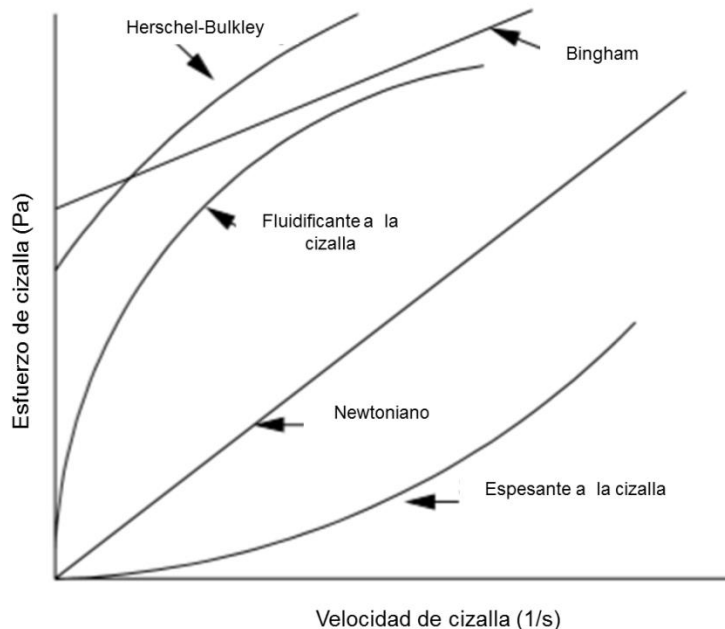


Figura 1. 15 Curvas de fluidos típicos, independientes del tiempo (adaptado de Steffe 1996).

Cuadro 1. 8 Ecuaciones de los modelos reológicos.

Modelo	Ecuación
Newtoniano	$\sigma = \eta \dot{\gamma}$
Plástico de Bingham	$\sigma = \sigma_0 + \eta \dot{\gamma}$
Ley de la potencia o de Ostwald de Waele	$\sigma = k \dot{\gamma}^n$
Herschel-Bulkley	$\sigma = \sigma_0 + k \dot{\gamma}^n$
Casson	$\sigma^{1/2} = \sigma_c^{1/2} + \eta_c^{1/2} \dot{\gamma}^{1/2}$

Adaptado de Tadros (2010).

b) Dependientes del tiempo

Idealmente, los materiales dependientes del tiempo son considerados por ser inelásticos, con una función de la viscosidad dependiente del tiempo, la respuesta de la sustancia al esfuerzo es instantánea debido a los cambios en la estructura del material en sí. Modelos tixotrópicos o reopéticos presentan respectivamente, la disminución o el aumento del esfuerzo de cizalla (y viscosidad aparente) con el tiempo a una tasa fija de cizalla (Steffe, 1996).

1.3.2 Propiedades reológicas de disoluciones

Viscosidad de dispersiones coloidales

La viscosidad de dispersiones coloidales es siempre mayor que la del disolvente o medio de dispersión puro. Este aumento de viscosidad es menos marcado en soluciones diluidas, en las cuales no son importantes sus interacciones y sus posibles colisiones. En 1906, Einstein estudió el caso extremo de una dispersión que contenía partículas esféricas del mismo tamaño. En este caso no había ni fuerzas estáticas entre las partículas ni interacciones dinámicas causadas por el movimiento de las partículas. Así, pues, el modelo de Einstein era una dispersión en que las partículas

distaban tanto unas de otras que podía considerarse que cada una de ellas se movía en un volumen infinitamente grande de líquido (Toral, 1973). La teoría de Einstein se basa en los siguientes supuestos:

- La densidad y la viscosidad del fluido se mantiene constante.
- La velocidad de flujo es bajo.
- Sin deslizamiento del líquido en la superficie de las esferas.
- Las esferas son lo suficientemente grandes en comparación con las moléculas del líquido de manera que se considera como el líquido continuo.

Para este modelo, Einstein obtuvo, la siguiente ecuación (Ghosh, 2009):

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = 2.5\phi \quad (10)$$

Que indica el aumento relativo de la viscosidad de la dispersión llamado viscosidad específica, donde η es la viscosidad de la dispersión, η_0 es la viscosidad del medio de dispersión y ϕ el volumen fraccionario de la fase dispersa.

La desviación de la ecuación de Einstein puede resultar de factores tales como el efecto electroviscoso, hidratación, floculación y adsorción de agua sobre la superficie de las partículas. Para dispersiones con fracciones de volumen alto de partículas, la ecuación de Einstein puede extenderse como (Ghosh, 2009):

$$\frac{\eta_0}{\eta} = 1 + 2.5\phi + k_1\phi^2 + \dots \quad (11)$$

Se han hecho varios intentos para extender la ecuación de Einstein para dispersiones concentradas, por lo que la ecuación puede ser escrita en términos de volumen molar del coloide como (Ghosh, 2009):

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_0}{\eta} - 1 = 2.5v_m c \quad (12)$$

Donde η_{sp} es la viscosidad específica, v_m es el volumen molar y c , es la concentración.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1 OBJETIVOS

Objetivo general: Evaluar las propiedades fisicoquímicas y reológicas de disoluciones acuosas de lactoferrina bovina mediante adsorción en interfase fluida, potencial z y comportamiento al flujo, identificando sus propiedades funcionales para la aplicación en sistemas alimenticios.

Objetivo particular 1: Establecer la cinética de adsorción en interfase fluida con diferentes concentraciones de lactoferrina en disolución acuosa mediante pruebas de tensión superficial dinámica determinando la concentración de adsorción crítica.

Objetivo particular 2: Determinar el efecto de diferentes concentraciones de lactoferrina en disoluciones acuosas mediante pruebas de tamaño de partícula, potencial zeta y pH para la caracterización fisicoquímica de las mismas.

Objetivo particular 3: Determinar el efecto de la concentración de lactoferrina sobre el comportamiento al flujo de sus disoluciones acuosas, mediante cizalla rotacional obteniendo sus parámetros reológicos.

2.2 Materiales

Para elaborar las disoluciones de lactoferrina se empleó:

Agua pura libre de sodio marca e pura.

Lactoferrina bovina de grado alimenticio de NutriScience Innovations.

2.3 Métodos

2.3.1 Preparación de las muestras

Las disoluciones de la lactoferrina bovina se prepararon en agua pura libre de sodio, dispersándola lentamente en una parrilla de agitación magnética (Cimarec modelo S131125), durante 1 hora para concentraciones del 5%, 8%, 10%, 13% y 15% (p/p), 35 minutos para las concentraciones de 0.1%, 0.3%, 0.5%, 1.0% y 2.0% (p/p) y un tiempo de agitación de 10 minutos para las concentraciones de 0.0001%, 0.0003%, 0.0005%, 0.001%, 0.003%, 0.005%, 0.01%, 0.03% y 0.05% (p/p), a una temperatura constante de 25 °C, todas las muestras se mantuvieron tapadas para evitar su contaminación con polvo u otros materiales, se dejaron reposar durante 24 horas en refrigeración y se atemperaron antes de su análisis. Las concentraciones de las diferentes disoluciones acuosas de lactoferrina fueron seleccionadas de acuerdo a la sensibilidad del instrumento utilizado para evaluar cada propiedad.

2.3.2 Determinación de propiedades fisicoquímicas

Determinación de la densidad

La determinación de la densidad de las disoluciones acuosas de lactoferrina a las diferentes concentraciones [0.0001, 0.0003, 0.001, 0.003, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.3, 0.5 %], se llevó a cabo en el densímetro digital Anton Paar DMA-38. Este instrumento cuenta con un tubo en forma de U que es excitado electrónicamente mediante una oscilación armónica. El periodo oscilante depende de la densidad de la muestra en el interior del tubo, por lo que la medida del periodo de oscilación, la densidad y densidad relativa son calculados automáticamente (www.antonpaar.com).

Se llenó el tubo con la disolución evitando la formación de burbujas. Las pruebas se efectuaron a una temperatura de 20 °C, y una densidad relativa del aire de 0.0016 g/cm³. Se obtuvo el valor de densidad relativa de la disolución, la cual fue multiplicada por la densidad del agua a 25 °C, para conseguir el valor de la densidad absoluta de la misma, por ello solo se determinó a las muestras utilizadas para medir tensión superficial. La determinación de la densidad se realizó por triplicado y se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

2.3.2.1 Tensión superficial dinámica

La evaluación de la tensión superficial dinámica de las disoluciones acuosas de lactoferrina a diferentes concentraciones [0.0001, 0.0003, 0.001, 0.003, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.3, 0.5 %], se realizó en el tensiómetro de gota colgante Sinterface Technologies PAT 1 (Alemania). En el cual la gota de las disoluciones acuosas de lactoferrina se formó en la punta de un capilar (2 mm). La forma que adopta la gota se debe al equilibrio hidrostático que se alcanza como consecuencia del balance entre la tensión interfacial que tiende a minimizar el área superficial de la gota, curvándola, y la gravedad que por el contrario, tiende a deformarla (Vílchez, 2012). La silueta de la gota se capturó y digitalizó con una cámara de CCD. Las imágenes digitalizadas de la gota se grabaron en función del tiempo y se ajustaron a la ecuación de Gauss-Laplace, para determinar adecuadamente la tensión interfacial (± 0.1 mN/m), empleando el software del instrumento.

Antes de realizar la medición se lavó el capilar del equipo con agua desionizada, posteriormente se evaluó la tensión superficial durante 100 s para verificar la limpieza, se lavó nuevamente con la disolución de lactoferrina y se colocó en el programa del equipo el valor de la densidad en g/cm^3 (evaluada anteriormente), el volumen de la gota fue de 10 μL y se monitoreo por un tiempo de 2 horas. La medición se efectuó a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 3$ y se realizaron por duplicado. Posteriormente se graficó los valores de tensión superficial en función del valor de la concentración y en el cambio de pendiente se obtuvo el valor de la concentración de adsorción crítica.

2.3.2.2 Tamaño de partícula y potencial zeta

La medición de tamaño de partícula y potencial z en disoluciones acuosas de lactoferrina, se efectuó empleando el equipo Zetasizer Nano ZS (Reino Unido); es un

equipo de alta sensibilidad que proporciona la capacidad de medir características de las partículas o moléculas en un medio líquido (Malvern Instruments, 2004).

El sistema de Zetasizer determina el tamaño de partícula midiendo el movimiento Browniano de las partículas en una muestra usando dispersión dinámica de luz y posteriormente interpretar un tamaño. El Potencial zeta se mide mediante la combinación de técnicas: microelectroforesis y velocimetría de láser Doppler o también llamado electroforesis de láser Doppler; este método mide la velocidad de una partícula que se mueve en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico (Malvern Instruments, 2004).

Se realizó un lavado de las celdas con agua desionizada y posteriormente con la disolución de lactoferrina, se colocó un volumen de muestra de 1 mL en la celda y fue introducido al equipo, se colocó en el programa la medición a realizar tamaño de partícula a las concentraciones [0.001, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05 y 0.1 %] o potencial zeta [0.0001, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1 %]. Las pruebas se realizaron a una temperatura de 25 °C. De los datos de potencial zeta se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación; y para la distribución de tamaño se graficó el tamaño de partícula en función de la intensidad (%).

2.3.2.3 Determinación de pH

La determinación del potencial de iones hidronio u oxhidrilo de las disoluciones acuosas de lactoferrina se llevaron a cabo con el potenciómetro Conductronic pH120, la temperatura de las muestras fue de 24.5- 25 °C. Debido a la pequeña masa del átomo de hidrógeno y a que su electrón se encuentra fuertemente atraído por el átomo de oxígeno, hay una tendencia del ion de hidrógeno a separarse del átomo de oxígeno al que se halla unido covalentemente y pasar al átomo de oxígeno de otras moléculas de agua adyacente a la que se encuentra unido por un enlace de hidrógeno:



Es decir, dos moléculas de agua reaccionan para originar un ion hidronio H_3O^+ y un ion hidroxilo OH^- . Por convención la ecuación anterior se puede escribir simbólicamente (Garrido y col., 2005):



En la determinación electroquímica del pH, se utiliza la diferencia de un potencial eléctrico entre dos soluciones de diferente pH, separadas por una membrana de un vidrio especial. Un sistema completo para la medición del pH está integrado por un electrodo de vidrio, un electrodo de referencia, un medidor de pH y una solución de muestreo.

La determinación del potencial de iones hidronio se realizó por triplicado, se obtuvieron los promedios, desviación estándar y coeficiente de variación.

2.3.3 Comportamiento reológico

Se evaluó el comportamiento al flujo de las disoluciones acuosas de lactoferrina a diferentes concentraciones [1, 5, 8, 10, 13 y 15 %], en el Reómetro Physica Anton Paar MCR 301 (Austria). Se transfiere la cantidad de movimiento desde el cono o placa que rota hacia la placa en la que está contenida la muestra. Se mide el par de torsión o el torque del motor, requerido para mover el cono o placa y se transforma a esfuerzo de cizalla por una constante específica para cada rotor. La velocidad de rotación se transforma en velocidad de cizalla con la constante de proporcionalidad respectiva, que también depende de las dimensiones del cono o placa que rota utilizados. La viscosidad, que es una medida de la resistencia a transferir cantidad de movimiento se calcula a través del cociente del esfuerzo de cizalla entre la velocidad de cizalla. Las curvas de flujo o de viscosidad, se elaboran trazando un gráfico del

esfuerzo de cizalla o de la viscosidad en función de la velocidad de cizalla (Martínez-Padilla, 2012).

Se utilizó una geometría de cono-placa, CP75-1, que tiene un diámetro de 74.974 mm, un ángulo 1° y un gap de $50 \mu\text{m}$. El volumen de la muestra fue de 2 ml, se realizaron 4 intervalos de ascenso-descenso, el ascenso fue de una velocidad de cizalla de 100 a 300 $1/\text{s}$ y el descenso de 300 a 100 $1/\text{s}$, con 30 puntos por intervalo con un tiempo por punto de 5 s, con la finalidad de establecer, la existencia de la dependencia del tiempo de las disoluciones.

Se realizaron 3 repeticiones de cada disolución acuosa de lactoferrina y se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los parámetros reológicos del modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Propiedades fisicoquímicas

La medición de la densidad relativa de las disoluciones de lactoferrina se realizó debido a que es un dato necesario para la determinación de la tensión superficial. En el Cuadro 3.1, se resumen los valores para cada una de las muestras realizadas y la densidad calculada a 25 °C considerando la densidad del agua de 997.1 kg/ m³. La diferencia entre la densidad relativa es de 0.0001 a partir de una concentración de 0.001% a 0.03% la densidad relativa de las disoluciones de lactoferrina aumentó conforme incrementó la concentración de la misma, debido al aumento en la cantidad de sólidos presentes en la disolución.

Cuadro 3. 1 Valores de densidad relativa y absoluta de las disoluciones de lactoferrina a 25 °C

Disoluciones de lactoferrina		
Concentración (%)	Densidad relativa	Densidad (kg/m ³) a 25 °C
0.0001	0.9999 ± 0	997.0
0.0003	0.9999 ± 1x10 ⁻³	997.0
0.001	1.0 ± 2x10 ⁻³	997.1
0.003	1.0001 ± 0	997.2
0.005	1.0001 ± 1x10 ⁻³	997.2
0.01	1.0002 ± 1x10 ⁻³	997.3
0.03	1.0001 ± 0	997.2
0.05	1.0003 ± 1x10 ⁻³	997.4
0.3	1.0009 ± 0	998.0
0.5	1.0014 ± 1x10 ⁻³	998.5

Tensión superficial dinámica

En la Figura 3.1 se presenta la tensión superficial en función del tiempo que describe el cambio en la adsorción descrito por la ausencia o presencia de los tres diferentes regímenes descritos en el Capítulo 1, el valor de tensión superficial disminuyó conforme avanzó el tiempo, en concentraciones de 0.0001 y 0.0003% de lactoferrina evidenciando sólo el Régimen I descrito por Beverung (1999), el cual se mantuvo durante 95 s aproximadamente, dicho régimen es un tiempo de inducción donde la tensión superficial es la de la disolución pura, con un valor de 69.88 mN/m y 63.99 mN/m respectivamente, se caracteriza por la difusión de la proteína a la interfase y la iniciación de los cambios conformacionales de la proteína adsorbida, es decir, la lactoferrina comienza a migar hacia la interfase y se inicia la formación de una monocapa que da lugar al Régimen II. En concentraciones de lactoferrina de 0.001, 0.003 y 0.005%, en la curva de adsorción se observan los regímenes I, II y III, descrito por Beverung (1999), el primero se mantuvo por 12 s, mientras que en el segundo, la tensión superficial continuó disminuyendo durante varios segundos a medida que la interfase se volvió más saturada con la lactoferrina y alrededor de los 1900 s, que es el comienzo del régimen III; hay un aumento en el contacto entre la proteína y la fase acuosa, debido a que se da la probable formación de estructuras menos compactas de lactoferrina y la formación de multicapas. En concentraciones de lactoferrina de 0.01, 0.03, 0.05, 0.3 y 0.5% (Figura 3.1b), no se presenta el régimen I debido a que el aumento en la concentración favorece la disminución rápida de la tensión superficial por el aumento de moléculas en el sistema; en el régimen II se dió una disminución de la tensión superficial a medida que la interfase se volvió más saturada, por lo cual se alcanzó el régimen III de la adsorción alrededor de los 800 s, donde la molécula de lactoferrina busca conformaciones energéticamente más estables; la disminución lenta en la tensión superficial de las disoluciones ocasionada por los cambios conformacionales de la capa adsorbida posiblemente por las interacciones hidrofóbicas como hidrofílicas de la estructura globular de la lactoferrina favoreció la saturación en la interfase de las disoluciones beneficiando la presencia de la proteína agregada en la fase acuosa, por lo que es posible llegar a la saturación de la interfase en las disoluciones de lactoferrina.

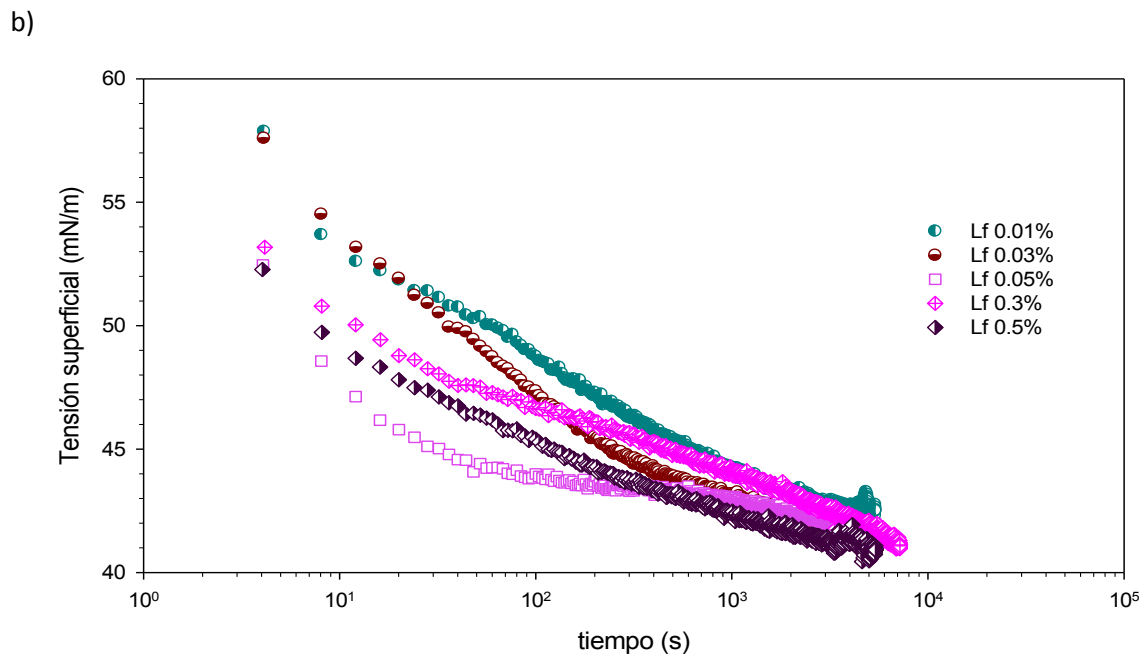
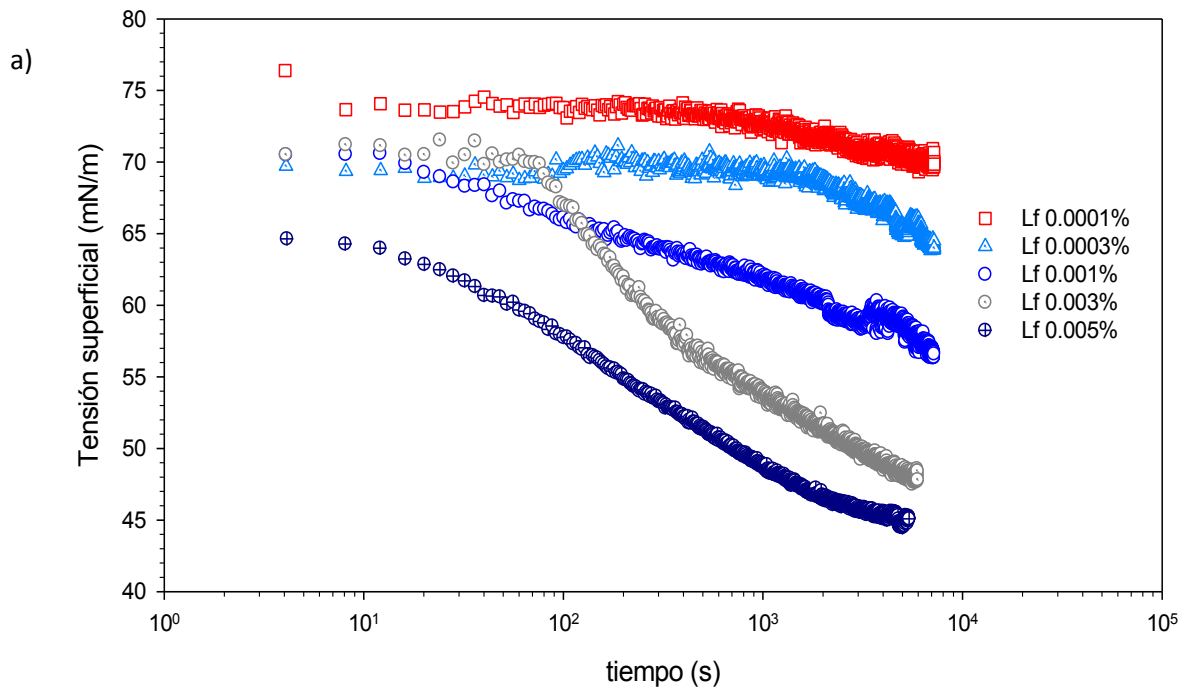


Figura 3. 1 Tensión superficial de disoluciones de lactoferrina en función del tiempo, a) concentraciones de 0.0001 % a 0.005 %, b) concentraciones de 0.01% a 0.5%

Los valores de tensión superficial al equilibrio obtenidos con el último valor medido de la cinética de adsorción se presentan en el Cuadro 3.2, el aumento en la cantidad de sólidos en las disoluciones se observó en el descenso de la tensión superficial de 69.88 mN/m en la concentración de 0.0001%, por lo que se disminuyó la tensión superficial en un 41.4 % a 40.92 mN/m que fue el valor para una concentración de 0.5%, en concentraciones en el intervalo de 0.0001% a 0.01% el descenso en la tensión superficial fue gradual mientras que en concentraciones de 0.03% a 0.5% disminuyó lentamente, lo que indica la saturación de la interfase con la proteína, la formación de monocapas y la presencia del régimen II y III en estas concentraciones. El descenso de la tensión superficial del medio con el incremento de la concentración lactoferrina en la disolución favorece la estabilidad del sistema por la formación de multicapas que permiten alcanzar el equilibrio.

Cuadro 3. 2 Valores de tensión superficial al equilibrio de disoluciones acuosas de lactoferrina.

Concentración (%)	Tensión superficial (mN/m)
0.0001	69.88
0.0003	63.99
0.001	56.61
0.003	47.82
0.005	45.09
0.01	42.52
0.03	41.63
0.05	41.48
0.3	41.08
0.5	40.92

La estructura de una proteína es dinámica, y el equilibrio entre las fuerzas estabilizantes de la estructura tridimensional puede cambiar a partir de modificaciones en las condiciones ambientales tales como temperatura, calidad del solvente, pH y condiciones de procesamiento. El potencial de una proteína para modificar su conformación determina sus propiedades funcionales. Durante el procesamiento o debido a cambios en las condiciones del medio acuoso, una proteína puede cambiar su conformación. Como consecuencia de estos cambios, las fuerzas que la estabilizan pueden debilitarse, permitiendo el desplegamiento o la desnaturalización proteínica y exponiendo aminoácidos activos antes ocultos en el interior de la estructura de la misma. Así, estos aminoácidos pueden interactuar con otros segmentos de la misma molécula o bien con segmentos presentes en otras macromoléculas vecinas (Perez, 2011).

De acuerdo con Toral (1973), cuando se alcanza la concentración mayor de iones individuales en la disolución, se le denomina concentración de adsorción crítica, debido a la acumulación de soluto en la superficie que llega al equilibrio. Para obtener el valor de la concentración crítica de adsorción de lactoferrina, se utilizaron los valores de tensión superficial al equilibrio en función del logaritmo natural de la concentración como se muestra en la Figura 3.2, se determinó que a una concentración de 0.01% de lactoferrina en disolución, se dió la concentración crítica de adsorción, en la cual se encuentra la interfase saturada con la proteína, y posiblemente a partir de ésta concentración podrían presentarse las propiedades funcionales (estabilizante en emulsiones y espumas) de la lactoferrina.

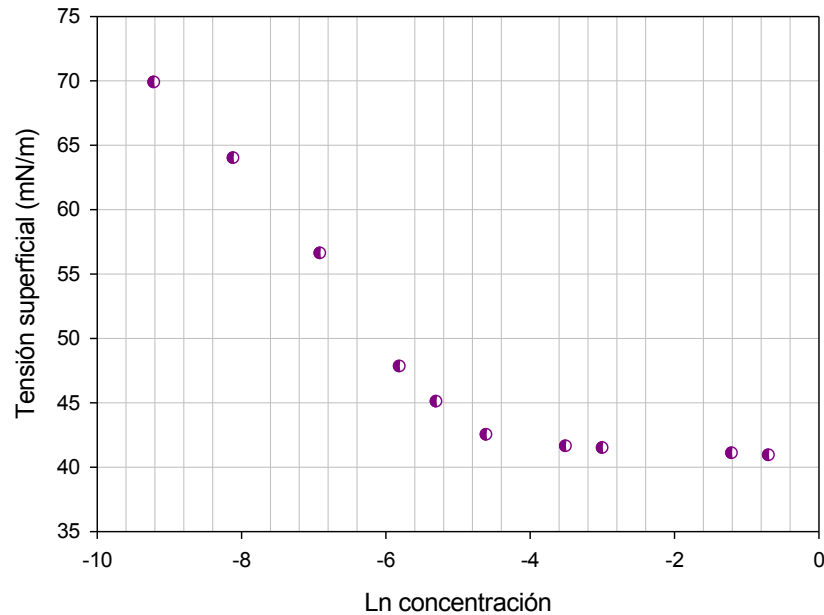


Figura 3. 2 Tensión superficial en función del logaritmo natural de la concentración de adsorción crítica de disoluciones acuosas de lactoferrina.

Tamaño de partícula

En las concentraciones de lactoferrina estudiadas (0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%), se presentó una distribución de tamaño polidispersa como se muestra en la Figura 3.3, esto podría ser por la diferente forma y tamaño de partícula, lo que provoca que la luz dispersada tome diferentes valores en la medición, por lo que a una concentración menor de 0.005%, se dió la formación de diferentes grupos de tamaños de partículas.

En concentraciones diluidas, las interacciones entre partículas son mínimas, sin embargo, a altas concentraciones las interacciones pueden influir en el tamaño de partícula o en la difusión de las mismas (Boulet y col., 2000). El tamaño de partícula de las disoluciones de lactoferrina se vio afectado por las interacciones entre proteína-proteína o proteína y el medio acuoso, ya que se obtuvo un tamaño de partícula más

alto de la campana para una concentración de 0.001% de 142.3 nm (Cuadro 3.3) que descendió conforme aumentó la concentración de 0.05% con un tamaño de partícula de 74.7 nm, sin embargo, se dió la formación de agregados de tamaños superiores a los 2780 nm, lo cual indica que se favorece la formación de enlaces hidrógeno o interacciones entre las mismas proteínas, ya que al ser una proteína globular con dos lóbulos de unión a Fe^{3+} , y anfifílica puede tener enlaces tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, que dependen de su estructura y los componentes que tiene, es decir, el tipo de aminoácidos que se encuentran presentes.

Debido a la estructura compleja de la lactoferrina, hay una posible formación de subpartículas complejas que interactúan con la parte tanto hidrofílica como hidrofóbica de la proteína, dando una compactación, o en otro caso el desplegamiento de la misma (Boulet y col., 2000).

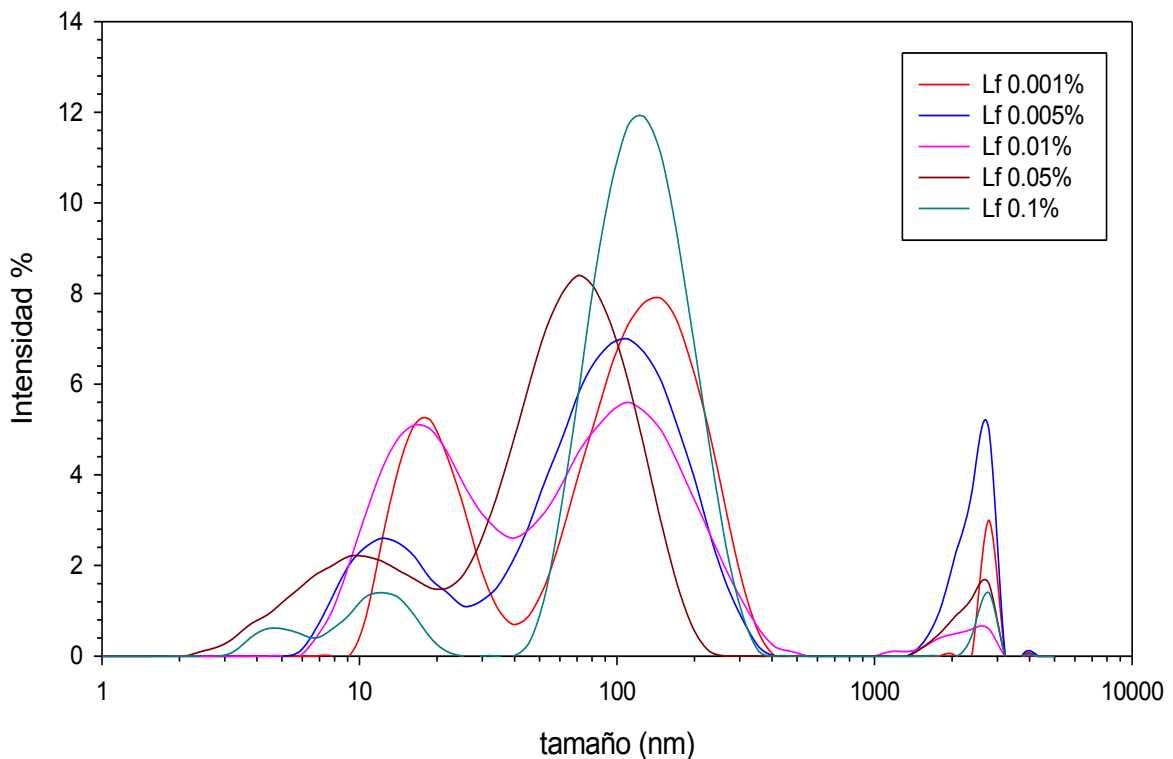


Figura 3. 3. Distribución de tamaño de partícula a diferentes concentraciones de lactoferrina.

Cuadro 3. 3 Distribución de tamaño de disoluciones acuosas de lactoferrina.

Concentración disolución de lactoferrina (%)	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
	nm	nm	nm	nm
0.001	-	19.96	142.3	2770
	-	18.68	119.0	2350
0.005	-	14.61	135.1	2459
	-	14.08	112.6	2428
0.01	-	19.91	124.0	2152
	-	19.34	124.7	-
0.05	-	7.79	74.34	2241
	-	9.92	74.70	2369
0.1	5.724	16.82	133.3	-
	5.061	12.06	133.0	2780

El diámetro de partícula de proteína (pico 3) disminuyó a medida que la concentración de proteína se aumentó, sin embargo a una concentración de 0.1% de lactoferrina, se dio nuevamente un aumento en el tamaño de partícula, lo que sugiere una desestabilización del sistema, y que subpartículas pueden estar involucradas en la formación de partículas de tamaño más grande (Boulet y col., 2000). En estudios realizados por McCarthy y col., (2013), el tamaño de partícula de disoluciones de lactoferrina fue de 23 a 27 nm, lo que podría indicar que con el aumento de la concentración las interacciones entre partícula de la misma proteína favoreció la formación de subpartículas de mayor tamaño.

Por lo cual, a concentraciones de 0.05%, fue posible la formación de subpartículas a partir de un número limitado de moléculas de proteína a través de interacciones hidrófobas (y de enlaces de hidrógeno) en oposición a la repulsión de la carga electrostática. Estas subpartículas exhibirán una estructura cuaternaria compacta

característica, pero harán que se formen grandes agregados, más allá de un tamaño crítico o la concentración de proteína, por la asociación de subpartículas en grupos voluminosos y abiertos, permeables al disolvente. Estas partículas podrían tener una estructura supramolecular compleja (Boulet y col., 2000).

Determinación de pH

Es importante considerar el valor de pH de las disoluciones, ya que un cambio en el valor de este, afecta el valor de potencial zeta, aumentando o disminuyendo su carga neta positiva o negativa, y éste a su vez modifica la cinética de adsorción de la proteína en tensión superficial (Beverung y col., 1999). Los valores de pH de las disoluciones acuosas de lactoferrina (Cuadro 3.4) dependen de la concentración, por lo que en concentraciones de 0.0001 a 0.1%, el pH se encontró en un intervalo de 5.71 a 6.32. A estas condiciones los grupos carboxilos y amino se encuentran en su forma iónica. Donde la estructura de la lactoferrina se encuentra en su forma lineal, favoreciendo las interacciones electrostáticas y exponiendo sus grupos hidrófobos que permite que la proteína se adsorba de manera más fácilmente en la interfase aire-agua (Jara, 2013).

Cuadro 3. 4 pH de disoluciones de lactoferrina.

Disoluciones de lactoferrina	
Concentración (%)	pH
0.0001	6.32 ± 0.02
0.0003	5.91 ± 0.01
0.0005	5.72 ± 0.02
0.001	6.17 ± 0.02
0.003	5.87 ± 0.01
0.005	5.60 ± 0.01
0.01	5.77 ± 0.02
0.03	5.71 ± 0.01
0.05	5.71 ± 0.02
0.1	5.89 ± 0.01

Potencial zeta

El potencial zeta de las disoluciones acuosas de lactoferrina a partir de la concentración de 0.005% a 0.1%, mantiene una carga neta positiva como se muestra en el Cuadro 3.5 donde se puede apreciar que, al aumentar la concentración de lactoferrina en la disolución, la carga neta positiva aumentó con respecto al valor de potencial zeta inicial del agua e-pura (-17.15 mV), no encontrando una tendencia definida con la concentración. El incremento del valor del potencial zeta se debe al despliegue de la estructura de la lactoferrina bovina y a la exposición de los aminoácidos favoreciendo las interacciones hidrofóbicas de la misma (Adamson, 1997; Sreedhara y col., 2010). Por los valores del potencial zeta (-8.68 a 5.94 mV) y de acuerdo a la clasificación de estabilidad de Belicui y col. (2011) las disoluciones se encuentran dentro de la categoría de máxima y fuerte aglomeración y precipitación de las proteínas. Asimismo, la disolución al 0.05% es el sistema más estable por que tiene el valor más grande del potencial zeta de las concentraciones estudiadas (Adamson, 1997).

Cuadro 3. 5 Potencial zeta de disoluciones acuosas de lactoferrina.

Concentración (%)	Potencial zeta (mV)
0.0001	-8.68
0.001	-5.26
0.005	4.51 ± 0.37
0.01	3.28
0.05	6.55 ± 0.17
0.1	5.94 ± 0.08

3.2 Comportamiento reológico

En la Figura 3.4 se presentan las curvas de flujo en ascenso de las disoluciones de lactoferrina al 1, 5, 8, 10, 13 y 15%. Se observa que las disoluciones presentan un comportamiento newtoniano, donde la relación entre el esfuerzo de cizalla y la velocidad de cizalla es lineal; la viscosidad es constante con la velocidad de cizalla e incrementa con el aumento de la concentración como se muestra en la Figura 3.5.

El valor de la viscosidad y del coeficiente de determinación (r^2) se presentan en el Cuadro 3.6, a concentraciones por debajo del 1% la viscosidad se mantuvo constante en un valor aproximado de 1.1 mPa·s. cercana a la del agua (1 mPa·s). Con el incremento de la concentración se aumentó el valor de la viscosidad en un 80% de la concentración de 0.1% al 15% (5.1 mPa·s). El incremento de la viscosidad con la concentración posiblemente sea por la formación de micelas originadas por la exposición de las regiones hidrofóbicas de la macromolécula (Sreedhara y col., 2010) favoreciendo de esta manera un sistema más complejo.

En la Figura 3.6 se presenta, la viscosidad en función de la concentración de disoluciones de lactoferrina, obsérvese que al incrementar la concentración de lactoferrina el valor de la viscosidad aumentó gradualmente. Este aumento de viscosidad fue menos marcado en disoluciones diluidas como el caso de 0.1 a 1% de lactoferrina, en las cuales no desempeñan papel importante las interacciones y posibles colisiones entre proteínas (Toral, 1973). De acuerdo con los estudios de Constenla y col. (1980), este comportamiento se debe a que la viscosidad de la solución es una función de las fuerzas intermoleculares, y a la interacción soluto-agua que restringe el movimiento molecular. Estas fuerzas dependen del espacio intermolecular y a la fuerza de los enlaces de hidrógeno, ya que se ven afectados por cambios en la concentración. Cuando más solutos se disuelven en la solución la viscosidad aumenta debido al incremento en los enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo y la distorsión en el patrón de velocidad del líquido por las moléculas hidratadas de soluto.

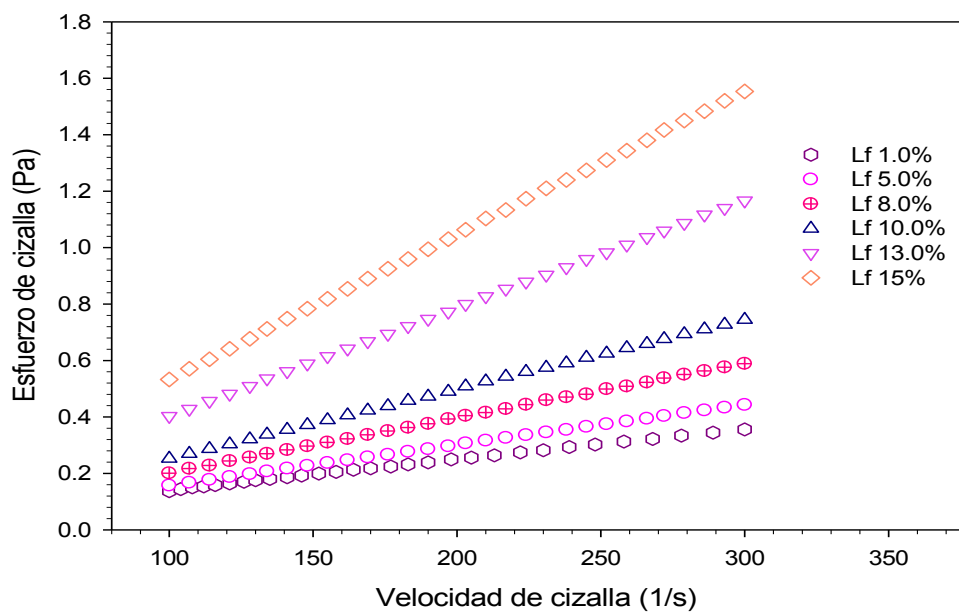


Figura 3. 4 Curva de comportamiento al flujo de disoluciones acuosas de lactoferrina a diferentes concentraciones.

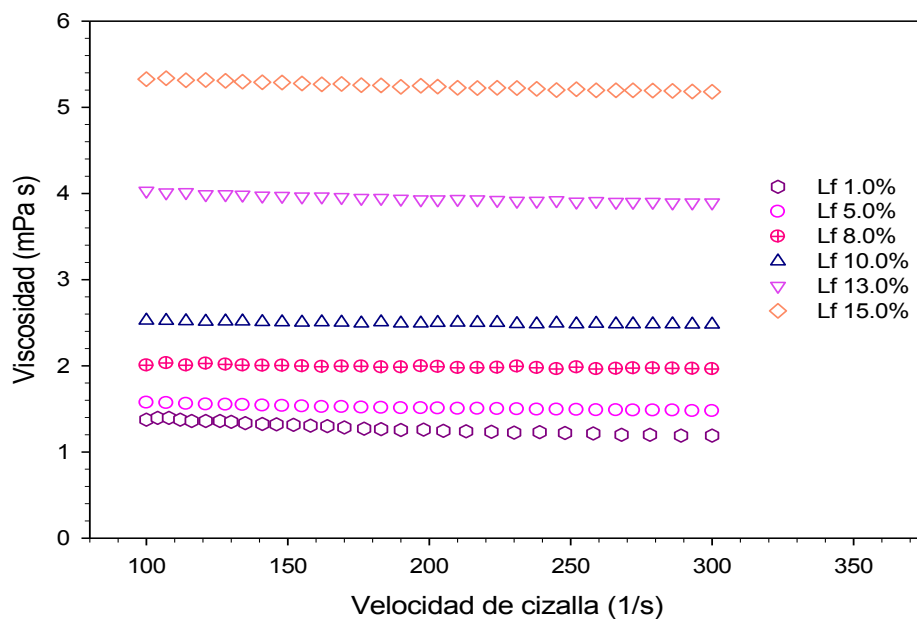


Figura 3. 5 Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de disoluciones acuosas de lactoferrina a diferentes concentraciones.

Cuadro 3. 6 Viscosidad de disoluciones acuosas de lactoferrina a 25 °C

Concentración (%)	Viscosidad (mPa·s)	Desviación estándar	R ²
0.05	1.10	0	0.9989
0.1	1.00	0	0.9991
1	1.10	$\pm 2.1 \times 10^{-4}$	0.9993
5	1.40	0	0.9996
8	1.93	$\pm 5.8 \times 10^{-5}$	0.9997
10	2.47	$\pm 5.8 \times 10^{-5}$	0.9998
13	3.83	$\pm 1.2 \times 10^{-4}$	0.9999
15	5.10	0	0.9999

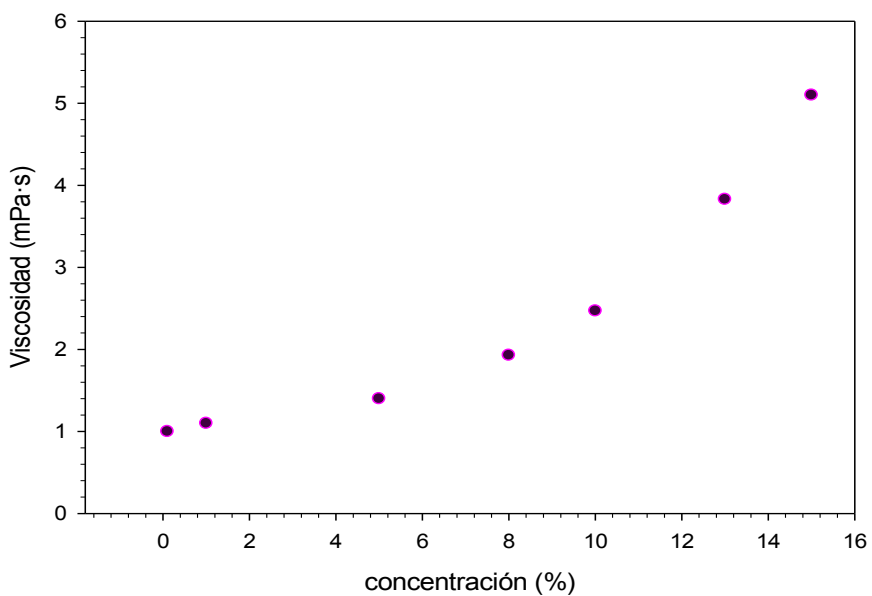


Figura 3. 6 Viscosidad en función de la concentración de disoluciones de lactoferrina.

CONCLUSIONES

- De acuerdo con los datos obtenidos en tensión superficial el valor de la concentración crítica de adsorción fue a una concentración de 0.01 %, en el cual la interfase llega a la saturación y la tasa de difusión y la desorción son iguales. En esta concentración el tamaño de partícula fue de 124 nm con una distribución polidispersa.
- El tamaño de partícula de las disoluciones de lactoferrina, incrementó con la concentración, y se dio la formación de grupos de subpartículas de mayor tamaño superando los 2770 nm y grupos de partículas de menor tamaño de 6 a 20 nm.
- El pH de las disoluciones en sus diferentes concentraciones fue de 5.7 a 6.32, a concentraciones de 0.0001 a 2%.
- El valor del potencial zeta de las disoluciones se determinó en un intervalo de valores -8 a 6.5 mV en concentraciones de 0.0001 a 0.1 %, que indican un sistema extremadamente aglomerado y con presencia de precipitación o en el umbral de precipitación.
- El modelo que mejor ajustó a los datos experimentales de las disoluciones de lactoferrina es el fluido newtoniano donde los valores de la viscosidad incrementan con el aumento de la concentración de lactoferrina.

Los estudios realizados en este proyecto, podrían ser un indicativo de las propiedades funcionales de la lactoferrina, además de que a una concentración de 0.01 % se dio la concentración crítica de adsorción que favorece al desarrollo de las mismas; la estructura de la lactoferrina por ser una proteína anfifílica generara enlaces tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, que es una característica que podría ayudar a la estabilización de sistemas como emulsiones o espumas. El aumento de la concentración de lactoferrina influye en el cambio en tamaño de partícula asociado con la formación de micelas originadas por la exposición de las regiones hidrofóbicas de la macromolécula que es una característica importante en algunos sistemas alimenticios, además que la proteína podrá mantenerse estable al interactuar con otras moléculas, modificando el potencial zeta de ésta y pasar de un sistema extremadamente aglomerado o en precipitación a un sistema estable.

j BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, A. (1997). *Physical chemistry of surfaces* (6ta ed.). Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Aulton, E. (2004). *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas* (2da. ed.). España: Elsevier Science.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.
- Baynes, J., & Dominiczak, M. (2008). *Bioquímica Médica*. España: Elsevier.
- Beliciu, C., & Mororu, C. (2011). The effect of protein concentration and heat treatment temperature on micellar casein-soy protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, *25*, 1448-1460.
- Beverung, C., Radke, C., & Blanch, H. (1999). Protein adsorption at the oil-water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry*, *81*, 59-80.
- Bokkhim, H., Bansal, N., Grøndahl, L., & Bhandari, B. (2013). Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. *Food Chemistry*, *141*, 3007–3013.
- Boulet, M., Britten, M., & Lamarche, F. (2000). Aggregation of some food proteins in aqueous dispersions: effects of concentration, pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, *14*, 135-144.
- Cheftel, J., Cuq, J., & Lorient, D. (1985). *Protéines alimentaires. Biochimie- Propriétés fonctionnelles valeur nutritionnelle. Modifications Chimiques*. París: Technique et Documentation-Lavoisier.
- Claire, L. (1 de Marzo de 2013). *FDA*. Obtenido de http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/GRN000464.pdf
- Conesa, C., Calvo, M., & Sánchez, L. (2010). Recombinant human lactoferrin: A valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. *Biotechnology Advances*, *28*, 831-838.
- Constela, D., Lozano, J., & Crapiste, G. (1980). Thermophysical properties of clarified apple juice as a function of concentration and temperature. *Journal Food Science*, *54*, 663-668.

- Cuéllar, F., & Falabella, F. (2004). *Fundamentos de Medicina: Hematología* (6a. ed.). Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Daubert, C., Hudson, H., Foegeding, E., & Prabhasankar, P. (2006). Rheological characterization and electrokinetic phenomena of charged whey protein dispersions of defined sizes. *LWT*, 39, 206-215.
- Davies, J., & Rideal, E. (1963). *Interfacial phenomena* (2a ed.). E.U.A: Academic press.
- Drago, M. E. (2007). Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas.*, 38, 30-38.
- Farnaud, S., & Evans, R. (2003). Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40, 395-405.
- Garrido, A. P., Villaverde, G. C., Blanco, G. M., Teijón, R. J., Mendoza, O. C., & Ramirez, R. (2005). *Fundamentos de bioquímica estructural*. México, D.F.: Alfaomega.
- Ghosh, P. (2009). *Colloid an interface science*. New Dheli: PHI Learning Private Limited.
- Hiemenz, P., & Rajagopalan, R. (1997). *Principles of colloid and surface chemistry* (3ra. ed.). E.U.A., Florida: Taylor and Francis Group.
- Jara, F. C. (2013). Competitive adsorption behavior of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovin serum albumin in presence of hydroxypropylmethylcellulose. Influence of pH. *Food Hydrocolloids*, 35, 189-197.
- Linoya, K., Gotoh, K., & Higashitani, K. (1991). *Powder technology handbook*. New York: Marcel Dekker.
- Livney, Y. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 73-83.
- Lonnerdal, B. (2013). Bioactive proteins in breast milk. *Journal of Pediatrics and Child Health*, 49, 1-7.
- Malvern Instruments, L. (1 de Febreo de 2004). Zetasizer Nano Series User Manual. Inglaterra, Worcester, Reino Unido.
- Mantilla C., P. J. (2008). Utilizacion de estudios de potencial zeta en el desarrollo de un proceso alternativo de flotación de mineral feldespático. *DYNA*, 75(154), 1-8.
- Martinez, L. P. (2012). *Guía rápida del uso del Reómetro MCR 301*. Mexico: LAPRYFAL.
- McCarthy, N. A., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A., & Fenelon, M. A. (2013). Sensitivity of emulsions stabilised by bovine b-casein and lactoferrin. *Food Hydrocolloids*, 35, 1-9.
- McSweeney, P., & Fox, P. (2003). *Advanced dairy chemistry. Proteins* (3a. ed., Vol. A). New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers.

- Mine, Y., Li-Chan, E., & Jiang, B. (2010). *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Estados Unidos: WILEY-BLACKWELL.
- Mohamed, S., Fahmy, A., Mohamed, T., & Hamdy, S. (2005). Proteases in egg, miracidium and adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of serine and cysteine proteases from adult. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142, 192-200.
- Nandi, S., Suzuki, Y., Huang, J., Yalda, D., Pham, P., Wu, L., Bartley, G., Huang, N. (2002). Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science*, 162, 713-722.
- Parlamento Europeo y del Consejo . (22 de Noviembre de 2012). DECISIÓN DE EJECUCIÓN DE LA COMISIÓN por la que se autoriza la introducción en el mercado de la lactoferrina bovina como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) nº258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo (Morinaga). *Diario Oficial de la Union Europea*, pág. 46.
- Perez, A. (2011). *Espumado de proteínas de suero lacteo en presencia de polisacaridos* . Argentina: Universidad Nacional del Litoral
- Salager, R. (2005). *Tensión Interfacial*. Venezuela: Laboratoria FIRP Escuela de Ingeniería Química. Universidad de los Andes.
- Steffe, J. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (2a ed.). Michigan, E.U.A: Freeman Press.
- Schießl, K., Babick, F., & Stintz, M. (2012). Calculation of double layer interaction between colloidal aggregates. *Advanced Powder Technology*, 139-147.
- Sreedhara, A. R. (2010). A comparison of effects of pH on the thermal stability and conformation of caprine and bovine lactoferrin. *International Dairy Journal*, 20, 487-494.
- Tadros, T. (2010). *Rheology of dispersions* . Wheenheim, Alemania: Wiley-VCH.
- Thompson, A., Boland, M., & Singh, H. (2009). *Milk proteins: from expression to food*. E.U.A.: Academic Press.
- Tokle, T., & McClements, D. (2011). Physicochemical properties of lactoferrin stabilized oil-in-water emulsions: Effects of pH, salt and heating. *Food Hydrocolloids*, 25, 976-982.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T., & Iwatsuki, K. (2009). Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *BIOCHIMIE*, 91, 52-57.

Toral, M. (1973). *Fisicoquímica de superficies y sistemas dispersos*. España: Ediciones Urmo.

Vílchez, M. T. (2012). *Patente nº WO2012080536 A1*. España.

Wada, Y., & Lönnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins: mechanisms of action. *Journal Nutritional Biochemistry*, XX, 1-12.

Medios electrónicos

iesmat. (10 de Septiembre de 2014). Proteínas, caracterización de proteínas. México, Mexico, México.

Neurtek. (12 de Agosto de 2014). Tensión superficial, tensión interfacial, energía superficial. México, México, México.

Serrano G., P. (6 de Septiembre de 2014). *Javerina.edu*. Recuperado el 15 de Abril de 2015, de *Javerina.edu*: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/perinatal/anemiasnutricionalesed.html>