

Efecto de las Microondas Sobre la Lactoferrina en Fórmulas Infantiles

Indira Franco

Facultad de Ciencias y Tecnología.
Universidad Tecnológica de Panamá
indira.franco@utp.ac.pa

Eduardo Castillo

Departamento de Tecnología de Alimentos.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza
eduo77@hotmail.com

María Dolores Pérez

Departamento de Tecnología de Alimentos.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza
dperez@unizar.es

Miguel Calvo

Departamento de Tecnología de Alimentos.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza
calvoreb@unizar.es

Lourdes Sánchez

Departamento de Tecnología de Alimentos.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza
lousanchez@unizar.es

Resumen-La lactoferrina es una proteína presente en la leche, a la cual se le confieren importantes propiedades como lo son participar en el transporte de hierro, actividades inmunológicas y antimicrobianas. El creciente interés comercial por utilizar las propiedades benéficas de la lactoferrina en diferentes tipos de alimentos, entre ellos las leches infantiles, crea la necesidad de contar con pruebas analíticas para determinar la concentración de la misma. Es importante que estas pruebas sean acordes para detectar las cantidades que se encuentran en la leche, así como también los niveles de suplementación para alimentos, fórmulas infantiles y suplementos proteínicos.

El objetivo de la presente investigación es determinar el contenido de lactoferrina utilizando el método inmunoquímico de ELISA, en diferentes leches infantiles comerciales; y en las mismas leches, tras someter las muestras a diferentes tratamientos con microondas y observar el efecto del tratamiento sobre la estabilidad de la lactoferrina. De los resultados obtenidos concluimos dos aspectos importantes. El primero de ellos, que los tratamientos para la obtención de leche en polvo afectan el contenido de lactoferrina en el producto final. Como segundo punto, que el calentamiento intenso en microondas de las leches para alimentación infantil suplementadas con lactoferrina

bovina disminuye considerablemente el contenido de la proteína activa, sin embargo los calentamientos moderados no afectan el contenido de esta proteína en la leche.

Palabras claves- Calentamiento, fórmulas infantiles, ingredientes funcionales, lactoferrina, método de ELISA, microondas, proteína del lactosuero.

Abstract- Lactoferrin is a protein found in milk, which confers important properties as the follows: it is involved in iron transport, immunological and antimicrobial activities. The commercial interest in using the beneficial properties of lactoferrin in different types of foods, including infant formula, is increasing. It is therefore important to develop appropriate analytical detection methods for this protein. These tests should be able to detect the concentrations found in milk, as well as supplementation levels for food, infant formula and protein supplements.

The aim of this investigation is to determine the lactoferrin content using immunochemical method ELISA in different commercial infant milk formulae, before and after applying to the different samples treatments with microwaves; and observe the effect of treatment on lactoferrin stability. From these results we conclude two important aspects: the first one, the treatments to manufacture the powdered milk infant formula affects the content of lactoferrin in the final product. The second point, the intense heat in microwave for infant milks formulae supplemented with bovine lactoferrin significantly reduces the content of the active protein, however it is unaffected by moderate heating of the protein content in the milk.

Keywords- ELISA test, functional ingredients, heating, infant formulae, lactoferrin, microwave, whey proteins.

Tipo de Artículo: original

Fecha de Recepción: 30 de mayo 2013

Fecha de Aceptación: 11 de octubre de 2013

1. Introducción y Objetivos

La leche aporta muchos nutrientes al organismo, además de agua y minerales. Entre las proteínas destaca la caseína, y diversos componentes menores como las seroglobulinas y albúminas. Dentro de las seroglobulinas se encuentran algunas proteínas con propiedades importantes en el desarrollo del sistema inmune, para el crecimiento y antimicrobianas en el neonato, como lo son la α -lactalbumina, β -lactoglobulina y la lactoferrina [1].

La lactoferrina es una glicoproteína que se utiliza actualmente como componente funcional en los alimentos. Se le han atribuido diversas funciones, entre ellas la de regular el transporte de hierro en el organismo, poseer actividad antitumoral e inmunomoduladora y la de ejercer una actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos [2]. La leche humana es especialmente rica en lactoferrina. Su concentración en el calostro (leche durante los primeros días de lactación) es de unos 7 g/l, permanece en torno a 1 g/l durante toda la lactación, y aumenta de nuevo sus niveles al final de la lactación alcanzando valores entre 20-30 g/l [3]. La evolución de la concentración de la lactoferrina a lo largo de la lactación es similar en la leche bovina, pero en la leche definitiva los niveles son mucho más bajos, en torno a 0,1 g/l. Por eso, las leches para alimentación infantil elaboradas a base de leche de vaca, están prácticamente desprovistas de lactoferrina. Debido a esto la tendencia actual es añadir lactoferrina a las fórmulas infantiles.

Debido a la evidente dificultad de obtener lactoferrina a partir de leche humana a gran escala, se han desarrollado sistemas para la producción de lactoferrina humana recombinante en cultivos fúngicos [4], en vacas transgénicas [5] y en plantas como el tabaco [6], el maíz [7] y el arroz [8]. La producción de lactoferrina humana recombinante en arroz abre expectativas particularmente interesantes, ya que para algunas aplicaciones podría no ser siquiera necesario extraer la proteína de forma pura, utilizando directamente la harina de arroz o un extracto de esta harina.

Actualmente en países asiáticos, como Japón, Korea, Indonesia, y en países europeos como Holanda, España y otros, se da la suplementación de las fórmulas infantiles con lactoferrina. Sin embargo, la suplementación con un componente funcional debe mantener las características del componente añadido luego del proceso tecnológico al que sea sometido el alimento, elemento que algunas veces no es tomado en consideración por los fabricantes, quienes declaran en el etiquetado la cantidad añadida inicialmente, la cual puede perder su estabilidad a lo largo del tratamiento [9].

El objetivo de la presente investigación es determinar el contenido de lactoferrina utilizando el método inmunoquímico de ELISA, en diferentes leches infantiles comerciales; y en las mismas leches, tras someter las muestras a diferentes tratamientos con microondas y observar el efecto del tratamiento sobre la estabilidad de la lactoferrina.

2. Materiales

La lactoferrina bovina utilizada procedía de Fina Research (Seneffe, Bélgica).

Los adyuvantes de Freund, completo e incompleto, con los cuales se realizaron las inmunizaciones de los conejos, las IgG anti-IgG de conejo obtenidas en cabra y marcadas con peroxidasa, el Sephadex G-100, el Sephacryl 200, el DEAE Sephadex A-50, la peroxidasa de rábano (actividad 250-503 U/mg), la ovoalbúmina tipo II y el timerosal fueron obtenidos de Sigma (Poole, Reino Unido).

El 5,5-dietilbarbiturato sódico (Veronal) procedía de Panreac (Barcelona, España).

El sustrato de la peroxidasa que contiene tetrametilbencidina (TMB) fue suministrado por ZEU-Inmunotec (Zaragoza, España).

El reactivo Cibacron Blue F3GA-Sepharosa se obtuvo de Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Alemania).

La Sepharosa-4B activada con bromuro de cianógeno fue obtenida de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia).

Las placas de ELISA MaxiSorp de 96 pocillos fueron obtenidas de Nunc (Roskilde, Dinamarca).

Las células de ultrafiltración y las membranas de punto de corte de 10.000 se obtuvieron de Millipore-Amicon (Billerica, MA, E.U.).

Las leches de fórmula infantiles analizadas fueron leches en polvo de diferentes marcas, tres del mercado local español y una del mercado japonés. Leche A: Leche para lactantes desde el 1er día enriquecida con hierro, Leche B: leche de continuación enriquecida con nucleótidos y galactooligosacáridos, Leche C: leche en polvo para infantes, Leche D: leche para lactantes enriquecida con ácidos grasos DHA y ARA y minerales.

Se utilizó quimosina recombinante comercial CHY-MAX de CHR Hansen (Hørsholm, Dinamarca).

Los recipientes utilizados para preparar las leches infantiles fueron biberones comerciales de plástico, con 240 ml de capacidad total de Tigex (St. Etienne, Francia). El microondas utilizado en este estudio fue un modelo Sanyo Super Showerwave tipo EM-S1050 con un poder máximo de 800 W.

El resto de los productos utilizados no señalados específicamente fueron reactivos de grado analítico obtenidos de diversas fuentes.

3. Metodología

3.1. Aislamiento de Anticuerpos Antilactoferrina Bovina y Conjugación con Peroxidasa

Los antisueros anti-lactoferrina bovina fueron obtenidos por inmunización de conejos utilizando como inmunógeno lactoferrina bovina purificada según el método desarrollado por Conesa et al. [10]. Todos los experimentos cumplieron con las normas del Comité de Ética para ensayos con animales de la Universidad de Zaragoza, bajo la licencia de proyecto PI/4810. El uso y cuidado de los animales cumplió con las Normas Españolas para la Protección Animal, RD1201/05, que cumple con las directivas de la Unión Europea 86/609 para la protección de animales usados para experimentación y otros propósitos científicos.

De manera resumida, cada conejo fue inoculado con unas 10 inyecciones subcutáneas, 0,5 ml de una solución de proteína de 1 mg/ml de lactoferrina bovina. Estas soluciones de proteína fueron emulsionadas previamente con un volumen igual de adyuvante completo de Freund en la primera inoculación, y adyuvante incompleto de Freund en todas las inoculaciones siguientes. Transcurridos 21 días de la primera inoculación, se llevó a cabo la segunda inoculación. A las dos semanas de esta segunda inoculación los animales se sangraban para obtener el antisuero, por medio de una pequeña incisión en la vena marginal de la oreja tras aplicar localmente xileno a manera de vasodilatador. En las extracciones de sangre sucesivas los animales tuvieron un tiempo de recuperación de 15 días, repitiéndose las inoculaciones cada 30 días.

La sangre se dejó coagular espontáneamente a temperatura ambiente, tras lo cual fue centrifugada a 1000 x g durante 10 min. El suero sanguíneo se almacenó en alícuotas de 1 ml a -25°C hasta su uso.

Los anticuerpos específicos anti-lactoferrina bovina se obtuvieron pasando el antisuero correspondiente por una columna de lactoferrina bovina insolubilizada con Sepharosa 4B activada. Para preparar el inmunoabsorbente, a 2,5 g de la Sepharosa 4B activada se le añadieron 20 ml de HCl 1 mM. El gel se lavó en un crisol filtrante con placa porosa No.3, con HCl 1 mM, y luego se equilibró con tampón bicarbonato de sodio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3. Tras este tratamiento se obtuvieron aproximadamente 6 g de Sepharosa, a los que se añadieron 6 ml de una solución de lactoferrina bovina purificada a una concentración de 5 mg/ml disuelta

en el mismo tampón bicarbonato de sodio usado para equilibrar el gel. El gel se dejó incubando toda la noche a 4°C con agitación moderada. Posteriormente, se lavó en un filtro de placa porosa con el mismo tampón y se midió la absorbancia del filtrado para determinar la cantidad de proteína no ligada al gel. El gel se incubó con 5 ml de etanolamina 1 M de pH 8 durante 2 horas, para bloquear los grupos activos que no hubieran reaccionado con las proteínas. Tras este proceso, el gel se lavó con un tampón fosfato monopotásico 1,5 mM, fosfato dipotásico 8,4 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4 para eliminar la etanolamina.

Para aislar los anticuerpos anti-lactoferrina bovina se aplicó un volumen de 15 ml del suero de conejo anti-lactoferrina bovina, con un flujo de aproximadamente 0,1 ml/min. Se lavó el gel con tampón fosfato potásico 25 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4 hasta obtener una lectura de absorbancia a 280 nm en el excluido menor a 0,02. A continuación se eluyeron los anticuerpos con tampón glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8 en fracciones de 2 ml. Los anticuerpos eluidos se neutralizaron inmediatamente con volúmenes previamente calculados de tampón Tris 0,5 M, pH 8,0, añadidos a los tubos en los que se recogió el eluido. Por último, las fracciones conteniendo los anticuerpos específicos eluidos se dializaron frente a SSF y se concentraron por ultrafiltración utilizando membranas de punto de corte de 10.000. Los anticuerpos concentrados se congelaron a -20°C hasta su uso.

Para la peroxidación, se disolvieron 5 mg de peroxidasa de rábano en 0,5 ml de agua destilada, protegiendo la solución de la luz. Se agregaron lentamente 80 µl de peryodato sódico 25 mM y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min, con agitación suave y protegida de la luz. Luego se añadieron 0,1 ml de una solución acuosa de etilenglicol al 1% (v/v), y la mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 min. La peroxidasa oxidada se dializó frente a 5 l de tampón acetato sódico 1 mM, pH 4,4 a 4°C durante toda la noche, utilizando una membrana de punto de corte de 12.000. Por otra parte, se dializó una solución de los anticuerpos específicos anti-lactoferrina bovina frente a tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,2 y se concentró con una célula de ultrafiltración de punto de corte de 10,000 hasta obtener una solución de aproximadamente 10 mg/ml.

Se mezclaron 0,1 ml de cada una de las soluciones de peroxidasa y de anticuerpos anti-lactoferrina

bovina y se añadieron 50 µl de carbonato sódico 0,5 M, pH 9,2. La mezcla se incubó 4 horas en agitación suave, a temperatura ambiente y protegida de la luz. A continuación, la mezcla se introdujo en un recipiente con hielo picado, se añadieron 50 µl de borohidruro de sodio 0,1 M y se incubó 40 min a 4°C. Por último, la mezcla se dializó toda la noche a 4°C frente a tampón fosfato monopotásico 1,5 mM, dihidrógeno fosfato de sodio, KCl 3 mM, NaCl 0,1 M pH 7,4 (PBS), y se dividió en alícuotas de 10 µl que se guardaron a -20°C hasta su uso.

3.2. Técnica de ELISA en Placa Tipo Sándwich

Se utilizó el método de ELISA en placa no competitivo tipo sándwich para cuantificar lactoferrina bovina previamente desarrollado por nuestro grupo [11]. Se recubrieron los pocillos de las placas con 100 µl de los anticuerpos anti-lactoferrina bovina (20 µg/ml), disueltos en un tampón de carbonato-bicarbonato sódico 0,05 M, pH 9,6 y se mantuvieron durante toda la noche a 4°C. La placa se lavó a continuación con PBST (tampón PBS con 0,05% Tween 20) en un equipo automático Thermo Wellwash 4MK2 de Thermo Fisher Scientific Inc. (Shanghai, China). Los pocillos se incubaron a una temperatura de 37°C en un incubador Osaka (Valencia, España) con 300 µl de ovoalbúmina al 3% en PBS durante dos horas. La placa se lavó y se incubaron los pocillos con 100 µl de la solución de lactoferrina bovina, durante 1 hora a 37°C. Después la placa se lavó 5 veces y se incubó con 100 µl de la solución de anticuerpos anti-lactoferrina bovina conjugado con peroxidasa durante 1 hora a 37°C. La placa se lavó 5 veces y se incubó con 100 µl del sustrato de la peroxidasa que contiene tetrametilbencidina (TMB) durante media hora a 37°C. La reacción se detuvo por medio de la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 2 M y se determinó la absorbancia a 450 nm en un lector Multiskan MS de Labsystem (Helsinki, Finlandia).

3.3 Preparación de los Estándares de Lactoferrina Bovina Para la Técnica de ELISA

Las soluciones de proteína utilizadas como estándares en la técnica de ELISA se prepararon en PBS, determinándose su concentración por pesada directa de la proteína.

Para poder cuantificar la lactoferrina se utilizó una curva de calibrado realizada con soluciones de

lactoferrina de 10, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ng/ml. Estos estándares se prepararon en una solución de PBS con 0,5 % de ovoalbúmina y 0,04 % de timerosal, a una concentración 100 veces mayor a la usada en los ensayos, y se distribuyeron en alícuotas a -20°C hasta su uso. En el momento de la realización del ELISA, estas soluciones se diluyeron en PBS a las concentraciones de los estándares anteriormente citadas.

3.4. Determinación del Contenido de Lactoferrina en Leches Infantiles Comerciales

Se determinó el contenido de lactoferrina en los 4 tipos de leche comerciales, 3 leches procedentes de España y una procedente de Japón. La leche se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y para realizar la determinación de la concentración se utilizó el método de ELISA previamente descrito, diluyéndose las muestras hasta que se encontraran en el rango de la curva de calibración. Estas determinaciones se realizaron por triplicado (revisor 1).

3.5. Efecto del Calentamiento en Microondas Sobre la Estabilidad de la Lactoferrina

Las leches comerciales se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se colocaron 100 ml de leche en el biberón siempre en la misma posición en el centro del microondas. Se aplicaron diferentes potencias, 450, 550 y 650 W, por períodos de tiempo de 15, 20, 30 y 60 s. Se prepararon por triplicado cada una de las muestras, siendo 3 tratamientos por 4 periodos de tiempo, un total de 36 muestras (revisor 1). La temperatura de la leche se midió inmediatamente tras el tratamiento y el biberón se colocó en un baño de agua-hielo. Estas muestras se analizaron por medio del test de ELISA desarrollado previamente para determinar la concentración de lactoferrina.

4. Resultados

4.1. Determinación del Contenido de Lactoferrina en Leches Infantiles Comerciales

Para observar el efecto sobre la concentración de la lactoferrina que tiene el tratamiento utilizado en la producción de diferentes tipos de fórmulas infantiles en polvo, determinamos por ELISA el contenido de esta proteína en las cuatro fórmulas comerciales que le adicionan esta proteína. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1. La etiqueta del envase de estas

leches de fórmula presenta la composición, en la que se encuentran los valores de lactoferrina, siendo para la leche C de 80 mg/100 g y para la leche D de 926 mg/100 g. Comparando estos valores con los obtenidos mediante el test de ELISA, vemos que el valor declarado en la leche C es bastante cercano al que hemos obtenido. Esta leche es la de origen japonés. Sin embargo, el valor que hemos obtenido D es apenas una cuarta parte del valor declarado por el fabricante. En las leches A y B no se especifica el contenido en lactoferrina, solo se declara que contienen proteínas del lactosuero, pero hemos observado que este contenido es muy bajo.

Tabla 1. Contenido de lactoferrina bovina en leches de fórmula infantil.

Leche	mg/100 g LF
Leche A	0,02 ± 0,01
Leche B	0,47 ± 0,17
Leche C	65,88 ± 16,50
Leche D	216,83 ± 6,53

4.2. Efecto del Calentamiento en Microondas Sobre la Estabilidad de la Lactoferrina

Para determinar el efecto que ejerce el calentamiento por microondas en las leches infantiles, usamos dos de las cuatro leches comerciales en las que determinamos el contenido de lactoferrina, leche B y leche D, una con bajo contenido y una con alto contenido. Se prepararon las leches como indica el fabricante y se calentaron al microondas en diferentes intervalos de tiempo. Se midió la temperatura al final del periodo de calentamiento, cuyos datos se presentan en las Tablas 2-3. Para la leche D (tabla 2), cuando el calentamiento se hizo durante 15 s, la diferencia de temperatura al utilizar intensidades crecientes de la potencia del microondas fue de 6°C, siendo de 37°C para el tratamiento a 450W y de 43°C para 650 W. Al incrementar el tiempo de calentamiento, esta diferencia se hizo menor, de 3°C, variando las temperaturas entre 45 y 48°C cuando la leche se calentó durante 20 s. Para un tiempo de 60 s, la temperatura se elevó de manera pronunciada cuando se seleccionaba una potencia de 550 W y 650 W, siendo de 83°C y 86°C respectivamente. Similar comportamiento se encontró para la leche B (tabla 3), donde se observó una diferencia

de 7°C durante el periodo más corto de calentamiento (de 15 s), siendo el intervalo de temperaturas alcanzado de entre 33 y 40°C para 450 y 650W, respectivamente. Sin embargo, cuando la leche se calentó en el microondas durante un periodo prolongado (60 s), se encontró un calentamiento de las leches elevado, siendo de entre 80 y 88°C a 450 y 650 W, respectivamente.

Tabla 2. Temperaturas (°C) alcanzadas en leche D calentada al microondas con diferentes intensidades de potencia.

Tiempo (s)	Potencia (W)		
	450	550	650
15	36,7 ± 4,1	40,3 ± 2,5	42,7 ± 2,5
20	45,7 ± 3,5	44,7 ± 1,5	48,0 ± 2,0
30	50,0 ± 2,6	55 ± 2,6	59,3 ± 1,1
60	70,0 ± 4,4	83,0 ± 1,0	85,7 ± 1,1

Tabla 3. Temperatura (°C) alcanzadas en leche B calentada al microondas con diferentes intensidades de potencia.

Tiempo (s)	Potencia (W)		
	450	550	650
15	33,0 ± 0,0	37,5 ± 3,5	40,0 ± 0,0
20	39,0 ± 1,4	40,5 ± 2,1	40,5 ± 0,71
30	47,5 ± 0,7	54,0 ± 2,8	56,0 ± 1,4
60	80,5 ± 3,5	83,5 ± 2,1	88,5 ± 2,1

En la figura 1 se muestran los resultados de la determinación de la concentración de lactoferrina por inmunoreactividad durante el tratamiento con microondas a diferentes intensidades de potencia para la leche infantil D. La concentración detectada para el control es de 207 mg/ml. Se observa que cuando calentamos a 450 W hay una disminución apreciable de la concentración de lactoferrina para un tiempo de 60 segundos, siendo ésta de un 20% con respecto al control. Para los otros tiempos, la disminución en la concentración no es apreciable. Cuando incrementamos la potencia a 550 W, no existe un cambio apreciable en la concentración de lactoferrina con respecto al control para ninguno de los tiempos en los cuales efectuamos el calentamiento. Al aumentar la intensidad del tratamiento a 650 W, se observa que hay una disminución progresiva de la concentración de lactoferrina, siendo de alrededor del 30% a los 20 y 30 s, y alcanzando un máximo de 45% de disminución al incrementar el periodo de calentamiento a 60 s.

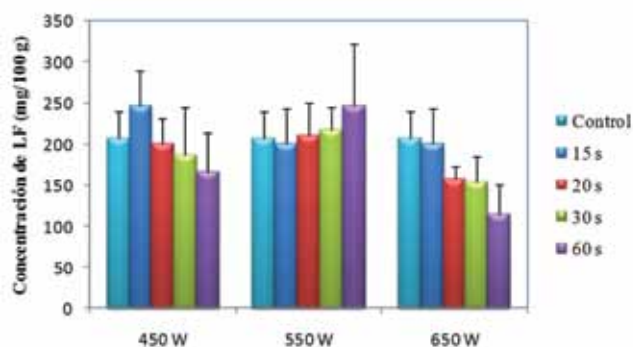


Figura 1. Concentración de lactoferrina determinada por ELISA en leche D sometida a diferentes calentamientos en microondas. Resultados expresados como la media de los valores de tres experimentos independientes, siendo las muestras analizadas por triplicado.

En la figura 2 se muestran los resultados de concentración de lactoferrina en la leche B que fue sometida a los tratamientos de calentamiento por microondas. El valor de lactoferrina para el control es de 0,51 mg/ml. Al calentar con una intensidad de 450 W, solo a 60 s observamos una disminución del 15%, no siendo apreciables los cambios en la concentración de la proteína durante periodos menores de calentamiento. De forma similar a lo que se encontró con la leche D, la concentración de lactoferrina no tiene una variación apreciable con respecto al control en ninguno de los periodos de calentamiento con una intensidad de microondas de 550 W. Cuando se alcanza la intensidad máxima de 650 W, a partir de 30 s los niveles de lactoferrina disminuyen de manera más pronunciada con respecto al control, siendo esta disminución de un 20% a los 30 s, llegando a alcanzar un máximo de 45% a los 60 segundos de calentamiento.

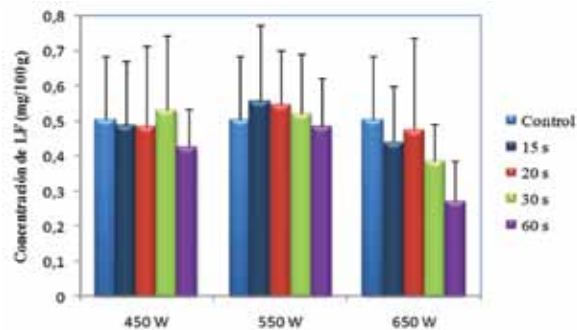


Figura 2. Concentración de lactoferrina en leche infantil B sometida a diferentes calentamientos en microondas. Resultados expresados como la media de los valores de tres experimentos independientes, siendo las muestras analizadas por triplicado.

5. Discusión

El tratamiento de producción de las leches de fórmula, bien sea mediante una esterilización en el envase para las fórmulas líquidas o mediante el secado por atomización para las fórmulas en polvo, conlleva consecuencias nutricionales. Desde hace años, investigaciones en este campo demuestran que los tratamientos térmicos producen cambios en las interacciones entre los nutrientes de la leche, por la desnaturalización y agregación de las proteínas [12], [13], que alteran posiblemente su digestibilidad [14]. Es por ello, que es importante la suplementación de las leches con los elementos perdidos durante el tratamiento.

El alto contenido de lactoferrina en la leche humana, comparada con la leche bovina, el cual es casi 10 veces más, indica la importancia de esta proteína en el desarrollo de los niños. Por ello, en los últimos años se ha llevado a cabo la suplementación de leches infantiles con aislados de lactoferrina bovina [15], [16], [17]. Se ha observado que las fórmulas suplementadas con lactoferrina bovina incrementan la biodisponibilidad de hierro en niños, lo que produce un valor agregado a la alimentación de los bebés usando fórmulas suplementadas con lactoferrina bovina [18].

También se han hecho estudios *in vitro* para observar el efecto de la suplementación de leches infantiles con lactoferrina humana recombinante [19]. Según algunas investigaciones realizadas, la lactoferrina administrada a una concentración de 1 mg/ml contribuye al desarrollo de la flora intestinal beneficiosa, del tipo *Bifidobacterium*, en bebés a la edad de tres meses [20]. Sin embargo, hay opiniones contradictorias en cuanto al efecto sobre la absorción de hierro. Algunos estudios demuestran que la lactoferrina se relaciona con la absorción de hierro en el organismo [18], [21], mientras que otros estudios no encuentran efecto positivo de la suplementación con lactoferrina de las leches infantiles sobre la absorción de hierro [22], [23]. Por otra parte, se ha observado que al añadir lactoferrina a las leches infantiles, ésta ejerce un efecto antioxidante sobre la grasa que se añade a las mismas [24].

La lactoferrina puede añadirse a las leches infantiles de fórmula en polvo como agente antibacteriano. El consumo de la leche de fórmula infantil algunas veces se ha asociado con brotes de *Cronobacter sakazakii*, bacteria que se inactiva usualmente durante la pasteurización [25]. Sin embargo, la presencia de esta

bacteria en leches infantiles se debe principalmente a contaminaciones post-procesado, a la adición de ingredientes contaminados durante la producción o a la colonización por *C. sakazakii* por el uso de utensilios contaminados como biberones, cucharas, escobillas y esponjas durante la preparación de la leche [26].

En nuestro estudio, de los valores obtenidos para la concentración de la lactoferrina en las leches de fórmula analizadas, se desprende que la leche producida en Japón es la que contiene valores más similares a los declarados en el etiquetado. Sin embargo, la leche producida en España se aleja mucho del valor indicado en la etiqueta. Esto tiene que ver seguramente con la etapa del proceso de producción de la leche en la cual se añade la proteína, la duración del tratamiento térmico del mismo y la proporción de componentes propios de cada formulación. Se han desarrollado otras metodologías para la determinación de lactoferrina bovina principalmente en leche, como lo son los métodos nefelométricos, inmunoenzimáticos y hasta cromatográficos [17], [27], [28], [29], pero pocos trabajos han aplicado los métodos desarrollados para la determinación de lactoferrina en fórmulas infantiles antes y después del tratamiento.

Entre los trabajos desarrollados está el del grupo de Indik y Filonzi [30], quienes determinaron, por medio de análisis con biosensores ópticos, el contenido de lactoferrina en fórmulas infantiles suplementadas con esta proteína, leche descremada, leche entera y yogurt. Compararon los resultados con los valores obtenidos por un método de ELISA y los valores de lactoferrina que encontraron para la fórmula infantil fueron de 14.8 mg/100 g por el método de ELISA, 38.6 mg/100 g con el método desarrollado por ellos, y el valor reportado en la etiqueta era de 20 mg/100 g. En el resto de las muestras analizadas el contenido de lactoferrina coincidía con el valor declarado en el etiquetado, aunque en un producto heterogéneo obtenido usando un protocolo de mezclado en seco, los valores fueron mucho menores de los esperados. El inconveniente encontrado para la validación de su método, fue que solo existe un pequeño número de muestras disponibles en el mercado conteniendo lactoferrina. Soejima *et al.* [8] determinaron el contenido de lactoferrina suplementada por ellos mismos en leche cruda, leche UHT, yogurt y fórmulas infantiles, por medio de un método de aglutinación en látex. Para aproximarse al valor real de concentración de lactoferrina -50 mg/100 g- en leche infantil usaron dos

diluciones (1/1000 y 1/2000) y el resultado más próximo a este valor lo obtenían con la dilución 1/1000. En el otro tipo de muestras no existía diferencia en los resultados obtenidos en cuanto a diferentes diluciones. Atribuyen esto a un ligero efecto inhibitorio por el alto contenido de sólidos (aprox. 97%), aproximadamente 8 veces mayor en la leche de fórmula que en la leche UHT.

El calentamiento en microondas de las leches de fórmula infantiles ya preparadas en el biberón no es recomendable porque puede causar quemaduras al bebé o la botella puede explotar [31], [32]. Sin embargo, es una práctica que sigue siendo muy utilizada, incluso en hospitales [33], por lo cual hasta se han elaborado protocolos para el calentamiento de los biberones en el microondas [34]. Además de los riesgos citados, el calentamiento de la leche en microondas puede afectar a su valor nutricional. Se han realizado estudios acerca del efecto que el calentamiento puede ejercer en las proteínas de la leche. Villamiel *et al.* [35] encontraron que no había diferencias en el contenido de α -lactalbúmina y β -lactoglobulina cuando se calentaba la leche de fórmula con microondas o por calentamiento convencional a una temperatura de 70°C durante 30 min. Resulta difícil de comparar entre diferentes trabajos el efecto del calentamiento en microondas, ya que va a depender de la cantidad de producto y de la forma y material del recipiente utilizado. En general todos los biberones tienen una forma similar, pero dada la gran cantidad de materiales de plásticos resistentes al calor, es muy difícil contrastar los resultados entre estudios realizados con diferentes materiales.

En este estudio hemos encontrado una mayor disminución en la concentración de lactoferrina inmunorreactiva cuando se aplica un calentamiento con una potencia de 650 W por un periodo mayor de 20 s para la D y durante un periodo mayor de 30 s para la leche B. Esto se relaciona directamente con la temperatura máxima alcanzada por la leche durante este calentamiento, que ha sido lo suficientemente alta, entre 80 y 89°C cuando se calentaba durante 60 s, lo que causa la desnaturalización de la lactoferrina. En estudios con leche materna a temperaturas de entre 72 y 98°C durante 15 s de exposición a máxima potencia, se encuentra una marcada disminución en la actividad de los factores anti-infectivos estudiados, como la lisozima y las IgA [36]. En un estudio de Goldblum *et al.* [37] se encontró que calentamientos rápidos a altas temperaturas, 72°C

durante 5-15 s no afectaban a la calidad inmunológica de la leche materna determinando los niveles de IgA y de lactoferrina.

6. Conclusiones

La suplementación con lactoferrina es de suma importancia en el mercado de las leches infantiles. Cabe resaltar que en Panamá actualmente no se encuentra disponible en el mercado leches suplementadas con esta proteína, factor que debería ser tomado en consideración por la industria fabricante a futuro cercano. La exactitud de la determinación de esta proteína dependerá del método utilizado, siendo los métodos inmunoquímicos utilizados en estos estudios, bastante precisos.

De acuerdo con nuestros resultados, el calentamiento en microondas de la leche de fórmula infantil suplementada con lactoferrina produce la pérdida de su actividad inmunorreactiva solo cuando se aplican altas potencias, 600 W durante largos periodos, mayores de 30 segundos. Es por ello que es preciso advertir que si se utiliza el microondas sea de forma moderada en tiempo e intensidad para no afectar los componentes con valor biológico en la leche, como lo es la lactoferrina.

7. Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el Proyecto CICYT AGL 2005-05494 del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Madrid, España). Los estudios doctorales de Indira Franco, bajo los cuales se desarrolló el presente proyecto, fueron financiados por el Gobierno de la República de Panamá, mediante el Programa de Becas de Excelencia Profesional SENACYT-IFARHU 2006-2010. Actualmente la Dra. Franco es miembro del Sistema Nacional de Investigación-SIN-en la República de Panamá.

Referencias Bibliográficas

- [1] R. Jensen, Handbook of milk composition. San Diego, CA: Academic Press, 1995, pp. 1-3.
- [2] Farnaud, S. y Evans, R.W, Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties, *Molecular Immunology*, vol. 40, pp. 395–405, 2003.
- [3] P.F. Hennart, D.J. Brasseur, J.B. Delogne-Desnoeck, M.M. Dramaix, y C.E. Robyn, Lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin: A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status, and parity of mother. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 53, pp. 32-39, 1991.
- [4] P.-P. Ward, C.S. Piddington, G.A. Cunningham, X. Zhou, R.D. Wyatt, y O.M. Conneely, A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Biotechnology*, vol. 13, pp. 498-503, 1995.

- [5] P.H. van Berkel, M.M. Welling, M. Geerts, H.A. van Veen, B. Ravensbergen, M. Salaheddine, E.K.J. Pauwels, F. Pieper, J.H. Nuijens, y P.H. Nibbering, 2002, Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows, *Nature Biotechnology*, 20:484–487, 2002.
- [6] V. Salmon, D. Legrand, M.C. Slomianny, I.E. Yazidi, G. Spik, V. Gruber, P. Bournat, B. Olganier, D. Mison, M. Theisen, y T.B. Mérot, Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants, *Protein Expression and Purification*, vol.13, pp. 127-135, 1998.
- [7] B. Samyn-Petit, V. Gruber, C. Flahaut, J.P. Waida-Dubos, S. Farrer, A. Pons, G. Desmaizieres, M.C. Slomianny, M. Theisen, y P. Delannoy, N-glycosilation potential of maize: the human lactoferrin used as a model. *Glycoconjugate Journal*, vol. 18, pp. 519-527, 2001.
- [8] S. Nandi, D. Yalda, S. Lu, Z. Nikolov, R. Misaki, K. Fujiyama, y N. Huang, Process development and economic evaluation of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain, *Transgenic Research*, vol. 14, pp. 237–249, 2005.
- [9] T. Soejima, K. Yamauchi, T. Yamamoto, Y. Ohara, E. Nagao, K. Kanbara, M. Fujisawa, Y. Okuda, y S. Namba, Determination of bovine lactoferrin in lactoferrin-supplemented dairy products and raw milk by an automated latex assay. *Journal of Dairy Research*, vol. 74, pp. 100-105, 2007.
- [10] C. Conesa, L. Sánchez, C. Rota, M.D. Pérez, M. Calvo, S. Farnaud, y R.W. Evans, Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, vol. 150, pp.131-139, 2008.
- [11] I. Franco, E. Castillo, M.D. Pérez, M. Calvo, M. y L. Sánchez, Effect of bovine lactoferrin addition to milk in yoghurt elaboration, *Journal of Dairy Science*, vol. 93, pp. 4480-4489, 2010.
- [12] J.R. Euber, y J.R. Brunner, Interaction of κ -casein with immobilized β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, vol. 65, pp. 2384-2387, 1982.
- [13] B. Noh, T. Richardson, y L.K. Creamer, Radiolabelling of the heat induced interactions between α -lactalbumin, β -lactoglobulin and κ -casein in milk and buffer solutions, *Journal of Food Science*, vol. 54, pp. 889-893, 1989.
- [14] S. Rudloff y B. Lönnerdal, Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*, vol. 15, pp. 25-33, 1992.
- [15] J.M. Steijns, y A.C.M. van Hooijdonk, 2000. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin, *British Journal of Nutrition*, vol. 84, pp. S11–S17, 2000.
- [16] H. Kuwata, K. Yamauchi, S. Teraguchi, Y. Ushida, Y. Shimokawa, T. Toida, y H. Hayasawa, Functional fragments of injected lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. *Journal of Nutrition*, vol. 131, pp. 2121–2127, 2001.
- [17] Y.Y. Tu, C.C. Chen, J.H. Chang y H.M. Chang, Characterization of lactoferrin (Lf) from colostrum whey using anti-Lf antibody immunoaffinity chromatography, *Journal of Food Science*, vol. 67, pp. 996-1001, 2002.
- [18] G. Schulz-Lell, K. Dörner, H.D. Oldigs, E. Sievers, y J. Schaub, Iron Availability from an Infant Formula Supplemented with Bovine Lactoferrin. *Acta Paediatrica*, vol. 80, pp. 155-158, 1991.
- [19] T.S. Raghuvver, E.M. Mcguire, S.M. Martin, B.A. Wagner, C.J. Rebouché, G.R. Buettner, y J. Widness, Lactoferrin in the preterm infants diet attenuates iron-induced oxidation products. *Pediatric Research*, vol. 52, pp. 964-972, 2002.
- [20] A.K. Roberts, R. Chierici, G. Sawatzki, M.L. Hill, S. Volpato, y V. Vigi, Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the infant faecal flora. *Acta Paediatrica*, vol. 81, pp. 119-124, 1992.
- [21] R. Chierici, G. Sawatzki, L. Tamisari, S. Volpato, y V. Vigi, Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin. 2. Effects on serum iron, ferritin and zinc levels. *Acta Paediatrica*, vol. 81, pp. 475-479, 1992.
- [22] M. Jovaní, R. Barberá, y R. Foaarré, Effect of lactoferrin addition on the dialysability of iron from infant formulas. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 17, pp. 139-142, 2003.
- [23] O. Hernell, y B. Lönnerdal, Iron status of infants fed low-iron formula: no effect of added bovine lactoferrin or nucleotides. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 76, pp. 858-864, 2004.
- [24] M.T. Satué-Gracia, E.N. Frankel, N. Rangavajhala, y J.B. German, Lactoferrin in Infant Formulas: Effect on Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, pp. 4984-4990, 2000.
- [25] M. Nazarowec-White, y J.M. Farber, Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula, *Letters of Applied Microbiology*, vol. 24, pp. 9–13, 1997.
- [26] AA. Al-Nabulsi, y R.A. Holley, Enhancing the antimicrobial effects of bovine lactoferrin against *Escherichia coli* O157:H7 by cation chelation, NaCl and temperature. *Journal of applied Microbiology*, vol. 100, pp. 244-255, 2006.
- [27] P.M. Montagne, V.S. Trégoata, M.L. Cuilliérea, M.C. Bénéa y G.C. Faurea. Measurement of nine human milk proteins by nephelometric immunoassays: application to the determination of mature milk protein profile, *Clinical Biochemistry*, vol. 33, pp. 181-186, 2000
- [28] K.P. Palmano, y D.F. Elgar, Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase HPLC on polystyrene-divinylbenzene. *Journal of Chromatography A*, vol. 947, pp. 307–311, 2002.
- [29] P-W. Chen y F.C. Mao, Detection of lactoferrin in bovine and goat milk by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 12, pp. 133–139, 2004.
- [30] H.E. Indyk y E.L. Filonzi, Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis, *International Dairy Journal*, vol 15, pp. 429-438, 2005.
- [31] R.A. Hibbard y R. Blevins, Palatal burn due to bottle warming in a microwave oven, *Pediatrics*, vol. 82, pp. 382-384, 1988.
- [32] L.J. Dixon, D.A.R. Burd, y D.G.V. Roberts, Severe burns resulting from an exploding teat on a bottle of infant formula milk heated in a microwave oven, *Burns*, vol. 23, pp. 268-269, 1998.
- [33] S. Beck Fein y C.D. Falci, Infant formula preparation, handling, and related practices in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 99, pp. 1234-1240, 1999.
- [34] M. Sigman-Grant, G. Bush, y R. Anantheswaran, Microwave heating of infant formula: a dilemma resolved, *Pediatrics*, vol. 90, pp. 412-415, 1992.
- [35] M. Villamiel, N. Corzo, I. Martinez-Castro y A. O'iano, Chemical changes during microwave treatment of milk, *Food Chemistry*, vol. 56, pp. 385-388, 1996.
- [36] R. Quan, C. Yang, S. Rubinstein, N.J. Lewiston, P. Sunshine, D.K. Stevenson y J.A. Kerner, Effects of microwave radiation on anti-infective factors in human milk, *Pediatrics*, vol. 89, pp. 667-669, 1992.
- [37] R.M. Goldblum, C.W. Dill, T.B. Albrecht, E.S. Alford, C. Garza, y A.S. Goldman, Rapid high-temperature treatment of human milk. *Journal of Pediatrics*. 104:380-385, 1984.