

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“INVESTIGACIÓN SOBRE EL FENÓMENO DE
ELECTROMIGRACIÓN EN LA CRISTALIZACIÓN DE
PROTEÍNAS, USANDO CELDAS DE CRECIMIENTO DE
CRISTALES CON MÚLTIPLES ELECTRODOS”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ELIZABETH NIETO MENDOZA



TUTOR: DR. BERNARDO A. FRONTANA URIBE

2005.

m. 345633

Los resultados presentados en esta tesis se obtuvieron con experimentos realizados entre enero del 2003 y junio del 2004 en el laboratorio de Electroquímica y Electrosíntesis del Instituto de Química, bajo la dirección del Dr. Bernardo A. Frontana Uribe.

El trabajo fue publicado como (ver Anexo III):

Elizabeth Nieto-Mendoza, Bernardo A. Frontana-Uribe, Gen Sazaki, Abel Moreno, "Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes: effect of the potential control", *Journal of Crystal Growth* 275 (2005) e1437-e1446.

Este trabajo se presentó en:

SIMPOSIO INTERNO 2004, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM, MÉXICO
D. F., 8-11 de marzo de 2004.

IV SIMPOSIO INTERINSTITUCIONAL DE ELECTROQUÍMICA
MOLECULAR, UNAM, MÉXICO D. F., 15-16 de junio de 2004.

14TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON CRYSTAL GROWTH,
GRENOBLE, FRANCIA, 9-13 de agosto de 2004.

Además participó en el concurso "Premio a la Inventiva y Creatividad Experimental" realizado dentro del **XX CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE ELECTROQUÍMICA, MORELOS, MÉXICO, 22-27** de mayo de 2005.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por haberme otorgado el privilegio de aprender dentro de sus instalaciones.

Al CONACYT y a DGEP por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Abel Moreno Carcamo por haberme permitido realizar algunos experimentos dentro de su laboratorio y por su ayuda incondicional en el desarrollo de la presente tesis.

Al Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas del Instituto de Química, por su apoyo en la obtención y elucidación de la difracción de rayos X.

Al Dr. Bernardo A. Frontana Uribe por su amistad y apoyó en la realización de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por haberme otorgado el privilegio de aprender dentro de sus instalaciones.

Al CONACYT y a DGEP por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Abel Moreno Carcamo por haberme permitido realizar algunos experimentos dentro de su laboratorio y por su ayuda incondicional en el desarrollo de la presente tesis.

Al Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas del Instituto de Química, por su apoyo en la obtención y elucidación de la difracción de rayos X.

DEDICATORIAS

A mi papá, Ing. Jorge Nieto Lugo †, porque siempre será mi ejemplo de superación (Las personas sólo mueren cuando nos olvidamos de ellas).

A mi mamá, Lic. M^a del Refugio Mendoza Ramírez, por su motivación y confianza absoluta.

A mi hermana, Lic. Gema Nieto Mendoza, por ayudarme y cuidarme siempre.

A Gibrán por su amor insuperable que mantiene lleno mi corazón.

A mis amigos del laboratorio, Ale, Alex, Dante, Beto, Lucha, Rox y Carlos por su amistad y por compartir sus experiencias y su trabajo conmigo.

..... MUCHAS GRACIAS.



V.3	Reactivos	42
V.4	Cristalización de las proteínas	42
V.4.1	Preparación de las disoluciones amortiguadoras	42
V.4.2	Preparación de las disoluciones batch	43
V.4.2.1	Lisozima / Acetatos	43
V.4.2.2	Catalasa / Tris-HCl	44
V.4.3	Procedimientos de cristalización	44
V.4.3.1	Cristalizaciones a corriente controlada	44
V.4.3.2	Cristalizaciones a potencial controlado	45
V.5	Estudio electroanalítico	46
VI.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
VI.1	Cristalización a corriente controlada	48
VI.1.1	Efecto de la geometría de la celda	52
VI.1.1.1	Celdas tipo A, B y C	52
VI.1.1.2	Celda tipo D	59
VI.1.2	Efecto del pH	60
VI.1.3	Calidad de los cristales - Estudio de rayos X	62
VI.2	Cristalización a potencial controlado	64
VI.2.1	Estudio de las barreras electroquímicas	64
VI.2.2	Variables importantes de la cristalización en disolución a potencial controlado	67
VI.2.3	Efecto de la imposición de potencial	70
VI.2.3.1	Cristalización de lisozima en gel	75
VI.2.4	Estudio del potencial de carga cero	79
VI.2.5	Pruebas preliminares con catalasa	84
VII.	CONCLUSIONES	87
VII.1	Cristalizaciones con imposición de corriente	88
VII.2	Cristalizaciones con imposición de potencial	89





VIII. PERSPECTIVAS	91
IX. ANEXOS	94
Anexo I. Metodología experimental para la construcción de las celdas de cristalización.	95
Anexo II. Fabricación del electrodo de referencia	100
Anexo III. Artículo publicado del trabajo realizado en la presente tesis.	101
X. REFERENCIAS	112





RESUMEN

En este trabajo se presentan las investigaciones realizadas sobre el efecto que ejerce el fenómeno de electromigración en la cristalización de proteínas, en gel y solución. Se discuten las ventajas y desventajas del número de electrodos y su disposición, usando celdas para el crecimiento de cristales diseñadas y fabricadas con múltiples electrodos a corriente constante ($2\mu\text{A}$). También se descarta un posible cambio de pH como un factor que pudiera influenciar la selectividad del crecimiento de cristales en el cátodo, explicando esta influencia en términos del fenómeno de electromigración. Experimentos a potencial controlado se llevaron a cabo con el fin de eliminar las reacciones parásitas observadas a corriente constante, resultando un incremento en la reproducibilidad y un mayor control del crecimiento de cristales. Finalmente se obtuvo para la lisozima el potencial de carga cero.

ABSTRACT

Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization in gels and solution using a crystal growth cell with multiple electrodes at constant current ($2\mu\text{A}$ per circuit) are discussed. In this work, the advantages and disadvantages of different electrode dispositions number, and electrode connections inside the cell are shown. A pH change effect was discarded as the main factor affecting the selective growth of the crystals at the cathode and the fact is explained in terms of electromigration phenomena. Additionally, controlled potential experiments were carried out in order to avoid parasitic reactions observed at constant current, resulting in an increase of reproducibility and better control of crystal growth. Finally for the lysozyme the zero charge potential was obtained.





I. INTRODUCCIÓN





I. INTRODUCCIÓN

Los estudios de la estructura-función de macromoléculas biológicas, así como los estudios relacionados con la biología molecular, la física y la química de las proteínas, requieren en la mayoría de los casos de la elucidación previa de la estructura molecular tridimensional de las proteínas.

En la actualidad existen dos poderosas técnicas de caracterización tridimensional de las proteínas: la resonancia magnética nuclear (RMN) y la difracción de rayos X. La primera permite obtener la estructura de macromoléculas biológicas en disolución. Desafortunadamente esta técnica está limitada por el peso molecular de las macromoléculas, que para el caso de las proteínas es imposible determinar una estructura tridimensional que supere los 30 kDa. La segunda alternativa requiere necesariamente de la obtención de cristales de alta calidad aptos para la difracción de rayos X. Con esta técnica más del 80% de las estructuras de las proteínas han sido resueltas,¹ y es por ello que la obtención de cristales de calidad es cada vez más necesaria dado que se ha convertido en el punto clave para diversos estudios bioquímicos que requieren la estructura tridimensional de la proteína.

La obtención de cristales de proteína con alta calidad requiere del desarrollo de nuevos métodos de crecimiento que permitan eficientar el tiempo y el tamaño del cristal, sin disminuir la calidad del mismo. Actualmente se han realizado estudios de algunos parámetros fisicoquímicos que controlan la cristalización de proteínas, entre ellos se encuentran estudios del campo magnético,^{2,3} el electroenfoque⁴ y la aplicación de un campo eléctrico externo.⁵

Al aplicar una corriente eléctrica dentro de una disolución se genera un campo eléctrico interno, cuyo efecto en la cristalización de proteínas ha sido estudiado apenas recientemente. El estudio mostró una disminución en el tiempo de





cristalización y una preferencia por el cátodo para cristalizar.⁶ Cuando se combina el efecto de un campo eléctrico interno y uno magnético se logra aumentar la orientación* y la homogeneidad en el tamaño del cristal.⁷ La aplicación de un campo eléctrico interno en la técnica de acupuntura en gel, permitió controlar la nucleación de los cristales hacia el ánodo y logró disminuir considerablemente el tiempo de cristalización.⁸

Basados en estos resultados previos, en este estudio se decidió determinar si la disposición de los electrodos en la celda es un factor determinante en la nucleación o en el crecimiento de los cristales, cuando se aplica un campo eléctrico interno. Dado que los estudios preliminares han sido realizados bajo condiciones de corriente controlada, en el presente estudio también se evaluó la influencia de la técnica de imposición del campo eléctrico interno, comparando cristalizaciones a corriente y potencial controlado. En esta última técnica el control del potencial permite obtener una mayor selectividad de las reacciones electroquímicas que ocurren en los electrodos y evitan las reacciones parásitas⁹ como la electrólisis del medio.^{6, 8}

* Se sabe que los cristales tetragonales de lisozima en presencia de un campo magnético se orientan, alineando su eje c en la dirección del campo magnético.





II. HIPÓTESIS





II. HIPÓTESIS

Se ha observado que la imposición de una corriente eléctrica afecta la cristalización de proteínas, por lo tanto, el estudio del campo eléctrico generado por múltiples electrodos bajo la imposición de corriente y potencial podría aumentar este efecto y sentarían las bases para un nuevo método de cristalización bajo imposición de un campo eléctrico.





III. OBJETIVOS





III. OBJETIVOS

- III.1** Diseñar y fabricar celdas de cristalización con diferente disposición y número de electrodos.

- III.2** Determinar que tipo de celda favorece la cristalización de lisozima, bajo la imposición de corriente eléctrica.

- III.3** Realizar estudios electroquímicos que nos permitan entender el fenómeno de la electromigración para favorecer la cristalización de lisozima.

- III.4** Extrapolar los resultados obtenidos a otro tipo de proteína, como lo es la metaloenzima catalasa.

- III.5** Proponer una mejora a los actuales métodos de cristalización de proteínas.





IV. ANTECEDENTES





IV. ANTECEDENTES

IV.1 Proteínas

Las proteínas son muy importantes para los organismos vivos, ya que pueden servir como transportadores de vitaminas, oxígeno y dióxido de carbono; además llevan a cabo actividades estructurales, cinéticas, catalíticas y de señalización (Figura 1).

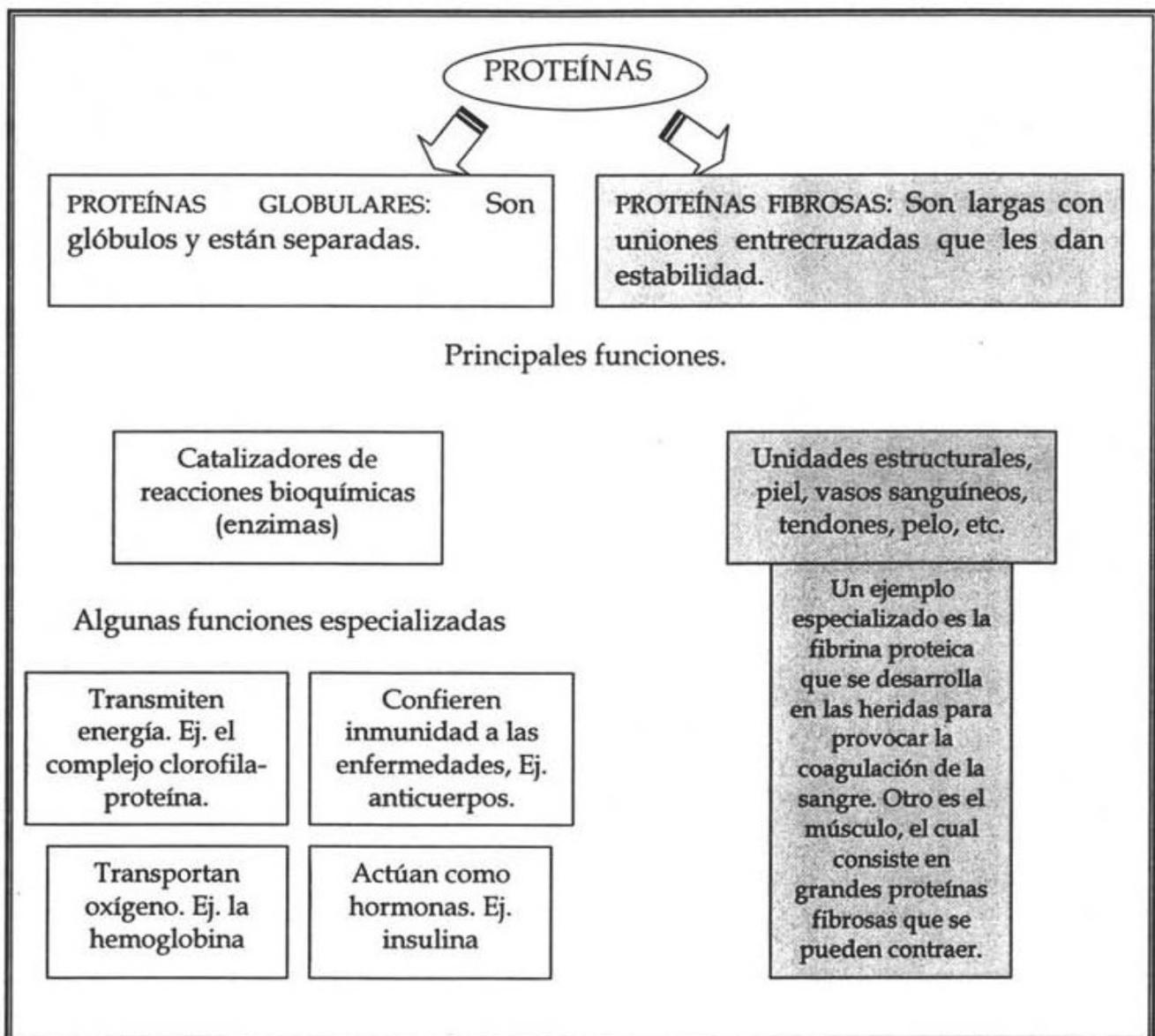


Figura 1: Funciones de las proteínas.¹⁰





Las proteínas están constituidas fundamentalmente por cadenas de aminoácidos y, ocasionalmente, por grupos prostéticos. Cada proteína se caracteriza por una única secuencia elemental de aminoácidos denominada estructura primaria. A la estructura resultante de la interacción de los aminoácidos por medio de puentes de hidrógeno se le conoce como estructura secundaria y, en ocasiones, cuando estas estructuras interaccionan entre sí mediante sus grupos R,[†] se forma la llamada estructura terciaria. Finalmente existen proteínas que constan de varias subunidades proteicas unidas por enlaces débiles, a esta conformación espacial se le denomina estructura cuaternaria.¹¹

No existe un sistema universal para clasificar a las proteínas, sin embargo estas pueden clasificarse con base en su solubilidad, forma, función biológica, estructura tridimensional o de acuerdo al sistema especializado al que pertenece.

IV.1.1 Lisozima

La lisozima es una proteína constituida por una cadena de 129 aminoácidos[‡] (14.6 kDa[§]) y puesto que no tiene coenzima o ion metálico, su actividad biológica, especificidad y estructura tridimensional (Figura 2a) están determinadas únicamente por los aminoácidos.

[†] Se les conoce como grupos R a los grupos laterales del aminoácido que se encuentran libres después del enlace peptídico.

[‡] La lisozima que se extrae de la clara de huevo de gallina, se ha cristalizado y se sabe que posee 129 aminoácidos en su estructura primaria, los cuales son:

```
1 kvygrcelaa amkrlgldny rgyslgnwvc aakfesnfnt hatnrntdgs tdygilqins
61 rwwcndgrtp gsknlcnipc sallssdita svncakkias ggngmnavva wrnrckgtvd
121 hawirgcrf
```

[§] 1 Da (Dalton) es la unidad de masa más pequeña usada para expresar masas atómicas y masas moleculares. Equivale a una doceava parte de la masa del núcleo del isótopo más abundante del carbono: el ¹²C, corresponde aproximadamente con la masa de un protón (o un átomo de hidrógeno) y es igual a 1.6604×10^{-24} g.





Esta proteína tiene cuatro enlaces disulfuro, los cuales provocan que su forma sea pseudo helicoidal ($30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}$). Aproximadamente un 40% de hélice alfa, un 12 % de estructura beta y el resto son regiones de enrollamiento al azar (Figura 2b).¹² La proteína lleva una hendidura central profunda, la cual alberga un sitio catalítico con seis subunidades que enlaza varios sustratos o inhibidores.¹³

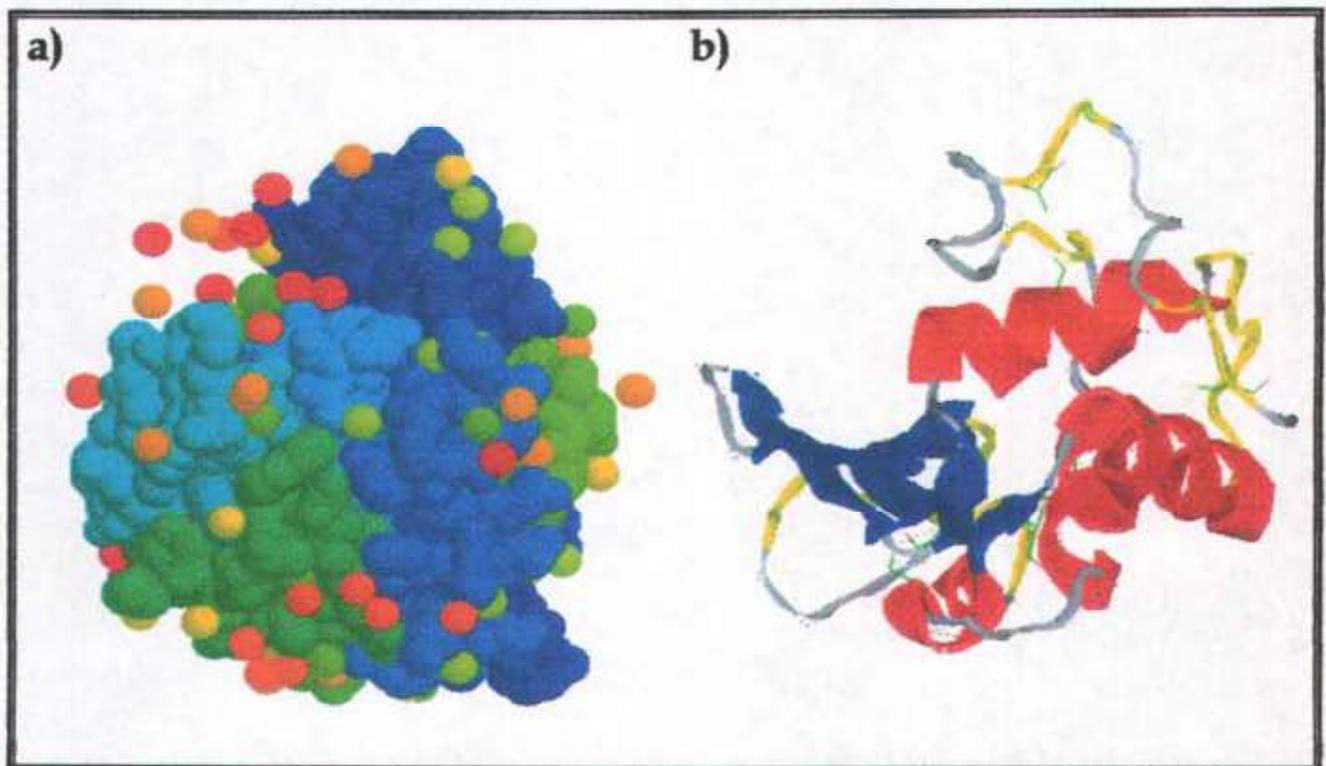


Figura 2: a) Estructura tridimensional de la lisozima.¹⁴ b) Estructura de lisozima especificando los puentes disulfuro (amarillo), las hélices α (rojo) y las laminas β (azul).

La lisozima se encuentra en las lágrimas, moco nasal, flema, tejidos, secreciones gástricas, leche y clara de huevo. Su actividad consiste en catalizar la hidrólisis de las ligaduras β -1,4 del ácido N-acetilneuramínico de los proteoglicanos y glucosaminoglicanos. En las lágrimas y moco nasal se encarga de destruir las paredes celulares, mediante la hidrólisis de polisacáridos, de muchas bacterias grampositivas transportadas por el aire.





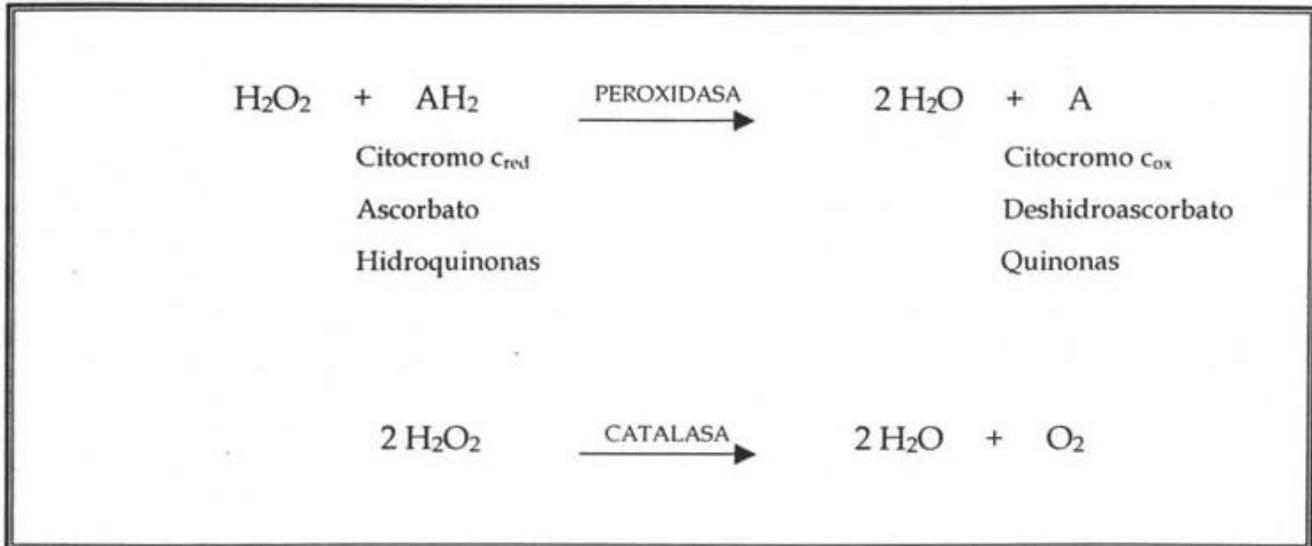
Puesto que la estructura y funcionamiento de la lisozima son bien conocidas (principalmente la de clara de huevo de gallina), es una de las proteínas más ampliamente estudiadas y utilizadas para la investigación. Esta molécula ha sido empleada como modelo para estudios de cristalización de macromoléculas, debido a que es una proteína de bajo peso molecular y a que sus condiciones de cristalización son bien conocidas. Normalmente cuando se emplea NaCl (0.68 M) y pH 4.5 a una temperatura debajo de 30°C la lisozima cristaliza en un sistema tetragonal. Por encima de este valor de temperatura, prevalece la fase cristalina ortorrómbica.¹⁵ Otras formas de cristalización dependen de los iones presentes durante la misma.¹⁶

Por otro lado la lisozima es una proteína interesante para su investigación electroquímica, ya que se ha mostrado que es capaz de transferir electrones y protones, gracias a las moléculas de agua que la mantienen hidratada y que forman redes de puentes de hidrógeno a su alrededor.¹⁷

IV.1.2 Catalasa

La catalasa es una hemoproteína que contiene 4 grupos hemo, posee actividad peroxidásica, es decir puede reducir peróxidos usando donadores de electrones. Además es capaz de usar una molécula de H₂O₂ como sustrato donador de electrones y otra molécula de H₂O₂ como oxidante o aceptor de electrones (Esquema 1). En la mayor parte de las condiciones *in vivo*, la actividad peroxidásica de la catalasa parece ser favorecida.





Esquema 1: Reacciones que puede llevar a cabo la catalasa.

La catalasa se encuentra en sangre, médula ósea, mucosa, riñón e hígado. Su función es la destrucción del peróxido de hidrógeno formado por la acción de las deshidrogenasas. Los microcuerpos o peroxisomas se encuentran en numerosos tejidos incluyendo el hígado. En ellos abundan las oxidasas y catalasas, lo cual sugiere que puede haber alguna ventaja biológica al agrupar a las enzimas que producen H_2O_2 con la enzima que lo destruye.¹³

IV.2 Cristalización de Proteínas - Cristalogénesis

En la actualidad la cristalización de proteínas se ha convertido en el punto clave de los estudios de biología molecular, de la física y de la química de las proteínas e incluso para obtener parámetros cinéticos. Esto debido a que dichos estudios requieren de las estructuras tridimensionales de las proteínas, las cuales han sido determinadas en un 80% gracias a la obtención de cristales de alta calidad, aptos para la difracción de rayos X.¹





Sin embargo obtener los cristales de proteína no es una tarea sencilla, ya que se requiere unir las técnicas clásicas de cristalización para moléculas pequeñas con las ventajas actuales de la biología molecular. Esta unión ha provocado el surgimiento de una nueva ciencia llamada cristalogénesis, la cual se encarga de estudiar la fisicoquímica del crecimiento de cristales de moléculas de alto peso molecular y de la búsqueda de mejores condiciones para su cristalización.

Es importante mencionar que no todos los aspectos fisicoquímicos empleados en la cristalización de moléculas pequeñas pueden ser utilizados para cristalizar macromoléculas biológicas, debido principalmente a las diferencias existentes en sus tipos de enlaces y su reactividad química. El estudio fisicoquímico de proteínas es más complicado y requiere de técnicas especiales, la Tabla 1 resume las principales diferencias entre la cristalización de moléculas pequeñas y la de macromoléculas biológicas.

Tabla 1: Similitudes y diferencias entre la cristalización de macromoléculas y compuestos de bajo peso molecular. Tabla extraída del libro "De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas", con permiso de dos de sus autores.¹⁸

Similitudes
en la cristalización de macromoléculas y compuestos de bajo peso molecular.

1. Obedecen las mismas leyes fundamentales de la termodinámica.
 2. Pertenecen a la misma clase cristalina.
 3. Las velocidades de crecimiento cristalino, varían con las condiciones experimentales.
 4. La sobresaturación es la fuerza motriz para la nucleación.
 5. Los cristales tienen morfologías (hábitos) determinados por estructuras moleculares o atómicas y por las condiciones de crecimiento cristalino.
 6. Los hábitos o morfologías pueden ser modificados variando las condiciones y/o impurezas o cambios en la estructura cristalina (polimorfismo).
-





Diferencias
en la cristalización de macromoléculas y compuestos de bajo peso molecular.

	Moléculas pequeñas	Proteínas
1. Tamaño de cristal	De centímetros a metros	Milímetros
2. Tipo de enlace	Todos los tipos y mezclas	Molecular y puentes de hidrógeno
3. Efecto de la carga electrostática	Rara vez observado	Importante
4. Degradación de tipo biológico	No observado en general	Es importante
5. Resolución estructural (morfología y tamaño)	Compleja	Muy compleja
6. Contenido de agua libre	Como disolvente atrapado	Forma parte de la estructura.

La cristalización involucra principalmente los siguientes pasos:

- 1. La formación del núcleo:** implica el ordenamiento y agrupamiento en centros discretos de las partículas estructurales como átomos, iones, moléculas o macromoléculas que sirven de "semilla" para la formación del cristal. Esta etapa se da cuando se alcanza la sobresaturación (punto B, Figura 3) y puede llevarse a cabo sobre partículas de su misma especie (nucleación homogénea) o sobre una partícula de impureza o una superficie que actúe como centro de nucleación (nucleación heterogénea).
- 2. El crecimiento del núcleo:** Esta es la etapa de transición en la cual el núcleo aumenta su tamaño para formar el cristal, debe llevarse a cabo a una velocidad constante y a una temperatura controlada para obtener un cristal de alta calidad. Durante esta trayectoria se pasa de la sobresaturación al equilibrio, (trayectoria del punto B al punto C, Figura 3).





3. **La obtención del cristal:** En esta etapa el cristal llega a su tamaño final (punto C, Figura 3). Si el proceso de cristalización se llevó a cabo adecuadamente se obtienen cristales de buena calidad, aptos para caracterizar su estructura tridimensional por difracción de rayos X. Un cristal de buena calidad, además de ser de buen tamaño, debe tener sus moléculas igualmente orientadas respecto al rayo incidente. Esto quiere decir que la estructura interna del cristal debe tener el menor número de defectos o impurezas, para que las moléculas sean capaces de difractar los rayos X y proporcionar patrones de difracción con alta resolución que puedan caracterizarse.

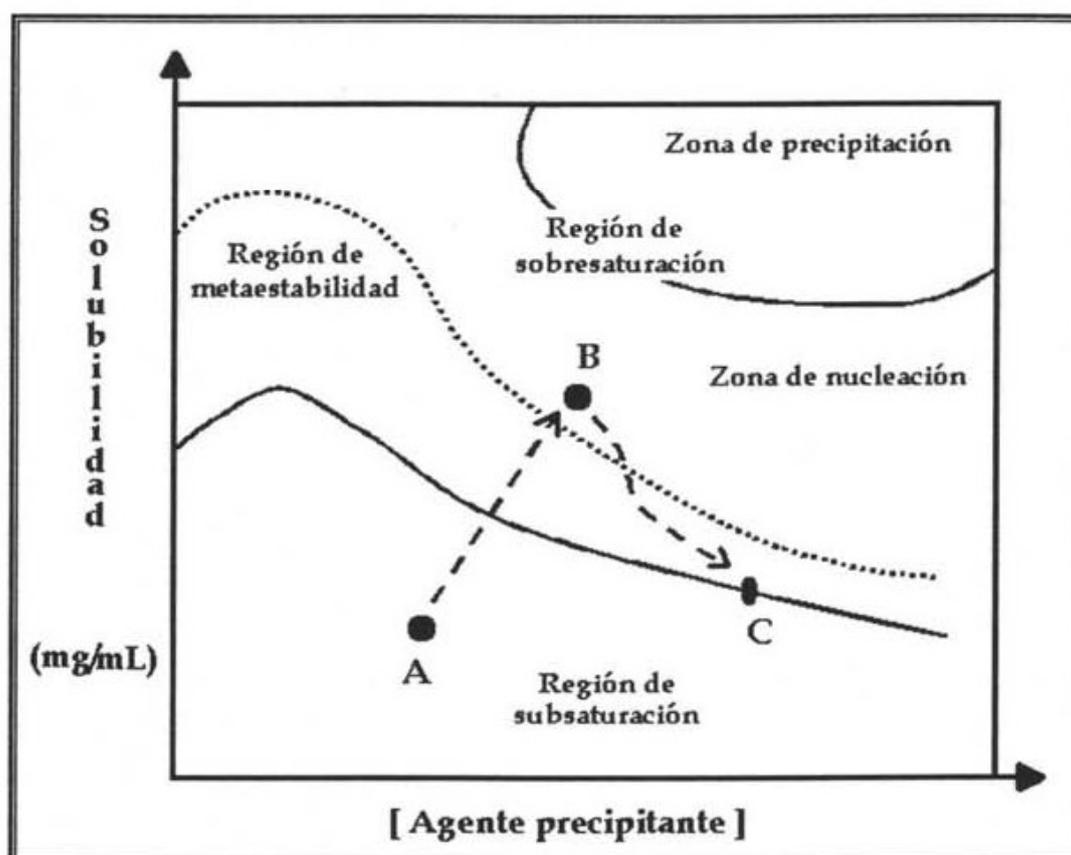


Figura 3: Gráfico de Ostwald-Miers: este gráfico muestra el camino de la cristalización de una macromolécula biológica, comenzando en una concentración de subsaturación (punto A) para posteriormente alcanzar una sobresaturación (punto B) donde se produce la nucleación, y finalmente se tiende al equilibrio en donde se obtienen los cristales (punto C). Gráfica extraída del libro "De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas",¹⁸ con autorización de dos de sus autores.





IV.2.1 Factores que afectan la cristalización

Como se explicó anteriormente el proceso de cristalización de una macromolécula implica llevar a cabo la disminución de la solubilidad a una velocidad lenta y constante en un tiempo adecuado. Así la cristalización de las proteínas debe entenderse en dos partes: a) los aspectos termodinámicos relacionados con la solubilidad de la proteína y b) los aspectos cinéticos, relacionados con el control de la nucleación y el crecimiento del cristal.

Para poder analizar la solubilidad de una proteína se requiere del disolvente adecuado, elegirlo implica la consideración de los siguientes aspectos: 1) debe ser capaz de disolver a nuestra proteína sin producirle alteraciones estructurales y 2) la capacidad de disolver la proteína debe durar largos periodos de tiempo, es decir, que sea estable en tiempos prolongados.

Una vez elegido el disolvente apto para la cristalización, se lleva al sistema a un grado de sobresaturación, mediante variaciones en la concentración de proteína, el pH, la fuerza iónica, la constante dieléctrica, la temperatura o bien variaciones en la concentración del agente precipitante.

El **pH** influencía fuertemente la solubilidad de la proteína, debido a que al cambiar las propiedades ácido-base del medio, se modifican las interacciones de éste con la proteína, lo cual implica un cambio en la solubilidad. Las macromoléculas tienen un mínimo de solubilidad cuando el pH del medio se aproxima a su punto isoeléctrico.

Otro factor que modifica la solubilidad de las proteínas es la **concentración de sales**, y puede hacerlo de dos maneras, la primera consiste en aumentar la fuerza iónica para obtener un decremento exponencial en la solubilidad (salting-out) y en la segunda se disminuye la fuerza iónica para aumentar la solubilidad (salting-in).





Los **disolventes orgánicos** pueden precipitar a las proteínas ya que sustraen agua y disminuyen la constante dieléctrica del medio, sin embargo pueden modificar la estructura de la proteína, por lo cual es recomendable evitarlos. Otro tipo de agentes precipitantes son los **polietilenglicoles (PEG)**, utilizados en diferentes pesos moleculares (desde 0.2 hasta 20 kDa), cuentan con propiedades de exclusión de disolvente, reestructurándolo y promoviendo una separación de fases. Estos polímeros, a pesar de ser compuestos orgánicos no afecta la estructura de la proteína por lo que son ampliamente usados.

La cuantificación de la influencia de los parámetros de cristalización puede evaluarse a través de un diagrama de solubilidad. Este diagrama debe contener las siguientes zonas (Figura 4):

"1.- La curva de saturación, llamada comúnmente "curva de equilibrio", divide la región de subsaturación de la región de sobresaturación, ésta tiene una naturaleza termodinámica."

"2.- La región bajo la curva de saturación, la solución aquí es subsaturada y la macromolécula jamás cristalizará."

"3.- La región arriba de la curva de solubilidad, donde la concentración de la proteína es más alta que la concentración de equilibrio, para una concentración dada de sal, a partir de aquí la descripción de fenómenos de agregación tiene que ver con aspectos cinéticos relacionados con la nucleación y crecimiento de cristales. Ésta se denomina región de sobresaturación." Datos extraídos del libro "De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas,"¹⁸ con autorización de dos de sus autores.



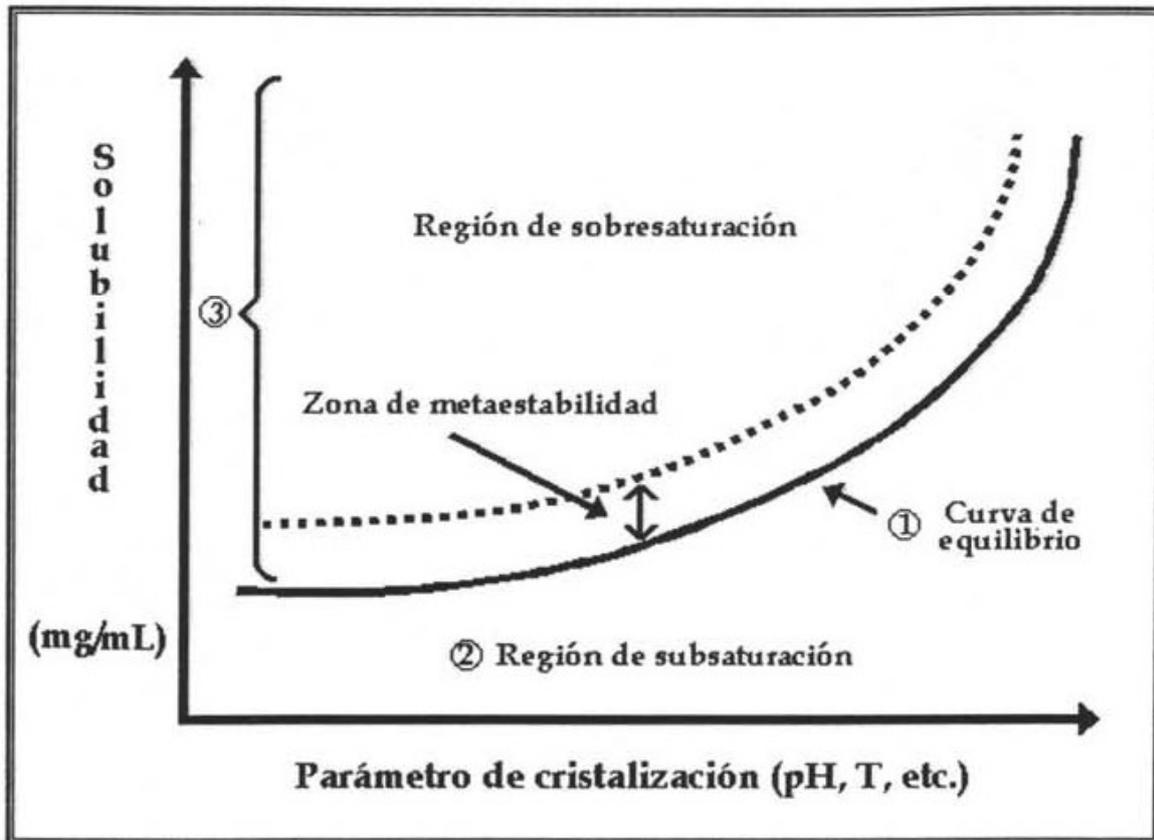


Figura 4: Zonas de la curva de solubilidad para una proteína. 1) La curva de saturación o equilibrio, 2) La región de subsaturación y 3) La región sobresaturada. Gráfica extraída del libro "De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas,"¹⁸ con autorización de dos de sus autores.

En general el crecimiento de un cristal debe llevarse a cabo lentamente, de tal manera que un arreglo regular de iones, moléculas o macromoléculas permita la obtención de un cristal de excelente calidad. En el ordenamiento de la estructura periódica tridimensional, los procesos importantes son fundamentalmente dos. El primero de ellos es el transporte de las moléculas hacia las caras del cristal por difusión o convección, y el segundo es la incorporación de esas moléculas a aquellas posiciones sobre la superficie del cristal que mejor se adaptan al orden periódico tridimensional. Si queremos crear una estructura periódica perfecta necesitamos suministrar las unidades de crecimiento a una velocidad igual o menor a la necesaria para que éstas se coloquen en la posición correcta.¹⁹ Para asegurar que el transporte de las moléculas





hacia el cristal sea lo más lento posible, es conveniente utilizar medios puramente difusivos. La difusión es el medio de transporte de masa más lento y consiste en un flujo direccional que se produce a escala microscópica dentro de un gradiente de concentración.

Para hacer que los procesos difusivos dominen el transporte de masa de tal forma que se limite lo más posible el transporte convectivo, mucho más rápido y caótico, existen dos posibilidades:

1. Minimizar el efecto de las fuerzas gravitatorias, incrementando la intensidad de otro tipo de fuerzas que no direccionen la cristalización en un sólo sentido, por ejemplo las fuerzas capilares. Para lo cual se confina la disolución en volúmenes pequeños dentro de:
 - 1a. capilares.¹⁹
 - 1b. geles, puesto que el entramado sólido de un gel, que encierra un sistema poroso relleno de un fluido, permite la difusión de reactivos a la vez que reduce enormemente el efecto de las fuerzas gravitacionales sobre la disolución.¹⁹
2. Crecer los cristales en microgravedad, una tecnología costosa que aún tiene un cierto número de problemas a resolver, pero que obviamente es el escenario ideal para realizar experimentos en medios difusivos tridimensionales.

La búsqueda de las condiciones óptimas para un experimento de cristalización, es un trabajo complicado y requiere la realización de cientos o miles de experimentos, dependiendo de la técnica realizada.





IV.2.2 Métodos de cristalización

Para poder obtener los cristales se utilizan diferentes métodos de cristalización, entre ellos se tienen el crecimiento de cristales a partir de disoluciones, fundidos, de fase vapor o en estado sólido. De éstos, los métodos de cristalización en solución han sido los más utilizados en la cristalización de proteínas, debido principalmente a que estas macromoléculas son muy sensibles y no todas son termoestables.

Los métodos de cristalización en disolución pueden ser microdiálisis o macrodiálisis, en ambos métodos se utiliza una membrana capaz de generar la sobresaturación necesaria para la cristalización, es decir, una membrana que impida que la proteína salga y a la vez deje entrar al agente precipitante.

Los métodos de difusión en fase vapor son los conocidos como métodos clásicos, en dichos métodos la sobresaturación se alcanza por secado o concentración de una gota mediante un agente precipitante. Dependiendo de cómo es colocada la gota para que cristalice la proteína, se clasifican en: Método de la gota colgante, Método de la gota sedente y Método de la gota en sándwich.

Los tres métodos clásicos de cristalización siguen el mismo principio, el cual ilustraremos con el método de la gota colgante (Figura 5), donde a través de la extracción del agua, la gota irá incrementando la concentración de la proteína y los cristales de la misma aparecerán dentro de la gota de cristalización.



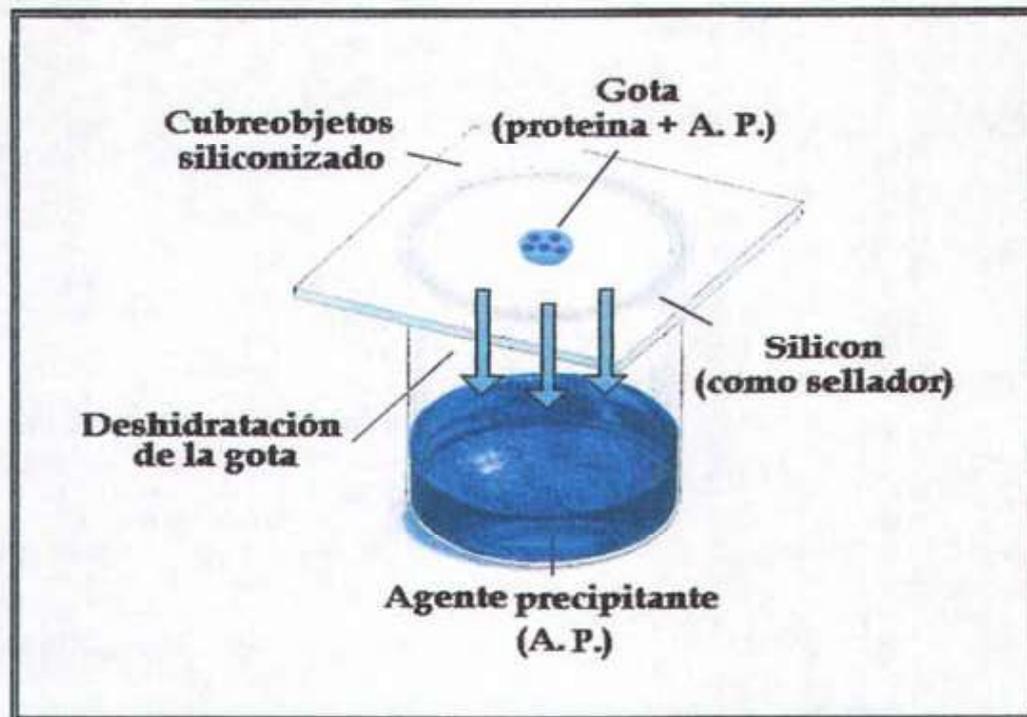


Figura 5: Método de la gota colgante. En este método la nucleación ocurre cuando aumenta la concentración de la proteína debido a la deshidratación de la gota, la cual ocurre por diferencia de concentraciones del agente precipitante en la gota (menor) y en la disolución (mayor).

Finalmente el método más sencillo para cristalizar una proteína consiste en mezclar todos los componentes de la cristalización (la proteína, el agente precipitante y el disolvente) en condiciones de metaestabilidad, para posteriormente dejarlos reposar y obtener los cristales. Este método de cristalización se conoce como el método batch.

Sin embargo, para obtener cristales de proteína con alta calidad es necesario desarrollar nuevos métodos de crecimiento, que permitan eficientar el tiempo y el tamaño del cristal, sin disminuir la calidad del mismo. Actualmente se han realizado estudios de algunos parámetros fisicoquímicos que controlan la cristalización de proteínas, entre ellos se encuentran estudios del campo magnético,^{2,3} el electroenfoque⁴ y la aplicación de un campo eléctrico externo.⁵





Al aplicar una corriente eléctrica directamente a una disolución se genera un campo eléctrico interno,** cuyo efecto en la cristalización de proteínas ha sido estudiado recientemente. Los primeros estudios de este campo fueron realizados en una celda, donde los electrodos se encontraban paralelos, encontrando que la distancia óptima para la cristalización es de 5 mm. En este estudio se observa la disminución del tiempo de cristalización y la direccionalidad de ésta hacia el cátodo (electrodo negativo).⁶ Cuando se combina el efecto de un campo eléctrico interno y uno magnético se logra aumentar la orientación y la homogeneidad en el tamaño del cristal.⁷ Finalmente se aplicó un campo eléctrico interno al método de cristalización por acupuntura en gel, donde además de controlar la nucleación de los cristales hacia el ánodo, se logró disminuir considerablemente el tiempo de cristalización (cristales obtenidos en 24 h para la lisozima en vez de 48 h, y para la taumatina en 5 días en vez de 12 días).⁸

IV.3 Electroquímica

La electroquímica es la disciplina científica que estudia las interacciones entre los fenómenos eléctricos y químicos. Es decir, se encarga de analizar las propiedades eléctricas (voltaje, corriente o resistencia, o la combinación de éstas) y su relación con los sistemas químicos.²⁰

Los fenómenos electroquímicos más ampliamente estudiados y utilizados son los que se llevan a cabo en disolución. En ellos las interacciones corriente eléctrica-disolución van más allá de una simple descomposición de la disolución por efecto de la corriente eléctrica. Estos fenómenos requieren de un flujo de cargas en disolución, es decir, es imprescindible la presencia de elementos portadores de carga eléctrica; denominados

** Se han reportado otro tipo de experimentos, en los cuales, el campo eléctrico se aplica fuera de la celda de cristalización. En este tipo de experimentos al campo generado se le conoce como campo eléctrico externo.





iones. Estas partículas “llevan” a los electrones liberados en el cátodo (electrodo negativo, Figura 6) hacia el ánodo (electrodo positivo, Figura 6) a través de la disolución. Sin embargo, para que la conducción eléctrica implique cambios fundamentales de tipo físico-químico en el seno de la disolución, se requiere de especies electroactivas, las cuales son verdaderos aceptores de electrones en el cátodo y donadores de electrones en el ánodo (actuando simultáneamente).

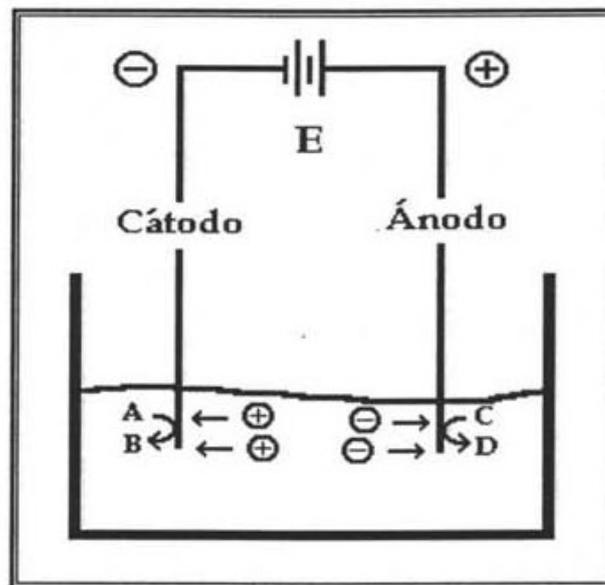


Figura 6: Disolución electrolítica con dos electrodos (cátodo y ánodo), y especies electroactivas A y C.

En general, este fenómeno presenta una serie de etapas caracterizadas por:

- Los iones en disolución y las moléculas polares, se orientan por atracción electrostática como consecuencia de los potenciales adquiridos por el cátodo y el ánodo.
- Los iones, una vez orientados, fluyen hacia los electrodos a una velocidad particular y con una dinámica característica de las circunstancias (Migración Iónica).
- En la tercera etapa, se presentan dos fenómenos:





1. Los iones rodean al electrodo, con el fin de interactuar con él, pero cuando la velocidad de difusión es mayor que la velocidad con que los iones se transforman en los electrodos, se manifiesta una acumulación de cargas contrarias a la polaridad del electrodo, desvirtuando su potencial. A este fenómeno se le denomina POLARIZACIÓN.
2. Por el contrario, si la velocidad de difusión está en equilibrio con la transformación al electrodo, entonces tenemos reacción electroquímica.

En el cátodo, la reducción: $A^+ + e^- \rightarrow B$

En el ánodo, la oxidación: $C - e^- \rightarrow D$

d) Ahora, tanto las especies reducidas (B) como las oxidadas (D) tienden a reaccionar por diversas rutas entre las que podemos mencionar:

1. Fijándose al electrodo (electrodeposición)
2. Separándose del electrodo por difusión y evolución de gases
3. Reaccionando químicamente para producir un nuevo compuesto
4. Reaccionando con el electrodo, formando compuestos poco deseables (corrosión).²¹

IV.3.1 Tipo de celdas electroquímicas

Una celda electroquímica es el montaje experimental donde se realiza la reacción electroquímica. Si la reacción es espontánea liberará energía, la cual puede ser transformada en electricidad por una celda galvánica. Por el contrario, si la reacción no es espontánea necesita energía eléctrica para producirse; este proceso se llama electrólisis, y se lleva a cabo en una celda electrolítica.²² La celda electrolítica más sencilla que permite controlar el potencial consiste en dos electrodos metálicos introducidos en una disolución electrolítica, o en dos electrolitos diferentes en contacto iónico, por ejemplo, por medio de un puente salino (Figura 7a). El electrodo





donde tiene lugar la reacción en estudio se llama electrodo de trabajo y está acoplado a un electrodo no polarizable, denominado electrodo auxiliar, que actúa como electrodo de referencia. Sin embargo a densidades de corriente altas aparece una sobretensión que no permite el empleo del electrodo auxiliar como electrodo de referencia. Por esta razón y con objeto de que las medidas no sean alteradas por otros fenómenos, es más conveniente utilizar como electrodo de referencia un tercer electrodo.

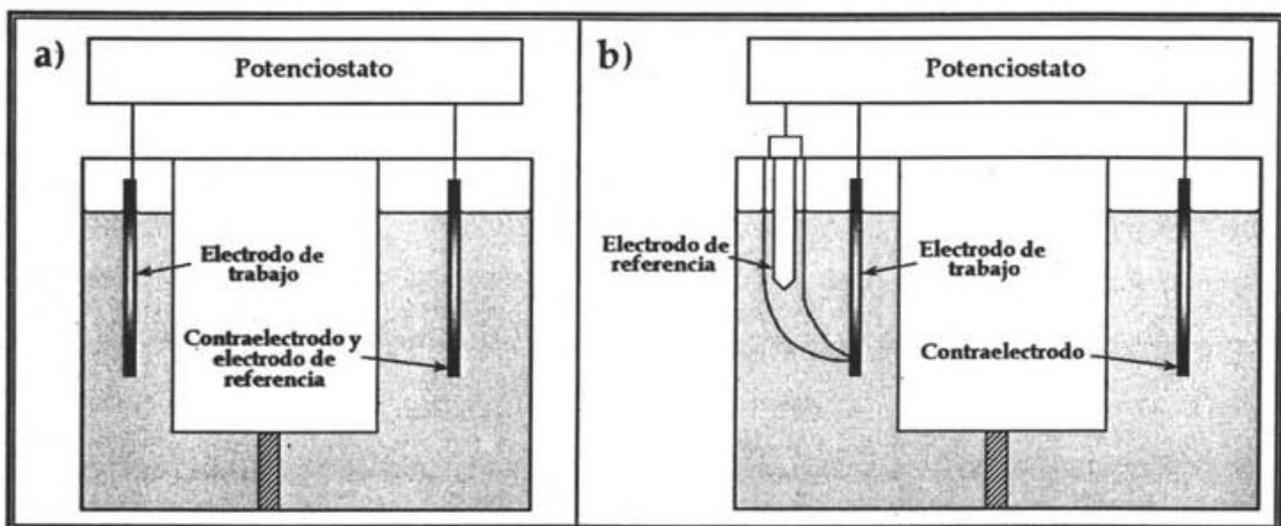


Figura 7: Celda electroquímica potencioestática, a) con un arreglo de dos electrodos y b) con un arreglo de tres electrodos.

En las celdas de tres electrodos (Figura 7b), éstos se conectan de tal manera que el electrodo de referencia se encuentra en un circuito de alta impedancia por lo que no deja pasar una cantidad apreciable de corriente. Las características más importantes de los electrodos se mencionan a continuación.

1. El electrodo de trabajo, es donde ocurre el proceso electroquímico de interés, puede ser el ánodo o el cátodo, dependiendo del valor de potencial aplicado. Debido a la invariancia en potencial del electrodo de referencia, cualquier cambio en el potencial de la celda se deberá a cambios en el potencial de este electrodo.





Tenemos distintos tipos, en función del material: Hg, sólidos (Au, Pt, Ag, pasta de carbono, grafito, carbono vitrificado) y en función del tamaño: macroelectrodos, microelectrodos y ultramicroelectrodos.

2. El electrodo de referencia: Electrodo que mantiene un potencial constante y no sufre cambios químicos entre uno y otro experimento. Un buen electrodo de referencia deberá ser estable con respecto al tiempo y temperatura, además de que su potencial no debe experimentar fuertes cambios cuando eventualmente una pequeña corriente eléctrica pase por el electrodo. Pueden ser acuosos (Ag/AgCl, KCl (3M), Calomel) y no acuosos (Ag/AgNO₃ 0.01M, acetonitrilo (ACN)).
3. El electrodo auxiliar (contraelectrodo): El electrodo que cierra el circuito eléctrico de la celda se conoce normalmente como el electrodo auxiliar, de polaridad opuesta al electrodo de trabajo. Puede ser de Pt, carbono vitrificado, acero inoxidable o grafito.

Dentro de las variables más importantes de la disolución que pueden afectar el comportamiento de una celda electroquímica están: la concentración de las especies electroactivas, el pH y el disolvente.

IV.3.2 Técnicas de electroanálisis.

Las técnicas electroanalíticas se basan en la imposición de una perturbación al sistema de estudio y la medida de la respuesta obtenida, y se diferencian por sus características operacionales.

Existen diversos tipos de métodos de análisis para obtener la señal de respuesta.

Entre ellos están:²³





Potenciométricos de corriente nula	El objetivo de un experimento potenciométrico es la medición de la diferencia de potencial, E_{celda} , entre dos electrodos cuando no fluye corriente alguna. Es interesante considerar cómo esta diferencia se puede descomponer en los voltajes que constituyen cada parte de la celda.
Galvanostáticos - Galvanodinámicos	Cuando se aplica a la celda una intensidad de corriente dada, registrando los cambios en potencial.
Potenciostáticos - Potenciodinámicos	Cuando al sistema se le aplica un potencial externo conocido, la señal analítica es la intensidad de corriente resultante. Dentro de esta clase se encuentran las técnicas voltamperométricas

En general, estos métodos implican el control de una de las propiedades eléctricas y la medición de una o varias de las propiedades restantes, de tal manera que directa o indirectamente se establezca una relación entre ellas.

IV.3.2.1 Voltamperometría.

El método denominado voltamperometría o voltamperometría de barrido lineal, consiste en imponer en el electrodo una variación lineal de potencial y determinar la corriente correspondiente. En estos experimentos se obtienen directamente las curvas intensidad de corriente - potencial, las cuales aportan una primera información





acerca del proceso de electrodo en estudio, permitiendo conocer la reversibilidad del mismo y examinar las etapas en que se desarrolla.

Las distintas técnicas voltamperométricas que se utilizan, se diferencian por la forma de aplicar el potencial al electrodo de trabajo, la más usual es la voltamperometría cíclica de barrido triangular (Figura 8).²⁴ En ésta, se aplica al electrodo una variación lineal cíclica de potencial, de modo que el potencial vuelve a su valor original. Esta técnica tiene gran interés por sus numerosas aplicaciones y es muy útil para estudiar los productos de la reacción y detectar la presencia de intermediarios.²⁵

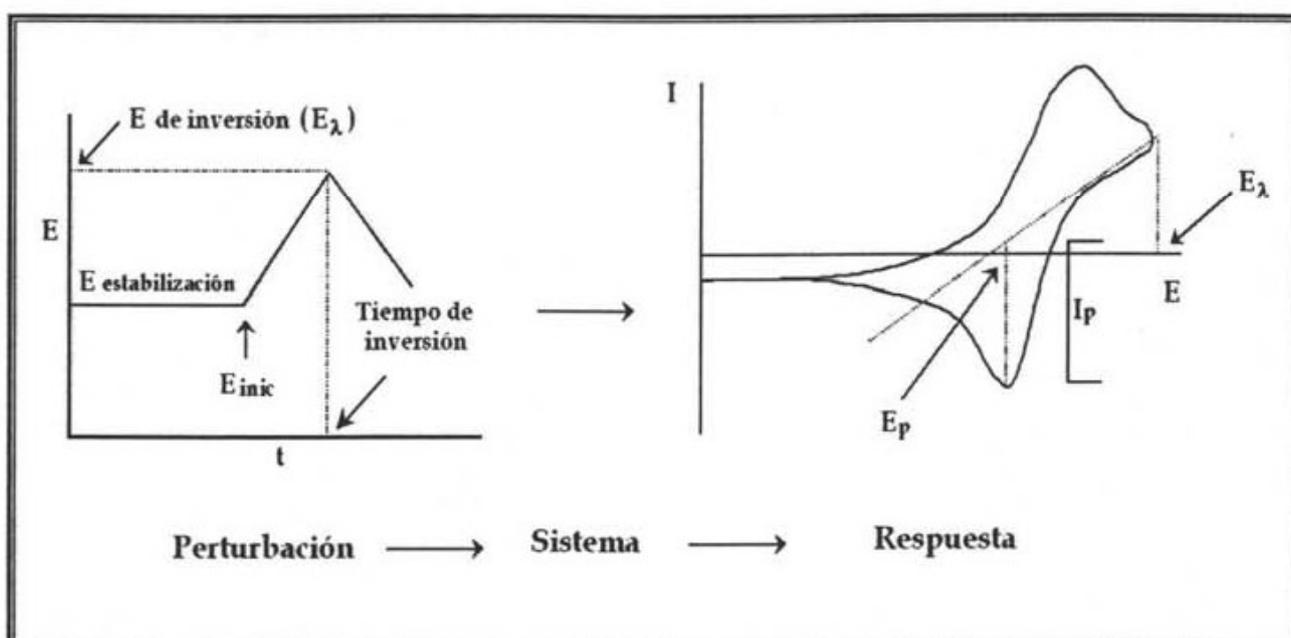


Figura 8: Programa de perturbación empleado en voltamperometría cíclica y su respuesta tipo.

El electrodo de trabajo empleado en la voltamperometría, sólido o de Hg, se usa inmóvil o con gota suspendida en el caso del Hg, para evitar la contribución a la corriente debida a la convección. Para evitar una posible contribución a la corriente por la presencia de fenómenos de migración se usa un electrolito fuerte suficientemente concentrado. El transporte de masa de la especie electroactiva estará





entonces únicamente controlado por la difusión.²⁶ Bajo estas condiciones se puede estudiar mejor el fenómeno electroquímico, ya que se eliminan variables para el análisis de las ecuaciones.

IV.3.2.2 Electrólisis a corriente controlada.

En el método de electrólisis a corriente controlada, la corriente se mantiene constante durante el transcurso de la reacción electroquímica. La cantidad total de carga eléctrica necesaria, para llevar a cabo dicha reacción, es determinada mediante la ley de Faraday. Esta ley postula que, "La cantidad de carga Q usada en una transformación electroquímica equivale a un Faraday de electricidad ($F=96\ 487$ C/mol) y es proporcional a la reacción de un equivalente en peso de sustancia W " y está dada por la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{WnF}{M}$$

Donde:

W = Peso en gramos de la sustancia a electrolizar

Q = La cantidad de Carga en Coulombs

M = Masa Molar del analito

n = Número de electrones requeridos por molécula en la reacción

F = Constante de Faraday (96 487 C/mol)

La determinación de la carga eléctrica, requerida para llevar a cabo una reacción electroquímica, permite conocer el tiempo total en el que dicha carga habrá circulado por el sistema, despejando el tiempo de la ley de Ampere ($Q = it$).

$$t = Q/i$$





Donde:

Q = La carga en Coulombs

i = Intensidad de corriente

t = Tiempo

La correlación entre la cantidad de electricidad consumida y el producto de la reacción puede ser convenientemente seguida por este método. Sin embargo el potencial del electrodo no se mantiene constante y por lo tanto no siempre es posible llevar a cabo este tipo de reacción selectivamente.²⁷ En este método, a medida que progresa la electrólisis en una reducción por ejemplo, aumenta la relación [Red]/[Ox], con lo que el potencial del cátodo se va haciendo más negativo. Este descenso de potencial puede dar lugar a la iniciación de otra reacción catódica (con frecuencia, reducción de iones hidrógeno).²⁸ Un ejemplo de este método es el depósito de metales cuyos potenciales de reducción son más positivos que el del hidrógeno.

IV.3.2.3 Electrólisis a potencial controlado

Coulombimetría a potencial controlado

Para llevar a cabo una electrólisis a potencial controlado, es necesario mantener un potencial constante en el electrodo de trabajo, durante el tiempo que dure la reacción. Este potencial se fija de acuerdo con la especie que nos interesa estudiar.

Cuando se fija el potencial y se mide la intensidad de la corriente, la técnica se llama coulombimetría a potencial controlado. La corriente disminuye conforme transcurre la reacción, a medida que se consume la especie electroactiva, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I_t = I_0 \exp(-kt)$$





Donde I_t e I_0 son las corrientes a los tiempos t y 0 , respectivamente, y k es una constante que depende de las características experimentales de la determinación. Si el proceso es controlado por difusión k se puede expresar como $k = \frac{AD}{V\delta}$.

De acuerdo con lo anterior podemos deducir que el tiempo necesario para una determinación depende del diseño de la celda (por la relación A/V , donde A es el área del electrodo y V el volumen de la disolución), del espesor de la capa de difusión (δ) y del coeficiente de difusión (D).²⁵

Los experimentos a potencial controlado, pueden incluso hacerse en un potencial en el cual no ocurren reacciones electroquímicas. Cuando el voltaje aplicado a una disolución electrolizable, no excede el potencial de despolarización, los fenómenos de oxido-reducción no se manifiestan. Sin embargo, en estas condiciones existe el paso de corriente por la disolución, debido a que circulan iones al ser atraídos por los electrodos.

Este fenómeno, en el que cuenta la resistencia de la disolución solamente en tanto se opone físicamente a este transporte de electrones, da por resultado una relación lineal entre la diferencia de potencial aplicada y la intensidad de corriente obtenida, en la que, la pendiente de la recta $i = m V$, resulta ser el recíproco de la resistencia de la disolución ($1/R$) y de donde se deduce que, entre mayor sea la conductividad eléctrica de la disolución, mayor será la pendiente de la recta.

Estas técnicas a potencial controlado son muy selectivas, ya que por medio del control de potencial, es posible eliminar o controlar todas las reacciones no deseadas (reacciones parásitas) que pudieran interferir durante la medición.





IV.3.2.4 Cronocoulombimetría

Recientemente las mediciones de corriente han sido remplazadas por mediciones de transferencia de carga durante la electrólisis a potencial constante. Este método ha sido llamado cronocoulombimetría

La cronocoulombimetría se rige por la ecuación de Cottrell integrada para el pulso directo e inverso de una especie electroactiva. La ecuación para el pulso directo es la siguiente:

$$Q = \frac{2n F D^{1/2} C^0 t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{dl} + nFA\Gamma_1$$

Donde:

Q = La cantidad de carga

n = Número de electrones requeridos por molécula en la reacción

F = Constante de Faraday (96 487 C/mol)

D = Coeficiente de difusión

C⁰ = Concentración inicial del analito

t = tiempo

Q_{dl}: es la carga utilizada en la doble capa

Γ₁: es el exceso superficial de las especies adsorbidas en el pulso directo

La cronocoulombimetría es particularmente usada en estudios de adsorción de sustancias electroactivas. Pero también se usa en estudios cinéticos sobre procesos y reacciones químicas acoplados con reacciones en el electrodo.





IV.3.3 Transporte de iones en solución.

Cuando un electrolito está sometido a diferencias de fuerzas mecánicas o de temperatura, a diferencias de potencial eléctrico o a diferencias de potencial químico, se producen fenómenos de transporte en la disolución. Este transporte puede tener lugar por convección, por migración o por difusión, según el parámetro que no sea uniforme en toda la disolución.

El fenómeno de transporte de materia por migración se produce siempre que una especie ionizada se encuentra en un campo eléctrico establecido entre dos electrodos (ánodo y cátodo), por lo que este modo de transporte debe llamarse en realidad electromigración, afectando únicamente a las sustancias si: 1) estas sustancias están en forma de iones en la disolución; 2) su número de transporte no es pequeño.

Por otra parte, la electromigración podría favorecer la electrólisis mediante la oxidación de aniones y la reducción de cationes. De cualquier forma, este modo de transporte es considerado como indeseable en química electroanalítica, y para desentenderse totalmente de él, lo que suele hacerse es rebajar extraordinariamente el número de transporte de la molécula de interés, haciéndolo prácticamente despreciable frente a la alta concentración de iones que se usan como electrolito soporte. En efecto, el número de transporte de un ión A en solución viene dado por la expresión:²⁹

$$t_A = \frac{\lambda_A Z_A C_A}{\sum (\lambda_i Z_i C_i)}$$

Donde λ es la conductividad equivalente del ión, Z su carga y C su concentración, siendo i el símbolo correspondiente a cualquier ión presente.

El fenómeno de transporte de materia por convección consiste en una homogenización de la concentración de la disolución. Esta homogenización es llevada a cabo de manera forzada, bien térmicamente o mecánicamente, agitando la





disolución o de otra forma que provoque movimientos de materia dentro de la misma hasta lograr una homogenización perfecta. La agitación de la disolución la homogeniza en lo que respecta a su concentración hasta las proximidades del electrodo.

Por último ha de considerarse el fenómeno de transporte por difusión, mediante el cual el soluto, y especialmente la sustancia electroactiva consumida o producida en el electrodo, difunde desde zonas de más alta concentración a las de menor concentración. Es un fenómeno natural que se presenta siempre en todo proceso electroquímico, incluso en los casos en que no existe transporte de materia por convección, por ejemplo, en los casos en que las disoluciones permanezcan rigurosamente inmóviles.³⁰ Este fenómeno es el determinante en muchas de las técnicas electroquímicas, aún en aquellas que están sujetas a la convección ya que es el que se manifiesta en la capa de la disolución más próxima al electrodo (capa de difusión).

Eventualmente la reacción electroquímica puede venir acompañada de otros procesos como reacciones químicas, fenómenos de adsorción, formación de nuevas fases, etc. Lo cual podría modificar el transporte de los iones.





V. PARTE EXPERIMENTAL





V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1 Instrumentación

- Los experimentos de corriente controlada (electrólisis) se realizaron en un Galvanostato VIMAR modelo FCC-17, el cual puede imponer corrientes dentro de un intervalo de $0.0002 \mu\text{A}$ a 10 mA . Se utilizó la celda y los electrodos descritos posteriormente, en la preparación de las celdas de cristalización.
- En el estudio de voltamperometría cíclica se utilizó un Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30 acoplado a una computadora mediante una interfase GPIB, la cual emplea un software de adquisición de datos GPES versión 4.9. Para algunos experimentos también se empleó un Potenciostato/Galvanostato EG&G Princeton Applied Research modelo 273A. La celda y los electrodos empleados se describen posteriormente, en la preparación de las celdas de cristalización.
- Los experimentos a potencial controlado se realizaron en un Potenciostato/Galvanostato EG&G Princeton Applied Research modelo 273A, utilizando la celda y los electrodos descritos posteriormente, en la preparación de las celdas de cristalización.
- La temperatura se controló empleando una placa hueca de metal construida *ad hoc* y acoplada a un recirculador de temperatura constante marca Cole Parmer modelo Polystat por el que circula la disolución refrigerante. En los experimentos realizados a 18°C hubo un doble control de temperatura, adicionalmente al ya mencionado, dichos experimentos se realizaron dentro de un cuarto frío que mantiene la temperatura constante.





- Las fotografías se obtuvieron por medio de un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SV11 adaptado a una cámara digital, usando el programa Axion Vision de Zeiss Co.
- La difracción de rayos X se realizó en un difractómetro con ánodo rotatorio y detector de placas RIGAKU II C.

V.2 Preparación de las celdas de cristalización

Basados en el modelo de celdas *ad hoc* propuesto por Moreno y Sazaki,⁶ fueron diseñadas varias celdas de cristalización con ciertas modificaciones. Estas celdas son cuadradas de 20mm por lado y 1mm de espesor (Figura 9) y fueron construidas con portaobjetos de vidrio separados por una base cuadrada y selladas con resinas epóxicas. Para la construcción de la base cuadrada de las celdas se probaron diferentes materiales, primero se emplearon tiras de teflón de 1mm de ancho de las cuales se recortaron 4 pedazos de 20mm para formar el cuadrado; pero finalmente como se requería de una gran cantidad de teflón, debido al número de celdas construidas para los diferentes estudios, se buscó un material más accesible como lo es el plástico de las tarjetas telefónicas. Este material también tiene un grosor de 1mm aproximadamente, es inerte y además se puede hacer el corte cuadrado de las celdas directamente sobre la tarjeta, lo cual evita el uso de las resinas epóxicas en las esquinas, haciendo más resistente la estructura de la celda.

Los electrodos utilizados fueron de alambre de platino (0.2mm de diámetro Alfa AESAR) y se aprisionaron de un lado de la celda por el separador de plástico y el portaobjetos, con 5mm inmersos dentro de la disolución (área aproximada = 6.4×10^{-2} cm²).



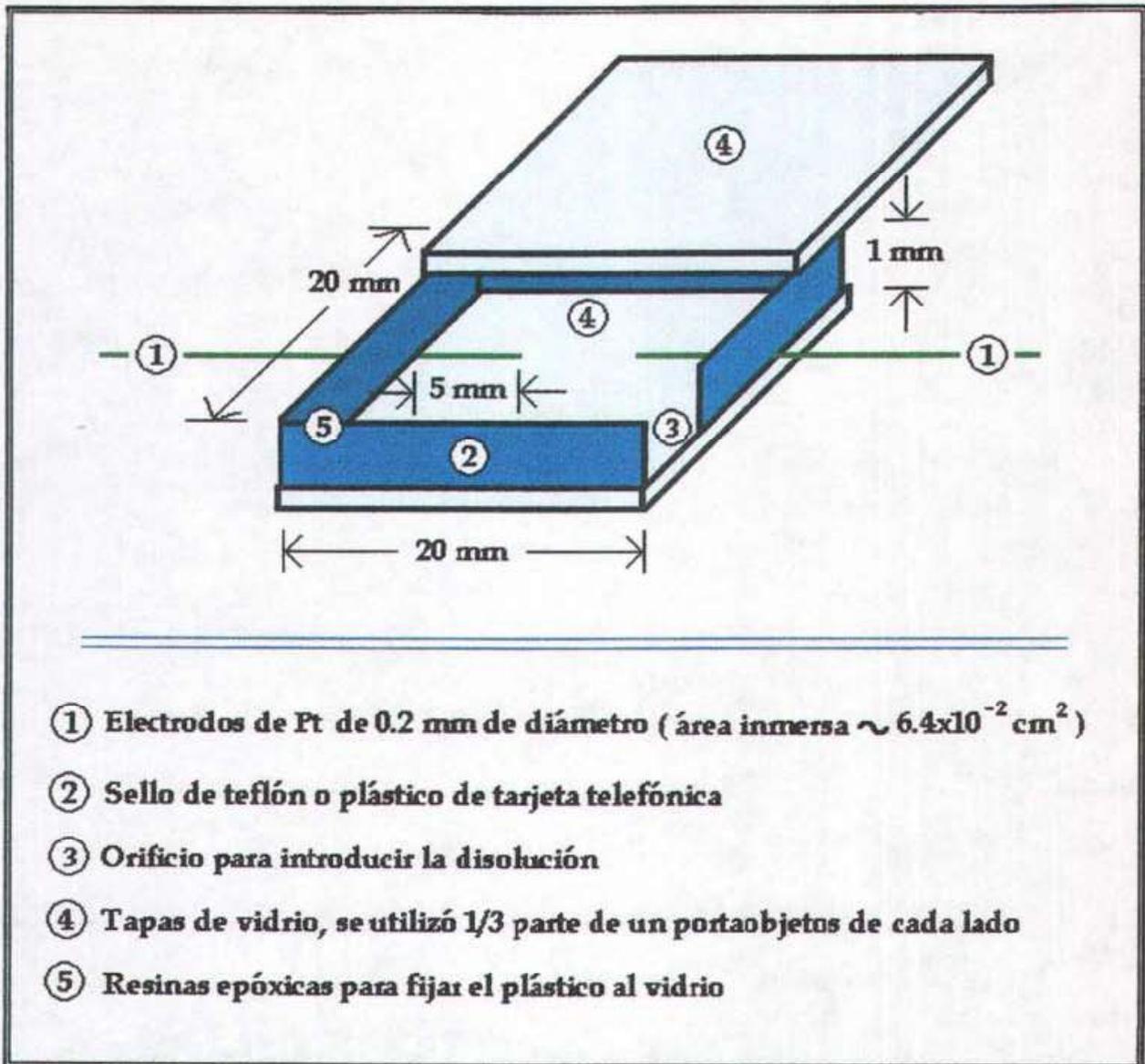


Figura 9: Celda de cristalización para la imposición de campo eléctrico.

Adicionalmente las celdas contaban con un orificio para introducir la disolución, este orificio se tapaba con un fragmento del mismo plástico y posteriormente se sellaba con silicón.

Algunas de las celdas construidas se reutilizaban en otro experimento, pero requerían de una limpieza profunda que incluía varios lavados con agua destilada y sonicación





durante 5 minutos como mínimo. Sin embargo después de 15 minutos de sonicación los electrodos se rompen, debido a que el alambre de platino es maleable y muy delgado (0.2 mm), por lo que posteriormente se decidió hacer para cada experimento una celda nueva.

V.2.1 Celdas para los experimentos a corriente controlada

Para los experimentos a corriente controlada se diseñaron cuatro diferentes tipos de celdas (Figura 10).

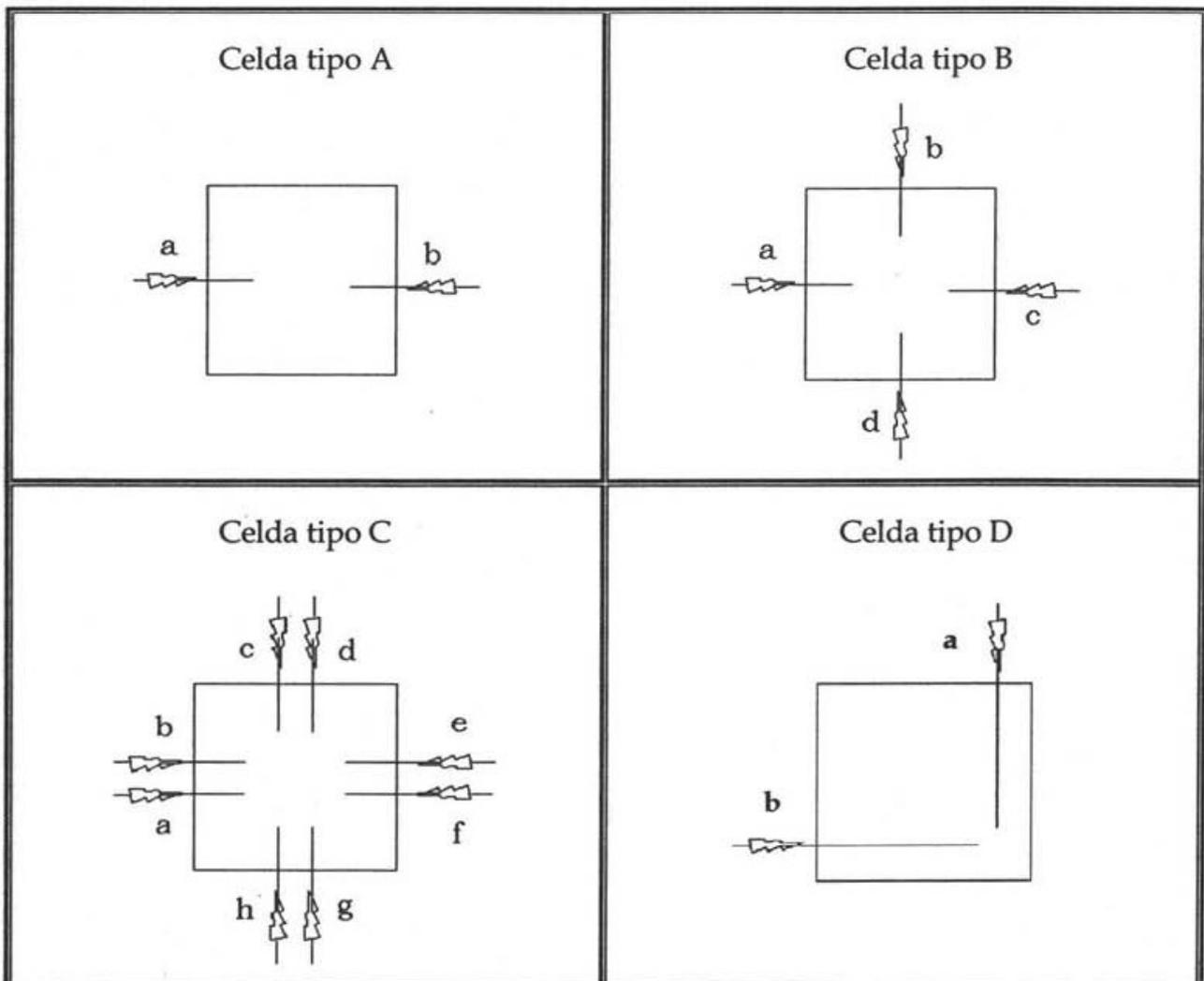


Figura 10: Diferentes tipos de celdas construidas para los estudios a corriente controlada.





Dentro de estas celdas se pueden tener diferentes disposiciones de polaridad, dependiendo de como se conecten los electrodos. Todas las combinaciones posibles se describen en la Tabla 2. La densidad de corriente en cada circuito (un ánodo y un cátodo) fue de $31.25 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, al imponer $2\mu\text{A}$ de corriente.

Tabla 2: Combinaciones de las polaridades de los electrodos en las diferentes celdas estudiadas

Celda tipo	Electrodos							
	a	b	c	d	e	f	g	h
A	+	-						
B1	+	+	-	-				
B2	+	-	+	-				
C1	+	+	+	+	-	-	-	-
C2	+	+	-	-	+	+	-	-
C3	+	-	+	-	+	-	+	-
D	+	-						

V.2.2 Celdas para los experimentos a potencial controlado.

Las voltamperometrías y los experimentos a potencial controlado, se estudiaron en las celdas de dos electrodos (celdas A y D, Figura 9), donde el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar se encuentran interconectados.³¹ $E_T = \text{Pt}$ (área aproximada = $6.4 \times 10^{-2} \text{cm}^2$), $E_{\text{aux.}} = E_{\text{ref.}} = \text{Pt}$. Este tipo de arreglo se utilizó debido a que las celdas de cristalización son demasiado pequeñas como para introducir un electrodo de referencia real. Adicionalmente consideramos que el platino es un metal inerte y por lo tanto puede utilizarse como pseudo referencia.

Finalmente, para realizar la determinación del potencial de carga cero, fue imprescindible construir un electrodo de referencia apto para ser introducido en las celdas de cristalización (ver Anexo 2).





V.3 Reactivos

Las proteínas empleadas para la cristalización fueron: *Lisozima* Seikagaku, Co. Clave 100940 seis veces recristalizada por los laboratorios Seikagaku Corporation y *Catalasa* Sigma C-3155 dos veces recristalizada por Sigma Chemical Corporation.

Adicionalmente se empleó NaCl (99.99% Aldrich), citrato de sodio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (Sigma S-4641), acetato de sodio trihidratado ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$) (Sigma S-9513), ácido acético ($C_2H_4O_2$) (Sigma A-6283), HCl (1M) (Hampton Research HR2-581), TRIS (1M) (Hampton Research HR2-589) y agarosa (Sigma A-4679).

V.4 Cristalización de las proteínas

V.4.1 Preparación de las disoluciones amortiguadoras

Buffer de acetatos (0.2 M) a pH 4.5: Para preparar 100 mL de este buffer, se requiere disolver 2.72g de acetato de sodio en un volumen menor a 100 mL de agua destilada. Posteriormente mientras se mide el pH, se agrega gota a gota el ácido acético hasta ajustar el pH deseado. Una vez obtenido este pH, se lleva al aforo de 100 mL con agua destilada. Finalmente se hace pasar la disolución a través de un filtro de celulosa ($0.2\mu m$).

Buffer TRIS-HCl (0.1 M) a pH 8.5: Este buffer fue preparado a partir de las disoluciones comerciales de TRIS (1M) y HCl (1M) optimizadas para la cristalización de proteínas. Para obtener 1mL de este buffer a una concentración 0.1 M y el pH deseado se deben seguir las proporciones marcadas por el proveedor. En el caso del buffer a pH 8.5, la disolución se prepara con $35\mu L$ de HCl (1M), $100\mu L$ de TRIS (1M) y $865\mu L$ de agua destilada.





V.4.2 Preparación de las soluciones batch

Todas las cristalizaciones se realizaron siguiendo el método batch, por medio del cual, se mezclan todos los componentes en una sola disolución y posteriormente se deja reposar hasta observar la nucleación y finalmente el crecimiento de los cristales. En el caso de las dos proteínas cristalizadas en la presente tesis, las condiciones para realizar la cristalización, ya han sido descritas¹⁸ y los procedimientos que se mencionan a continuación fueron los que se utilizaron para explorar el efecto de la variable eléctrica.

V.4.2.1 Lisozima/ Acetatos

Condiciones de cristalización: [lisozima] = 30 mg/mL (3% w/v), [NaCl] = 40 mg/mL (4% w/v) en buffer de acetatos a pH 4.5. Si se cristalizó en gel, la concentración de éste fue de 0.066% w/v en el mismo buffer.

En general para calcular la solubilidad (C_e) se determina experimentalmente (10mg/mL para la lisozima a 20°C).⁷

Para cristalizar esta proteína se preparan dos disoluciones, en la primera se disuelven 40mg de NaCl (como agente precipitante) en 0.5mL de buffer de acetatos pH 4.5 y en la segunda se disuelven 30mg de lisozima en medio mL del mismo buffer. Posteriormente se mezclan las dos disoluciones lentamente, para evitar una posible precipitación de lisozima. La disolución final es la solución batch de lisozima.

En el caso de los experimentos en gel, se preparan tres disoluciones cuyas concentraciones son el triple de las deseadas. Es decir el NaCl a 120 mg/mL, la lisozima a 90 mg/mL y el gel de agarosa se preparó a 20 mg/10 mL (se disuelve a baño maría y con agitación constante), todas en buffer de acetatos pH 4.5.





Posteriormente se toma 1 mL de cada disolución y se mezclan cuidadosamente, primero se agrega el NaCl al gel y después se agrega la proteína lentamente, se debe asegurar que el gel no supere los 30 °C, ya que por encima de esta temperatura podría desnaturalizarse la proteína. La disolución final (disolución batch de lisozima en gel) se debe colocar en la celda de cristalización cuidadosamente y antes de que se enfríe demasiado, porque la agarosa podría gelatinizar.

V.4.2.2 Catalasa/Tris-HCl

Condiciones de cristalización: [catalasa] = 10 mg/mL (1% w/v), [citrate de sodio] = 40 mg/mL (4% w/v) en buffer de Tris-HCl a pH 8.5. La cristalización se realizó en disolución.

Esta proteína cuando se adquiere de Sigma Chemical Corporation se encuentra a una concentración de 19.9 mg/mL, por lo que para llevar a cabo su cristalización, es necesario preparar el citrate de sodio al 20% w/v en buffer de Tris-HCl pH 8.5. Posteriormente se mezclan 0.3 mL de citrate de sodio (20%w/v) con 0.45 mL de buffer Tris-HCl, y finalmente se agregan lentamente 0.75 mL de catalasa (19.9 mg/mL). Ésta es la disolución batch de la catalasa.

V.4.3 Procedimientos de cristalización

V.4.3.1 Cristalizaciones a corriente controlada

El estudio de cristalización a corriente controlada se llevó a cabo en gel, debido a que las cristalizaciones en disolución se ven altamente afectadas por la fuerza de la gravedad y el transporte convectivo.³²





Para realizar estas cristalizaciones, se preparó una disolución batch de lisozima en gel, la cual se introdujo en las diferentes celdas de cristalización (Figura 10) y posteriormente se sellaron con silicón. Éstas celdas fueron colocadas en la placa para el control de temperatura (ver la sección V.1) fijándolas con cinta adhesiva, la temperatura se mantuvo constante a $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, que es el tiempo que dura el experimento. Al concluir éste, se toman las fotografías y se analizan los resultados.

En todos los experimentos se fabricó una celda control con la misma disolución y los electrodos en la misma geometría, pero sin aplicar corriente eléctrica.

V.4.3.2 Cristalizaciones a potencial controlado

Los primeros estudios a potencial controlado se llevaron a cabo en disolución, debido a que la alta resistencia del gel hace más complicado el estudio electroquímico de la influencia del potencial en la cristalización. Una vez estudiadas y controladas las variables en disolución, se llevó a cabo un estudio a potencial controlado para las cristalizaciones en gel.

Para realizar estas cristalizaciones, se prepara una disolución batch de la proteína, la cual se introduce en las celdas de cristalización (celdas A ó D, Figura 10) sellándolas con silicón. Posteriormente las celdas son colocadas en la placa del control de temperatura y se fijan con cinta adhesiva, la temperatura se mantiene constante a 18° ó $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Una vez concluido el experimento se toman las fotografías correspondientes y se analizan los resultados.





En todos los experimentos se fabricó una celda control, la cual consta de la misma disolución y los electrodos en la misma geometría, pero sin la imposición del potencial.

V.5 Estudio electroanalítico

Se realizaron diferentes voltamperometrías cíclicas con el fin de estudiar el comportamiento electroquímico del medio de cristalización en presencia y ausencia de la proteína. Estos estudios permitieron delimitar la zona de estudio para los experimentos a potencial controlado, es decir, la zona donde las reacciones electroquímicas no interfieren con la cristalización de la proteína. Antes y después de la cristalización se realizaron voltamperogramas, las condiciones de la disolución fueron exactamente las mismas que para las cristalizaciones a potencial controlado.





**VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS
Y DISCUSIÓN**





VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Cristalización a corriente controlada.

Al imponer una corriente directa dentro de una celda electroquímica se presenta un fenómeno de electromigración, este fenómeno influye en la cristalización de la lisozima. Para estudiar esta influencia se cristalizó a la lisozima en gel, dentro de los diferentes tipos de celdas descritas en la Figura 10. En estas celdas donde se genera un campo eléctrico interno, con diferente geometría y disposición de polaridad, se determinó el número de cristales y su tamaño para evaluar el rendimiento de la cristalización.

En general cuando se aplica una corriente eléctrica en los diferentes tipos de celdas, se observa que la nucleación de los cristales es más rápida y sin embargo se controla mejor. Esto implica una disminución del tiempo en el que se induce la nucleación pero se generan pocos núcleos, lo cual permite la formación de cristales de mayor tamaño en un menor tiempo.

Esté fenómeno se puede observar por ejemplo en una celda tipo A donde se consiguieron cristales de aproximadamente 300 μm alrededor de las 24h, mientras que en los controles (sin aplicación de corriente eléctrica) se tuvo que esperar hasta las 48h para obtener cristales de alrededor de 150 μm (Figura 11).



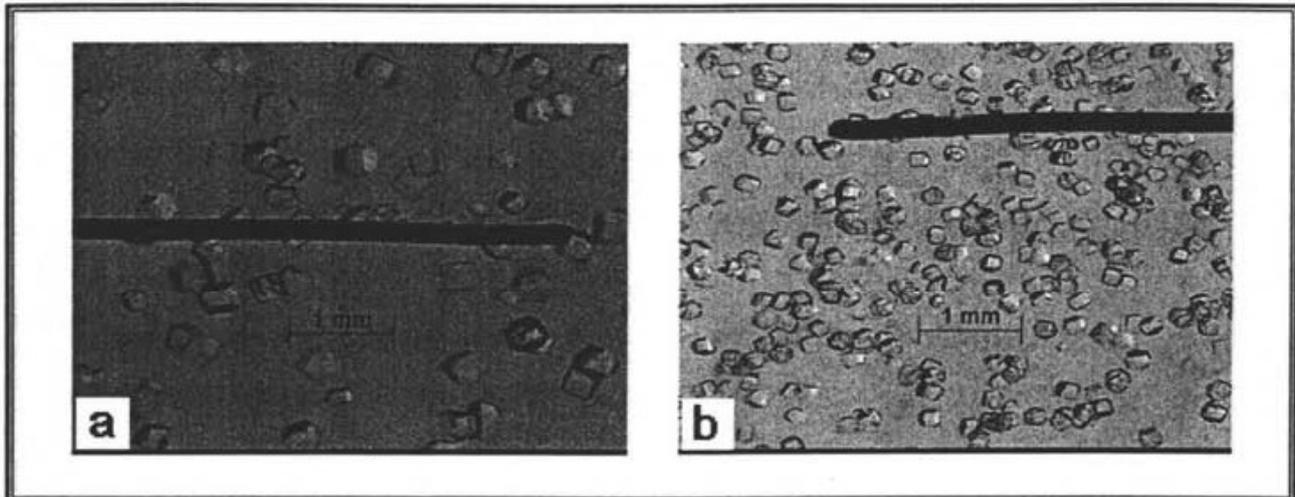


Figura 11: Cristales obtenidos a) bajo imposición de corriente eléctrica ($2\mu\text{A}$) durante 24 horas y b) sin imposición de corriente después de 48 horas. Se uso una celda tipo A con electrodos de platino de $200\mu\text{m}$ de diámetro. $[\text{Lisozima}] = 30\text{mg/mL}$, $[\text{NaCl}] = 40\text{ mg/mL}$, $[\text{agarosa}] = 0.066\%$ w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C .

Existe además una preferencia para que la cristalización ocurra cerca del cátodo (electrodo negativo), a la vez que la cristalización en el ánodo se ve desfavorecida (Figura 12), como ha sido publicado previamente.⁶

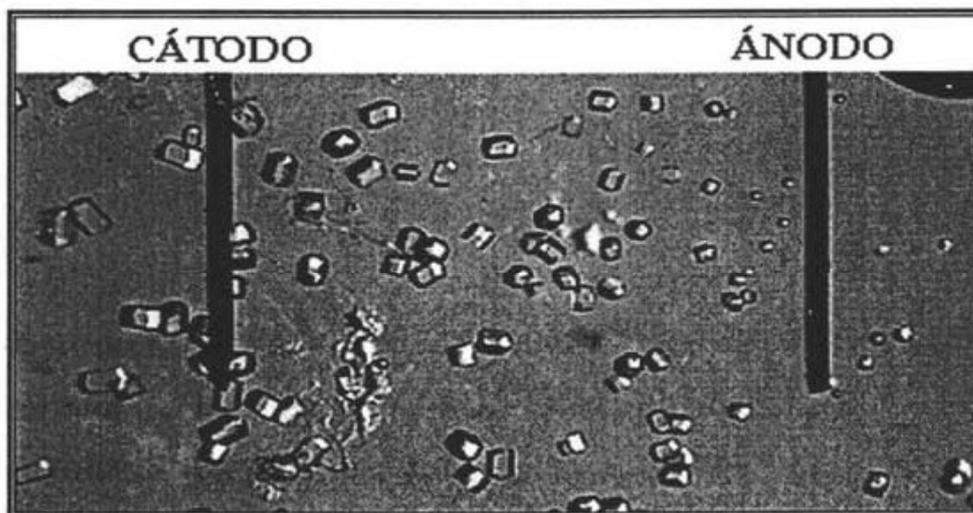


Figura 12: Cristalización de lisozima bajo la imposición de $2\mu\text{A}$ durante 48 h, en una celda tipo C3, usando electrodos de platino de $200\mu\text{m}$ de diámetro. $[\text{Lisozima}] = 30\text{mg/mL}$, $[\text{NaCl}] = 40\text{ mg/mL}$, $[\text{agarosa}] = 0.066\%$ w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C .





Este fenómeno posiblemente se debe a que la lisozima, al pH de trabajo, está cargada positivamente³³ y por lo tanto migra hacia el cátodo, en donde cristaliza. Esta migración es posible debido a la imposición de un campo eléctrico y a que en el método de cristalización utilizado (método batch) no existen otras barreras de transporte, además de la resistencia implícita de la disolución.

En otros trabajos⁸ se ha mencionado que la cristalización de lisozima se observa sobre el ánodo, y no en el cátodo a pesar de que la proteína se encuentra cargada positivamente. La explicación a este fenómeno se basa en que, debido al método de cristalización empleado (método de acupuntura en gel con imposición de un campo eléctrico interno), la lisozima se encuentra confinada en un capilar y el agente precipitante (NaCl) es quien tiene que vencer la resistencia del gel, para llegar hasta la proteína (Figura 13). En estas condiciones la lisozima necesita que los iones cloruro lleguen al capilar, ya que forman parte de su estructura tridimensional. Por lo tanto el electrodo dentro del capilar debe ser positivo (ánodo), de tal manera que atraiga a los iones cloruro hacia la lisozima, pues de lo contrario estos iones se quedarán en el gel y no habrá cristalización como se ha mencionado.

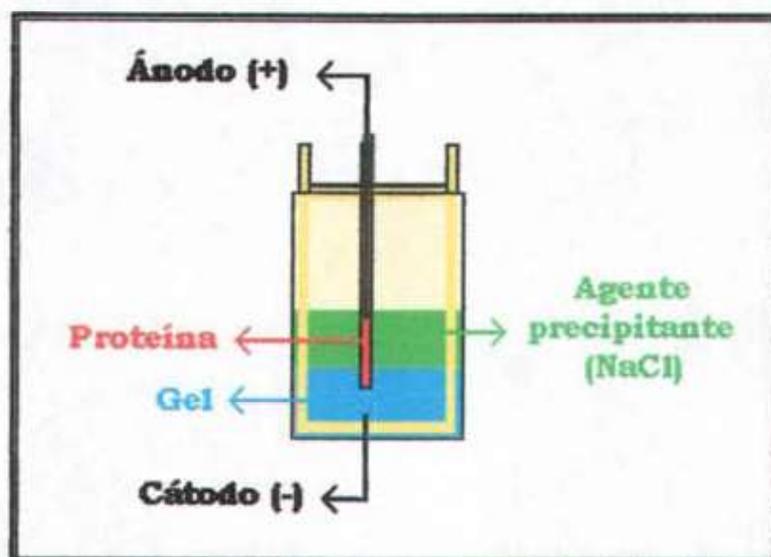


Figura 13: Celda utilizada para la cristalización de proteínas por medio del método de acupuntura en gel





En este método la velocidad de nucleación y, con ella, la del crecimiento del cristal no dependen de la migración de la lisozima, sino de la velocidad con que los iones cloruro lleguen al capilar, la cual también aumenta por efecto de un campo eléctrico interno.

En nuestro sistema de cristalización, la migración de lisozima hacia el cátodo (-) es la principal responsable de que la mayoría de los cristales obtenidos se encuentran en las cercanías de los cátodos. Adicionalmente los cristales cercanos a estos cátodos son los de mayor tamaño (Figura 12), comparados con los del ánodo y con los del control (crecidos bajo las mismas condiciones pero sin la imposición de corriente eléctrica).

Para poder comparar el tamaño de los cristales, todos los experimentos se dejaron cristalizar durante 48 horas, tiempo requerido para poder observar la cristalización en los controles. Sin embargo los cristales obtenidos bajo la imposición de corriente eléctrica adquieren su tamaño final alrededor de las 24 horas, después de este tiempo la velocidad de crecimiento es mucho menor.

Es importante destacar que la concentración de lisozima usada en estas cristalizaciones es al menos 25% menor que lo reportado en otros artículos.^{6,7,8} En las celdas utilizadas en este trabajo una concentración de 40 mg/mL de lisozima provocó una nucleación masiva generando cristales muy pequeños (Figura 14), lo cual nos motivo a utilizar una concentración menor de esta proteína (30mg/mL).



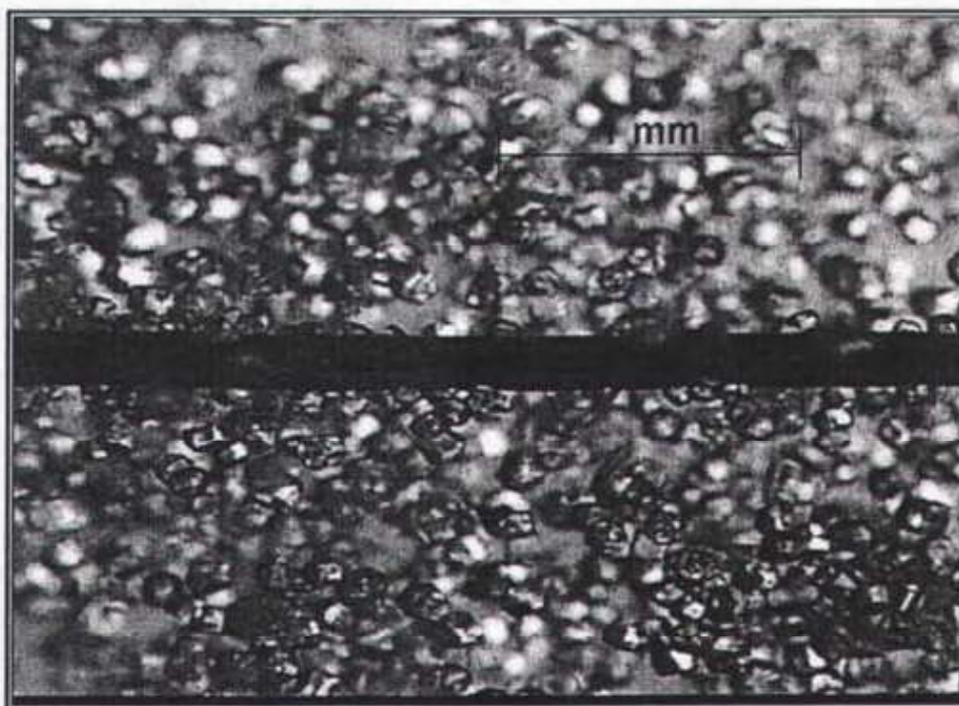


Figura 14: Cristales obtenidos en el cátodo bajo la imposición de corriente eléctrica ($2\mu\text{A}$ por circuito) durante 48 horas. Dentro de una celda tipo C3 con electrodos de platino de $200\mu\text{m}$ de diámetro. [Lisozima] = 40mg/mL , [NaCl] = 40 mg/mL , [agarosa] = 0.066% w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C .

VI.1.1 Efecto de la geometría de la celda

VI.1.1.1 Celdas tipo A, B y C

El tamaño del cristal, también está influenciado por el número de electrodos y por la disposición de la polaridad. El resultado del tamaño promedio de cristal contra el tipo de celdas se muestra en las Figuras 15a, b y c.



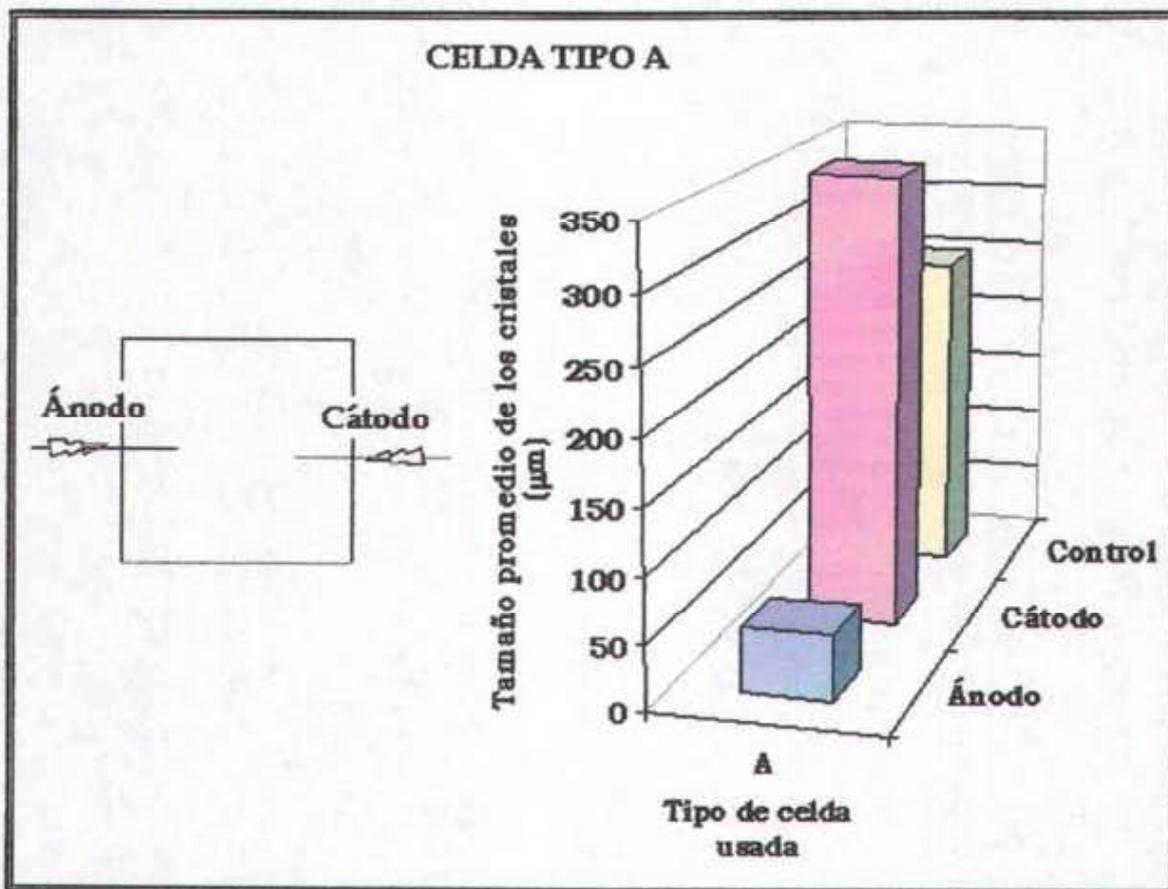


Figura 15a: Gráfica del tamaño promedio de cristal cerca de los electrodos, contra el tipo de celda de cristalización y su disposición de la polaridad. Condiciones de cristalización: [Lisozima] = 30mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL, [agarosa] = 0.066% w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C durante 48 h.



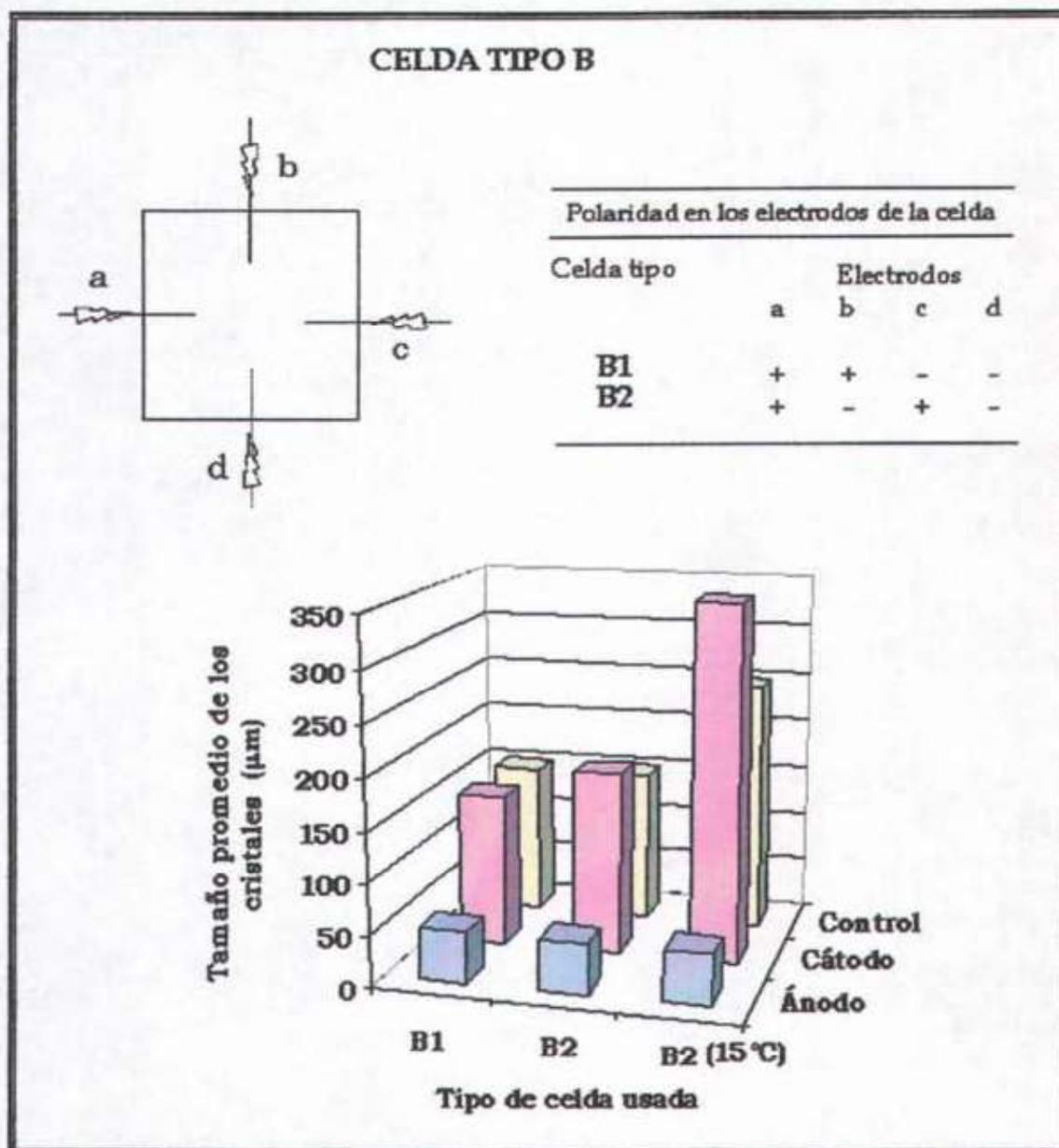


Figura 15b: Gráfica del tamaño promedio de cristal cerca de los electrodos, contra el tipo de celda de cristalización y su disposición de la polaridad. Condiciones de cristalización: [Lisozima] = 30mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL, [agarosa] = 0.066% w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C durante 48 h.



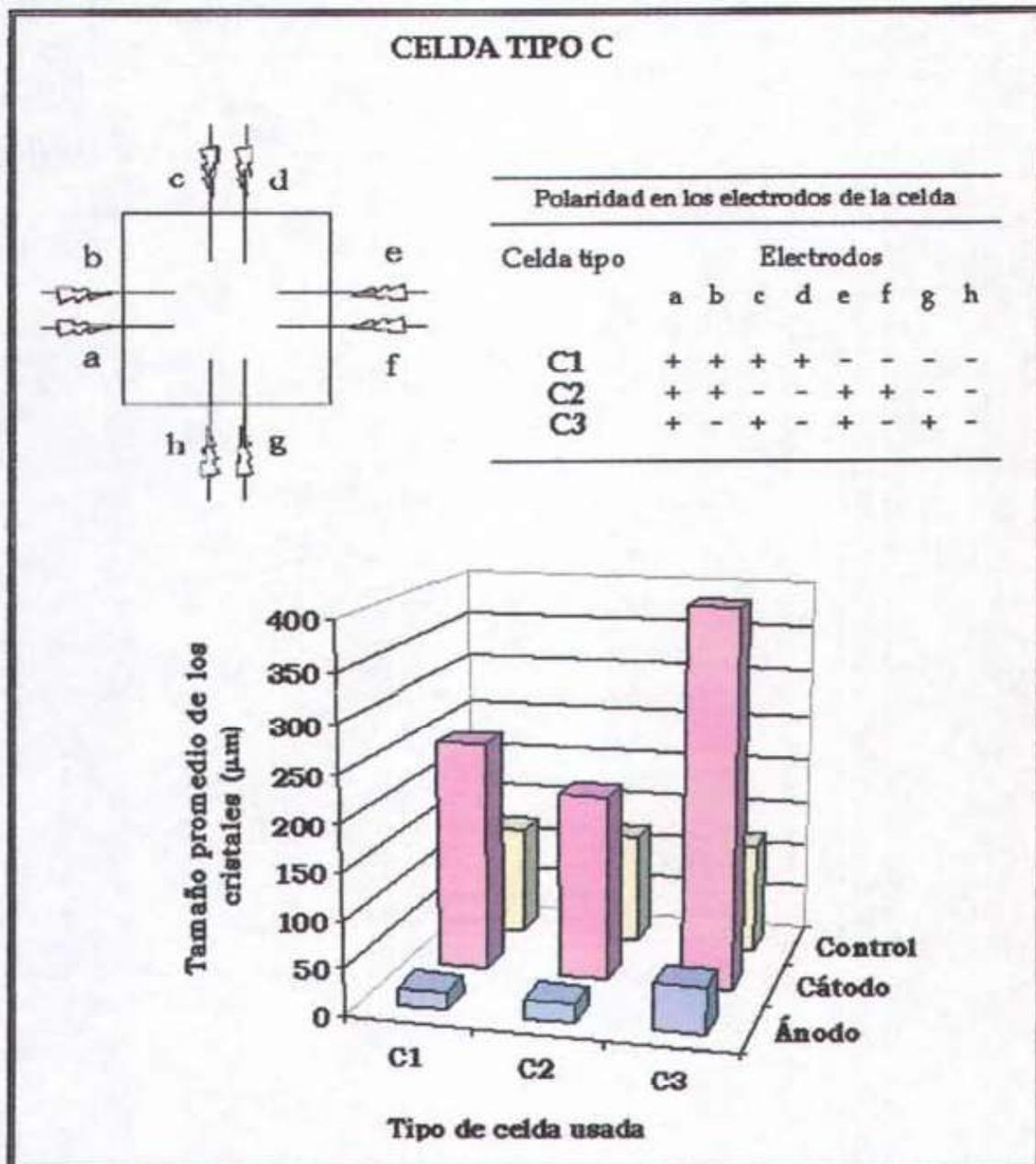


Figura 15: Gráfica del tamaño promedio de cristal cerca de los electrodos, contra el tipo de celda de cristalización y su disposición de la polaridad. Condiciones de cristalización: [Lisozima] = 30mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL, [agarosa] = 0.066% w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C durante 48 h.





Al comparar los resultados de la cristalización en celdas de geometría tipo A, B y C con sus diferentes disposiciones de ánodos y cátodos (Figuras 15a, b y c), se observa que los cristales más grandes ($>200\ \mu\text{m}$) se obtienen en las celdas con polaridades alternadas (A, B2, C3). En contraste las celdas C1 y C2 se encuentran totalmente bloqueadas por los gases al final de la cristalización (Figura 16). Estos resultados son congruentes con una mejor distribución de la corriente eléctrica dentro de la celda cuando los electrodos se encuentran alternados, y como consecuencia se observa un menor número de burbujas de los gases generados por el paso de corriente eléctrica. Cuando esto no sucede dentro de la celda hay regiones influenciadas por la cercanía de múltiples electrodos de la misma polaridad y corriente, incrementando las reacciones redox del medio con los electrodos, dado que se trabajó a corriente controlada.

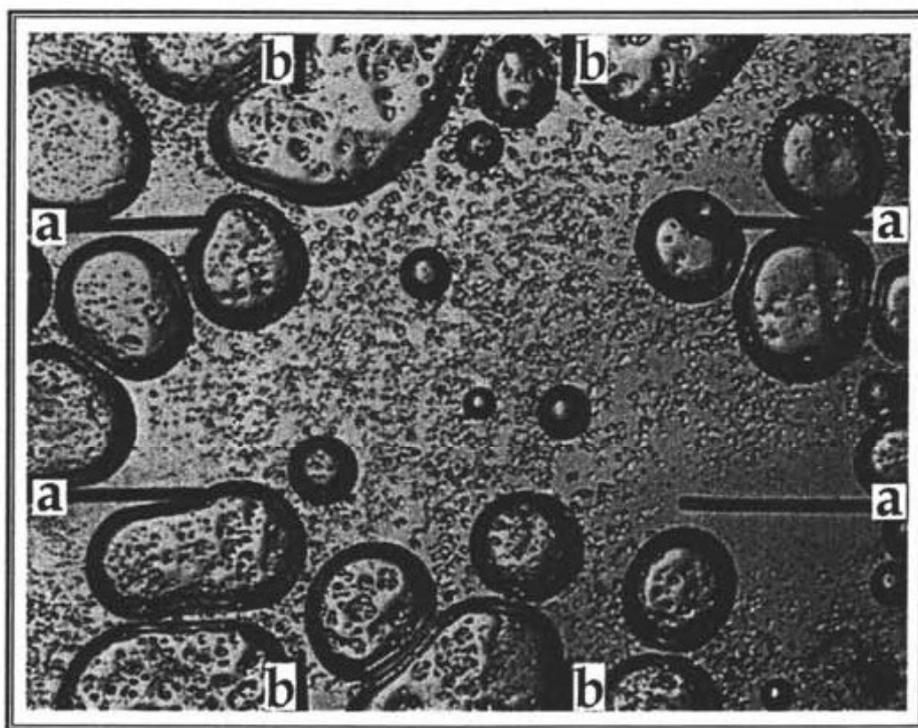


Figura 16: Cristalización de lisozima bajo la imposición de $2\ \mu\text{A}$ por circuito, en una celda con geometría tipo C2. a) Ánodo, b) Cátodo. Condiciones de cristalización: [Lisozima] = 30mg/mL , [NaCl] = $40\ \text{mg/mL}$, [agarosa] = $0.066\% \text{ w/v}$ en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C durante 48 h.





Adicionalmente, las celdas con el mayor número de electrodos (celdas tipo C) inducen una nucleación más rápida (ver Tabla 3), pero al estar menos controlada debido a los gases presentes, los cristales que se forman son pequeños (Figura 16).

Tabla 3: Número de cristales obtenidos en un área de 1mm² alrededor del cátodo dentro de las diferentes celdas durante la cristalización a corriente controlada.

Celda tipo (Número de electrodos)	Número de cristales obtenidos a las	
	12h	24h
A (2)	1	2
B1 (4)	17	22
B2 (4)	46	55
C2 (8)	50	66
Control (4)	30	38

En el caso de los controles, al aumentar el número de electrodos también se induce una nucleación más rápida, sin embargo este comportamiento no es tan eficiente como el que se observa bajo la influencia de un campo eléctrico, debido a que los cristales no crecen más grandes, sólo crece un mayor número de ellos. Este fenómeno puede deberse a la afinidad de los puentes disulfuro de la proteína con el platino que facilitan la nucleación y, por lo tanto, aumenta la cantidad de cristales, como ha sido previamente propuesto.⁶ Sin embargo, el efecto de la corriente eléctrica es claro dado que se obtienen cristales de al menos un tamaño 20% mayor que sin corriente eléctrica en menor tiempo, incluso en la celda con el menor número de electrodos (celda tipo A, Figura 17).



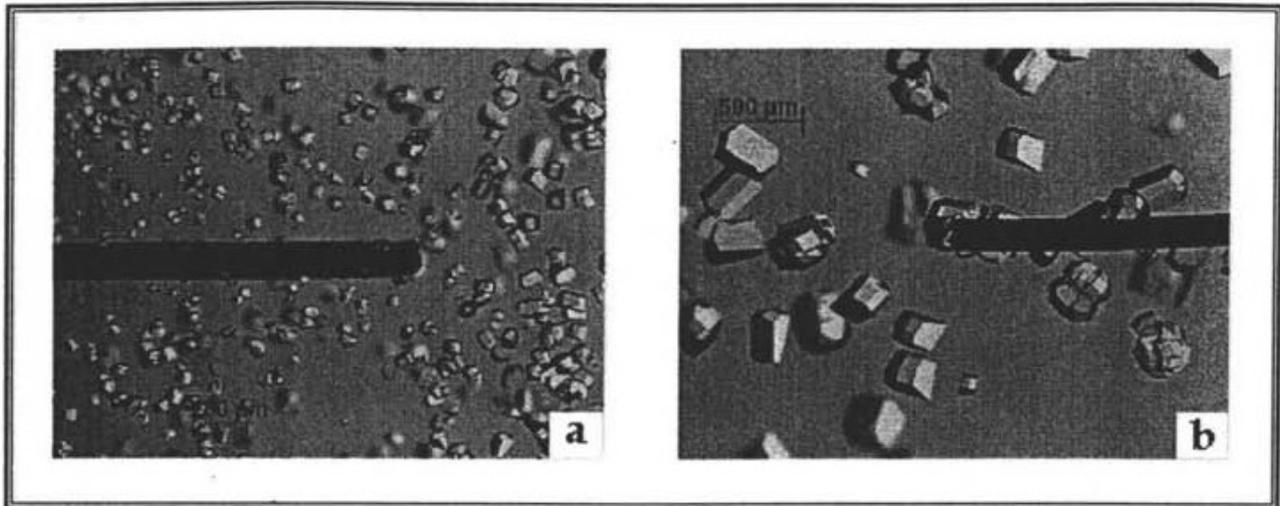


Figura 17: Cristalización de lisozima bajo la imposición de $2\mu\text{A}$ en una celda con geometría tipo A. a) Ánodo, b) Cátodo. Condiciones de cristalización: $[\text{Lisozima}] = 30\text{mg/mL}$, $[\text{NaCl}] = 40\text{ mg/mL}$, $[\text{agarosa}] = 0.066\%$ w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C durante 48 h.

En particular para la celda tipo B2 se encontró que al disminuir la temperatura de cristalización a 15°C , los cristales aumentaron sustancialmente su tamaño incluyendo al control (Figuras 15b y 18).

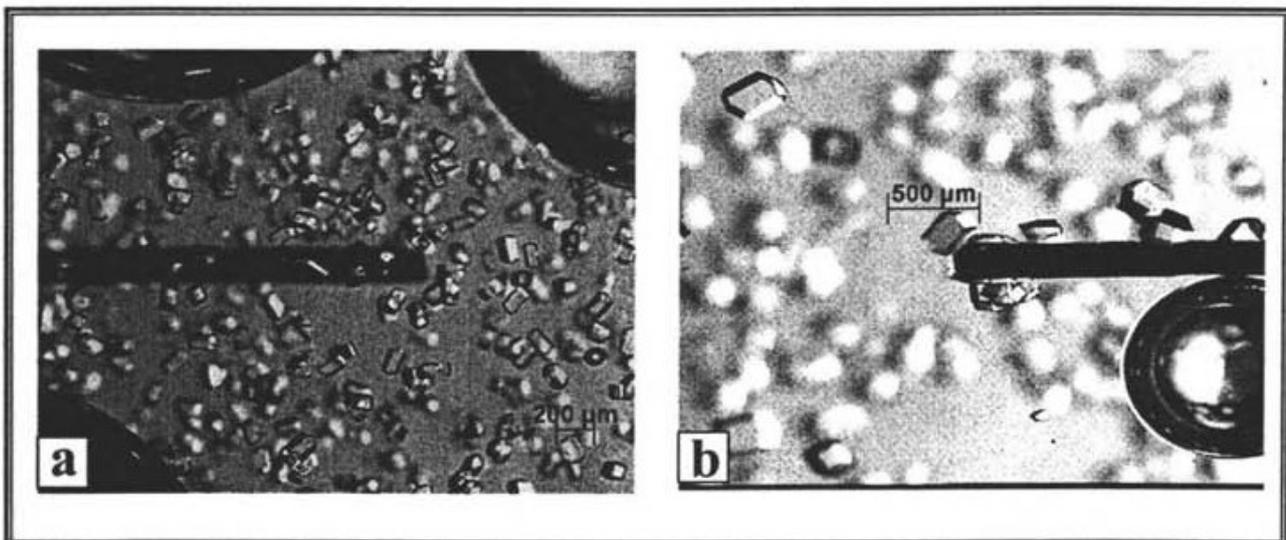


Figura 18: Cristales obtenidos en el cátodo bajo la imposición de $2\mu\text{A}$ (por circuito), en una celda con geometría tipo B2 a una temperatura de a) 18°C y b) 15°C . Condiciones de cristalización: $[\text{Lisozima}] = 30\text{mg/mL}$, $[\text{NaCl}] = 40\text{ mg/mL}$, $[\text{agarosa}] = 0.066\%$ w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 durante 48 h.





VI.1.1.2 Celda tipo D

Durante el desarrollo de los experimentos descritos anteriormente, se observó que dentro del cuadrante limitado por un cátodo y un ánodo se obtenían los cristales de mayor tamaño y en mayor abundancia que en el resto de la celda, incluyendo las cercanías del electrodo. Por lo anterior se diseñó una nueva celda que maximizara este efecto (Figura 10, celda tipo D). En estas condiciones se maximiza el efecto del campo eléctrico interno ya que como se observa en la Figura 19, los cristales que se encuentran dentro de la zona de influencia del campo son de un tamaño mayor de $400\ \mu\text{m}$ y completamente orientados hacia el cátodo. Conforme disminuye el efecto del campo (esquina superior izquierda) los cristales poseen un tamaño menor y éste es menos homogéneo.

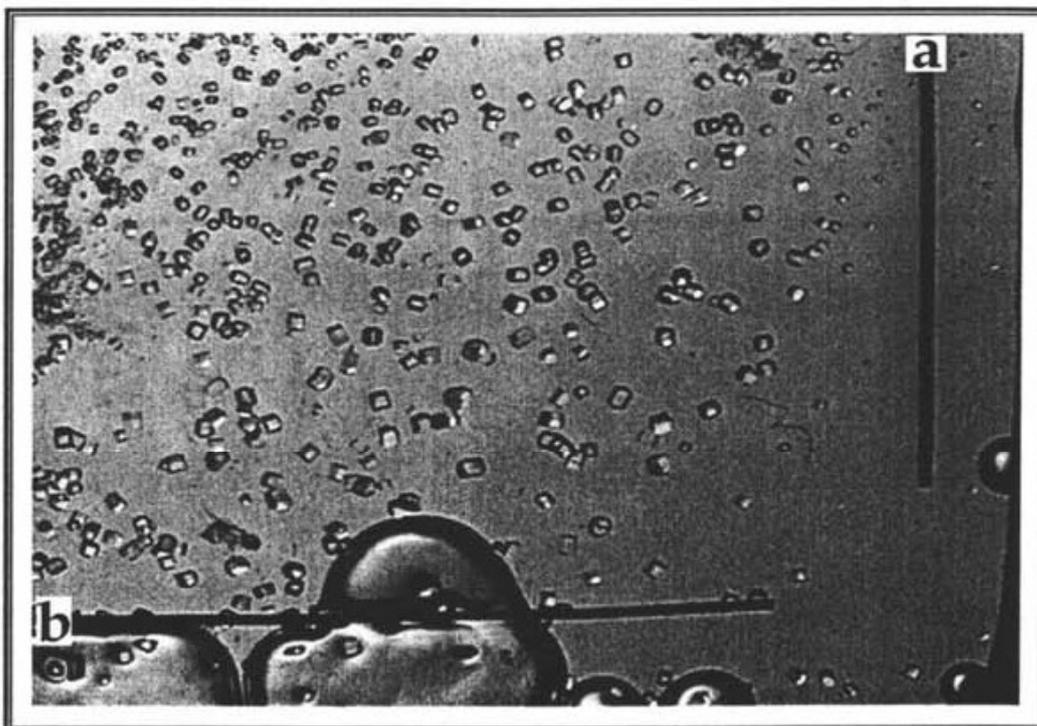


Figura 19: Celda tipo D bajo la imposición de una corriente de $2\ \mu\text{A}$. a) ánodo, b) cátodo. Condiciones de cristalización: [Lisozima] = $30\ \text{mg/mL}$, [NaCl] = $40\ \text{mg/mL}$, [agarosa] = 0.066% w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C durante 48 h.





Los resultados obtenidos en este tipo de celdas demuestran que el campo eléctrico generado por un flujo de corriente, no es uniforme en toda la celda. Como ya se mencionó, conforme aumenta la intensidad del campo eléctrico aumenta el tamaño de los cristales, sin embargo, justo en la punta de los electrodos donde el efecto de la corriente eléctrica es más intenso, la cristalización se desfavorece y no se observa crecimiento de cristales. Este efecto se debe probablemente a la presencia del movimiento convectivo de los iones presentes, o bien a la presencia de reacciones no controladas en esta región del electrodo.

En esta celda tipo D se logró disminuir el tiempo de nucleación, obteniendo los cristales de proteína en 12 horas, bajo la imposición de una corriente eléctrica de $2\mu\text{A}$.

Los cristales del experimento control no mostraron ninguna variación en el tamaño con respecto a su posición en la celda, tuvieron un tamaño homogéneo de aproximadamente $300\mu\text{m}$ a las 48 horas. Sin embargo el número de cristales obtenidos fue al menos un 60% menor que los obtenidos en presencia de corriente eléctrica.

VI.1.2 Efecto del pH

Con el objeto de corroborar que los resultados anteriores se deben al efecto del campo eléctrico interno y no a un cambio brusco en el pH por las reacciones electroquímicas del medio (confirmadas por la presencia de algunas burbujas al final de la cristalización), se efectuó un experimento para monitorear un posible cambio de pH durante la cristalización. Éste consistió en la imposición de una corriente eléctrica ($2\mu\text{A}$ por circuito) en una celda tipo B2 conteniendo el medio de cristalización y fenoftaleína como indicador de pH (10mg/mL , previamente disuelta en $50\mu\text{L}$ de





etanol), posteriormente se siguió el cambio de coloración durante las primeras 30 horas de la cristalización (cada 2 horas) usando un microscopio estereoscópico enfocado sobre la superficie de un cátodo y un ánodo.

Durante el experimento no se detectó ninguna coloración (si hubiera ocurrido un cambio fuerte de pH, la disolución transparente hubiera cambiado a un color rosa fuerte) que indicara un cambio en el pH alrededor del electrodo (Figura 20). Esto corrobora que la concentración de buffer es la adecuada para tamponar correctamente cualquier cambio de pH, durante la cristalización, y a pesar de que hay generación de gases, esta variable no se modifica sustancialmente durante el tiempo que duran los experimentos realizados.

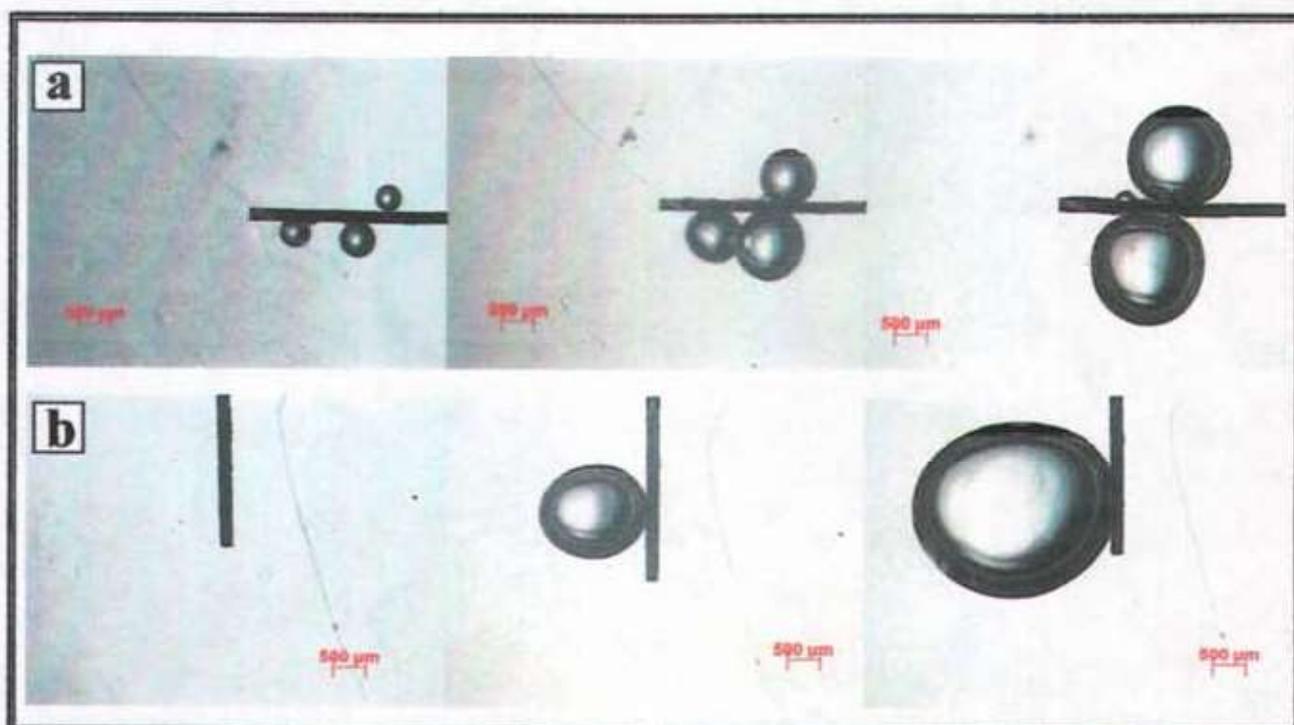


Figura 20: Cristalización de lisozima en presencia de fenofaleina. a) ánodo (generación de O_2), b) cátodo (producción de H_2). A las horas 2, 10 y 28 respectivamente. [fenofaleina] = 10mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL, [agarosa] = 0.066% w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 15°C dentro de una celda tipo B2.





Una vez descartado el cambio de pH para explicar la cristalización direccionada hacia el cátodo en un menor tiempo, este fenómeno se atribuye exclusivamente a un proceso de electromigración cuando se impone una corriente eléctrica a la celda. La lisozima tiene un punto isoeléctrico (pI) básico, por lo que al pH de trabajo está cargada positivamente, esto le permite transportarse hacia el cátodo mediante el flujo de corriente. Este flujo de corriente dentro de la celda de electrocristalización es posible gracias al transporte de iones cargados, la mayor parte de la carga es transportada por los iones de alta movilidad (Cl^- , Na^+ , H^+ , AcO^-) presentes en el medio de cristalización.

La lisozima puede migrar dentro del campo eléctrico ya que a pesar de ser una molécula grande tiene una carga neta de 10^+ y por lo tanto su movilidad iónica no es despreciable. No obstante su desplazamiento sí es lento, comparado con los demás iones presentes de mayor movilidad, por lo que la lisozima se transportará hacia el cátodo de una manera no convectiva, favoreciendo la cristalización cerca del cátodo en un menor tiempo.

VI.1.3 Calidad de los cristales - Estudio de rayos X

La difracción de rayos X tiene una gran importancia en los análisis químico-estructurales. En el caso de las proteínas, gracias a cristales de muy alta calidad, esta técnica es una herramienta clave para la elucidación de sus estructuras tridimensionales. Es por ello que para poder determinar la calidad de algunos de los cristales obtenidos mediante los experimentos descritos anteriormente, se estudió su difracción de rayos X a alta resolución.





De la difracción de rayos X se recolectaron los siguientes datos:

Cristales de lisozima obtenidos bajo la imposición de un campo eléctrico a corriente constante en gel.

Grupo espacial	P 4₃ 2₁ 2		
Dimensiones de la celda unitaria	78.52	78.52	37.04
	90.00	90.00	90.00
Intervalo de resolución (Å)	35.12 - 2.00		(2.07 - 2.00)
Número total de reflexiones	30203		
Número de reflexiones únicas	8018		
% Completado	97.1		(93.5)
R merge	0.036		(0.067)
Chi cuadrada reducida	0.92		(0.74)
I/I (σ)	26.8		(11.9)

Nota: Los valores entre paréntesis son los obtenidos en la última capa de resolución.

Con los datos obtenidos de nuestros cristales de lisozima se concluye que estos presentan una estructura tridimensional tetragonal, ya que concuerdan en un 97.2 % con el grupo espacial P 4₃ 2₁ 2 informado para la lisozima.

Adicionalmente se puede observar que los cristales presentan una buena calidad, en términos de los parámetros estadísticos obtenidos (R merge = 0.036) y a que permiten alcanzar un intervalo de resolución de hasta 2(Å).

El residuo I/I(σ) nos da una referencia mucho más cercana de la calidad de los cristales, debido a que mide la intensidad de las señales recibidas con respecto a su





error estadístico, este valor nos mostró que nuestros cristales presentan una buena calidad.

Las dimensiones de la celda unitaria revelaron que la estructura cristalina de la lisozima, bajo la imposición de un campo eléctrico, es más compacta que las reportadas normalmente (78.86, 78.86, 38.25).^{1, 34} Este resultado sugiere que los cristales obtenidos en presencia de un campo eléctrico poseen una mayor estabilidad, es decir, son más resistentes.

VI.2 Cristalización a potencial controlado.

VI.2.1 Estudio de las barreras electroquímicas

En el capítulo anterior se habló de la influencia en la cristalización bajo la imposición de una corriente eléctrica, sin embargo, en dichos experimentos no se controlaron las reacciones electroquímicas parásitas caracterizadas por burbujas en la cercanía de los electrodos. Por lo tanto, no se puede distinguir entre la influencia que ejerce el campo eléctrico y la que ejercen las reacciones electroquímicas durante la cristalización.

Las reacciones electroquímicas se generan debido a la imposición de una alta corriente eléctrica sin un control de potencial. Estas reacciones (Esquema 2) producen gases en gran cantidad dentro de la celda de cristalización provocando una precipitación prematura de la lisozima, una disminución del efecto del campo eléctrico o generando movimientos convectivos de la disolución y por lo tanto la eficiencia de la cristalización se ve deteriorada. Por lo anterior se realizó un estudio de la cristalización a potencial controlado, donde se elimina cualquier efecto provocado por dichas reacciones que se generan en las barreras electroquímicas.





Reacciones de reducción		E° (V)
$2 \text{H}_3\text{O}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{H}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$		0
$\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$		0.68
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$		1.77

Reacciones de oxidación		E° (V)
$2 \text{H}_2\text{O} - 4\text{e}^- \longrightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+$		-1.22
$\text{Pt} + 2\text{H}_2\text{O} - 2\text{e}^- \longrightarrow \text{Pt}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+$		-0.98
$2\text{Cl}^- - 2\text{e}^- \longrightarrow \text{Cl}_2$		-1.35

Esquema 2: Posibles reacciones electroquímicas que se llevan a cabo en la barrera anódica y catódica respectivamente.³⁵ La oxidación del platino ($\text{Pt} + 2\text{H}_2\text{O} - 2\text{e}^- \rightarrow \text{Pt}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+$) es una reacción termodinámicamente posible ($E^\circ = -0.98 \text{ V}$), pero que no ocurre debido a su cinética.

Para localizar los valores de potencial donde no se presentan las reacciones electroquímicas que producen barrera (zona de carga de la doble capa), se estudió por voltamperometría cíclica en una celda potenciodinámica de 2 electrodos el medio de cristalización (Figura 21a), el medio con lisozima antes (Figura 21b) y después de la cristalización (Figura 21c).

Cuando se adiciona lisozima al medio, ésta no presenta ninguna actividad electroquímica y únicamente se observa una disminución de la corriente catódica y anódica en la carga de la doble capa, lo cual evidencia un cambio en el arreglo de ésta. Como se ha mencionado existen reportes sobre la interacción del platino con los puentes disulfuro de la lisozima y esto posiblemente es lo que ocurre en la interfase del electrodo que evita que se acumulen iones en la superficie de éste.



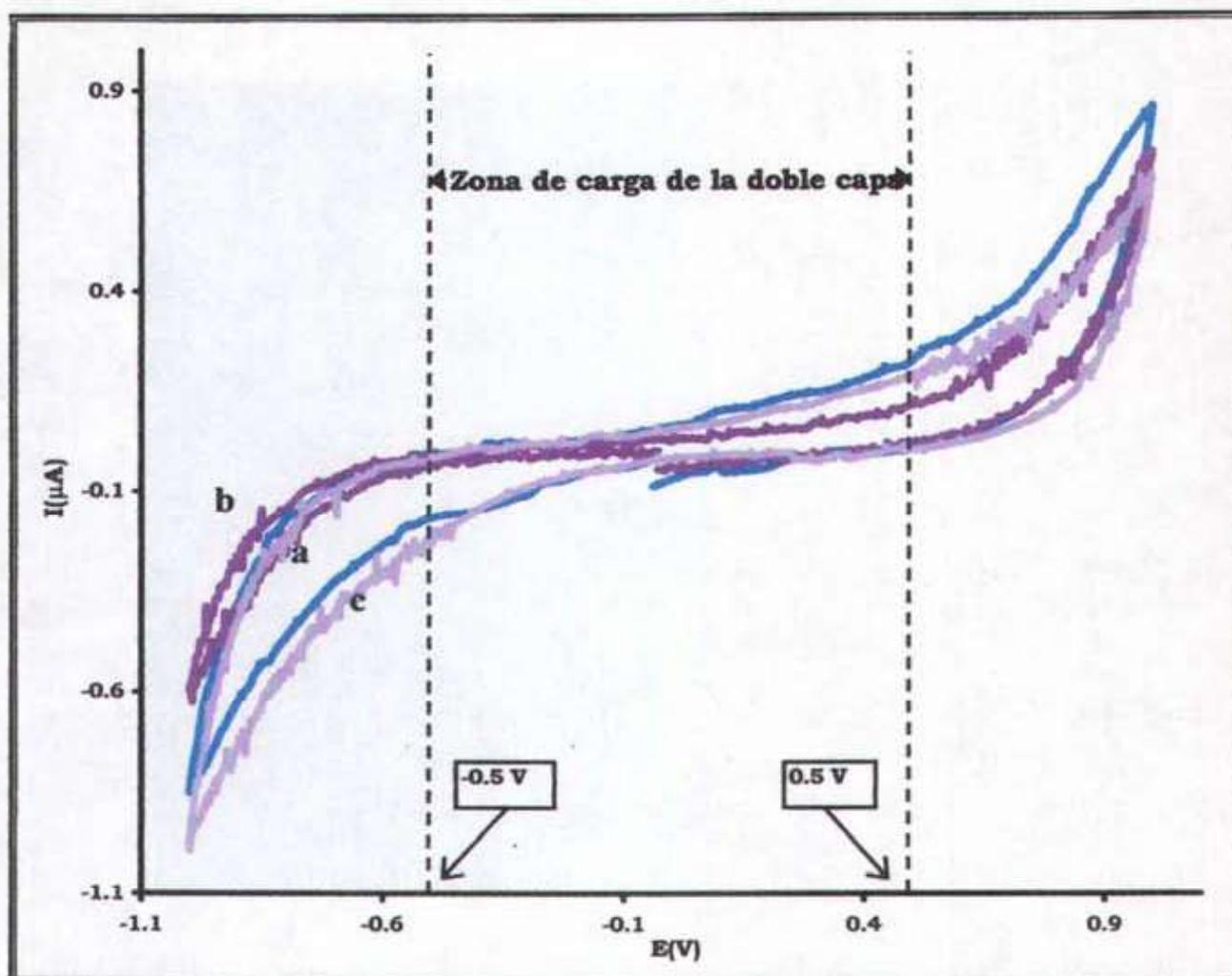


Figura 21: Voltamperogramas cíclicos obtenidos (a) sin lisozima, (b) después de la adición de lisozima y (c) después de la cristalización a potencial controlado de -0.5 V. Celda tipo A, [Lisozima] = 30 mg/mL en buffer de acetatos a 200 mM, pH 4.5 y [NaCl] = 40 mg/mL. Todos los voltamperogramas se realizaron con $E_T = \text{Pt}$, E_{aux} , $E_{\text{ref.}} = \text{Pt}$, a una velocidad de barrido de 15 mV/s.

Como se observa en el voltamperograma 21b en la zona comprendida entre 0.5 y -0.5 V solo se tiene la carga de la doble capa en los electrodos. A valores superiores se observa un crecimiento exponencial de la corriente, indicativos de reacciones electroquímicas. Por lo tanto los estudios de crecimiento de cristales en presencia de un campo eléctrico interno, generado potencioestáticamente, se llevaron a cabo dentro de este intervalo de potencial. En el caso de la barrera anódica no se observa ningún cambio en presencia y ausencia de lisozima.





Una vez concluida la cristalización se obtiene el voltamperograma (21c), donde se observa un comportamiento muy parecido al registrado en el voltamperograma del medio sin lisozima (21a). Esto se debe a que gran parte de la lisozima ya cristalizó y no está presente en la disolución, lo que restablece las condiciones originales de la interfase.

VI.2.2 Variables importantes de la cristalización en disolución a potencial controlado

La cristalización en disolución presenta un comportamiento diferente al que se observa en una cristalización en gel. Primeramente se ha reportado que en disolución el crecimiento de cristales es más rápido que en gel, cuando se aplica una corriente constante.³⁶ Sin embargo, la calidad de los cristales que se obtienen está muy por debajo de la calidad obtenida en una cristalización en gel. Esto se debe principalmente a que el gel disminuye las fuerzas convectivas generadas por la corriente, y en disolución estas fuerzas influyen bruscamente el crecimiento del cristal. A pesar de esto, la cristalización en disolución tiene un procedimiento experimental mucho más fácil que el que requiere una cristalización en gel.

Esta facilidad de la técnica le concede a la cristalización en disolución ciertas ventajas y, si se pudiera controlar mejor el proceso, la calidad de los cristales mejoraría ahorrando tiempo tanto en la preparación de la disolución batch como en la cristalización de la lisozima. La imposición de un campo eléctrico a potencial controlado, puede ser una variable útil para este fin.





La primera diferencia con los experimentos en gel a potencial controlado fue el proceso de sedimentación, debido a que en disolución la fuerza de gravedad afecta más a los cristales que se forman. Este efecto se observó más cuando se colocan las celdas en la posición donde los electrodos quedan en la parte inferior. En esta posición la fuerza de gravedad empuja a los núcleos hacia el fondo de la celda, evitando que se observe algún efecto del campo eléctrico sobre la cristalización, debido a que todos los cristales se aglutinan en el fondo de la celda bloqueando los electrodos (Figura 22a).

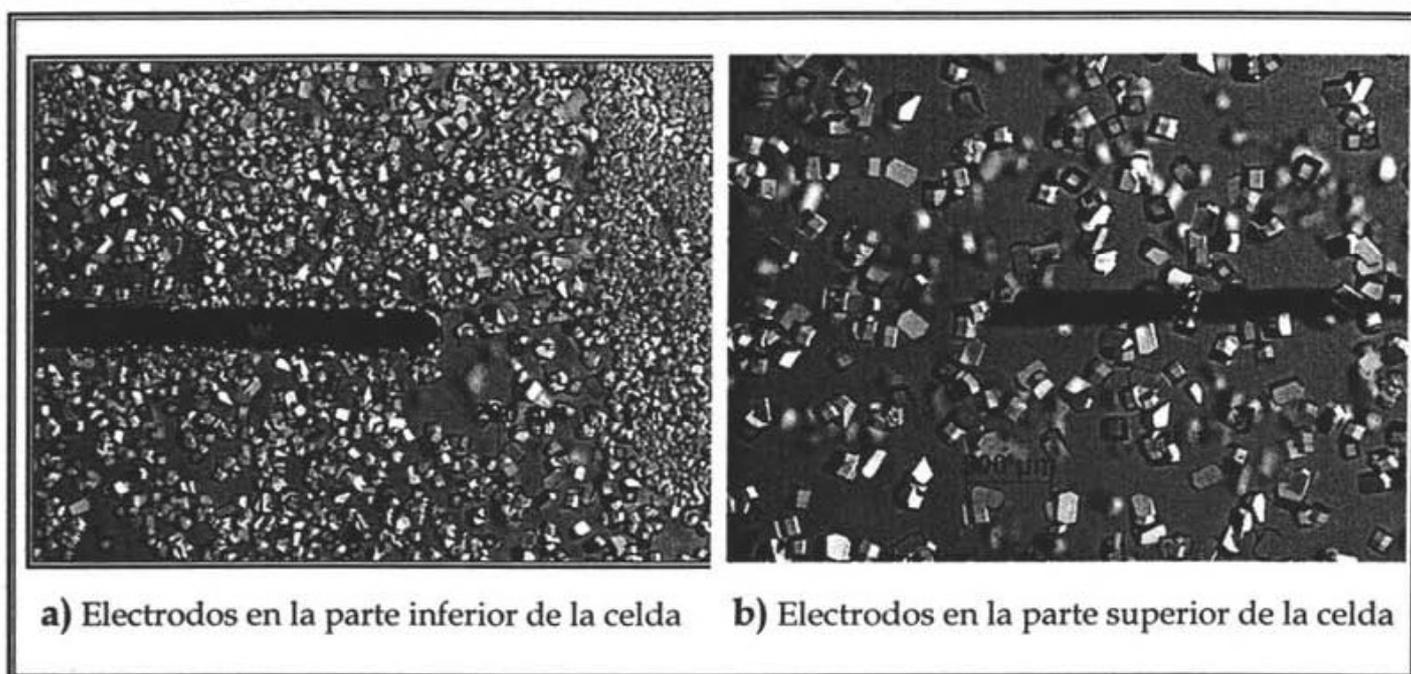


Figura 22: a) Experimento en disolución donde se observa a los cristales aglutinados en el fondo bloqueando el electrodo, debido al efecto de la fuerza de gravedad. b) Experimento en disolución realizado con los electrodos colocados en la parte superior de la celda, con lo que se evitó el efecto negativo de la fuerza de gravedad sobre la cristalización. Ambos experimentos fueron observados en el cátodo bajo la imposición de un potencial eléctrico (-0.5V) durante 24 horas, dentro de una celda tipo A con electrodos de Pt (200 μ m de diámetro) [Lisozima] = 30mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL en buffer de acetatos a pH 4.5 y 18°C.

Debido al problema de sedimentación sobre los electrodos que ha sido descrito en los experimentos realizados en disolución, se decidió trabajar con las celdas invertidas, es





decir, en una posición donde los electrodos quedan en la parte superior de la celda (Figura 23) evitando dicho efecto negativo.

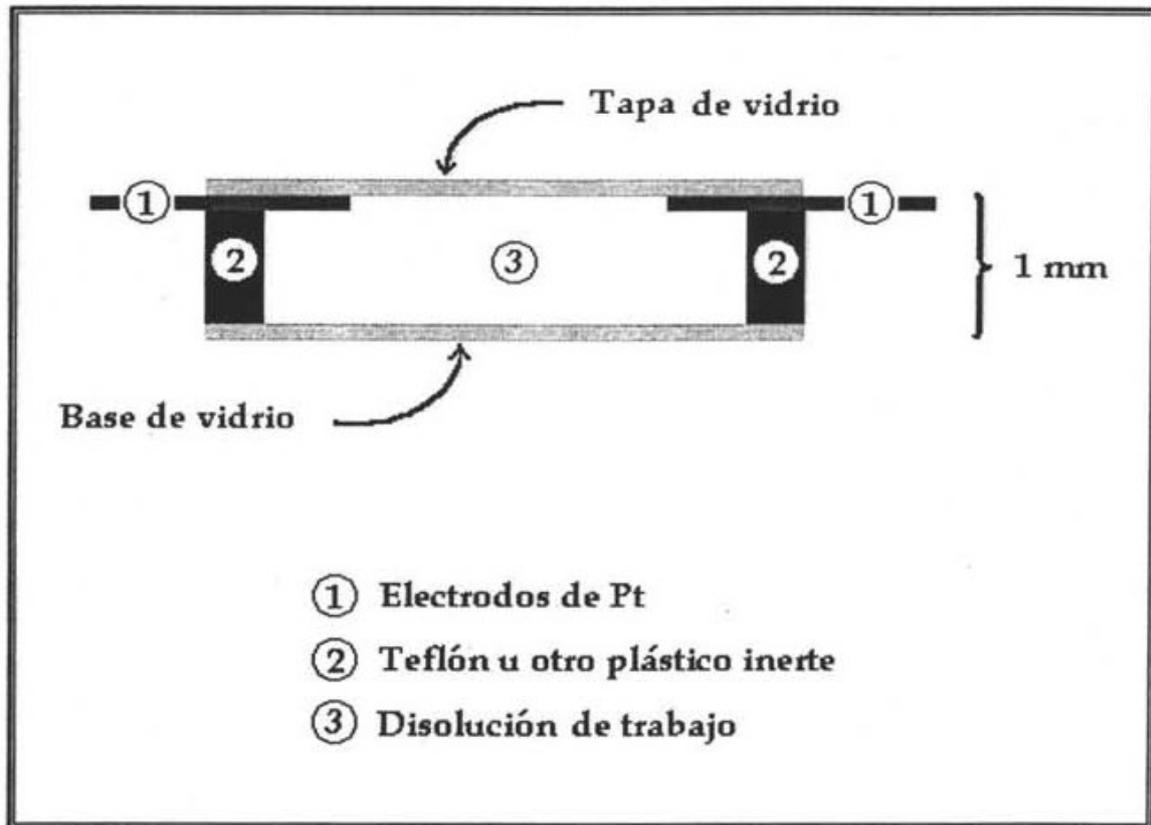


Figura 23: Corte lateral de una celda tipo A en la posición en que se realizaron los experimentos a potencial controlado. Los electrodos se colocan en la parte superior de la celda para poder observar el efecto del campo eléctrico generado por la imposición de potencial, sin que los cristales formados bloqueen los electrodos.

La temperatura fue otra de las variables que se tomó en cuenta para estudiar la cristalización de lisozima, en este caso las condiciones de cristalización reportadas indicaban que 18°C es la temperatura óptima para cristalizar lisozima. Sin embargo, se probaron otras tres temperaturas (15, 25 y 30°C) encontrando que a 30°C la lisozima no cristalizaba, pero a 15°C se obtenían cristales mejor formados y de mayor tamaño que con una cristalización a 18°C, por lo que se decidió trabajar a 15°C.





VI.2.3 Efecto de la imposición de potencial

El estudio a diferentes valores de potencial, dentro del intervalo donde no se observan reacciones del disolvente en las barreras (-0.5 a 0.5 V), permitió observar un claro efecto sobre el tiempo de cristalización y el tamaño de los cristales. Al realizar los experimentos en disolución se reduce el tiempo de cristalización de 48 horas a 24 horas, adicionalmente cuando se impone un potencial este tiempo se reduce a solo 12 horas, es decir, se obtienen los cristales de su tamaño final en la mitad del tiempo en el que se observa el crecimiento óptimo para los experimentos control. Sin embargo, para poder comparar el tamaño de los cristales, todos los experimentos se dejaron cristalizar durante 24 horas, tiempo requerido para que los cristales del control obtengan su tamaño final.

Usualmente la velocidad de cristalización es mayor en disolución que en gel, pero la calidad de los cristales obtenidos no es óptima para su difracción en rayos X. Sin embargo los cristales que se obtuvieron bajo la imposición de potencial en 0.5 y -0.5 V tienen el tamaño, la forma y calidad adecuadas para realizar dichos estudios.

La influencia del potencial sobre el tamaño de los cristales se muestra claramente en la figura 24, donde se observa que a mayor potencial (positivo o negativo) el tamaño de los cristales aumenta y conforme se acerca el potencial a 0 V el tamaño va disminuyendo hasta equipararse en tamaño con los del control.



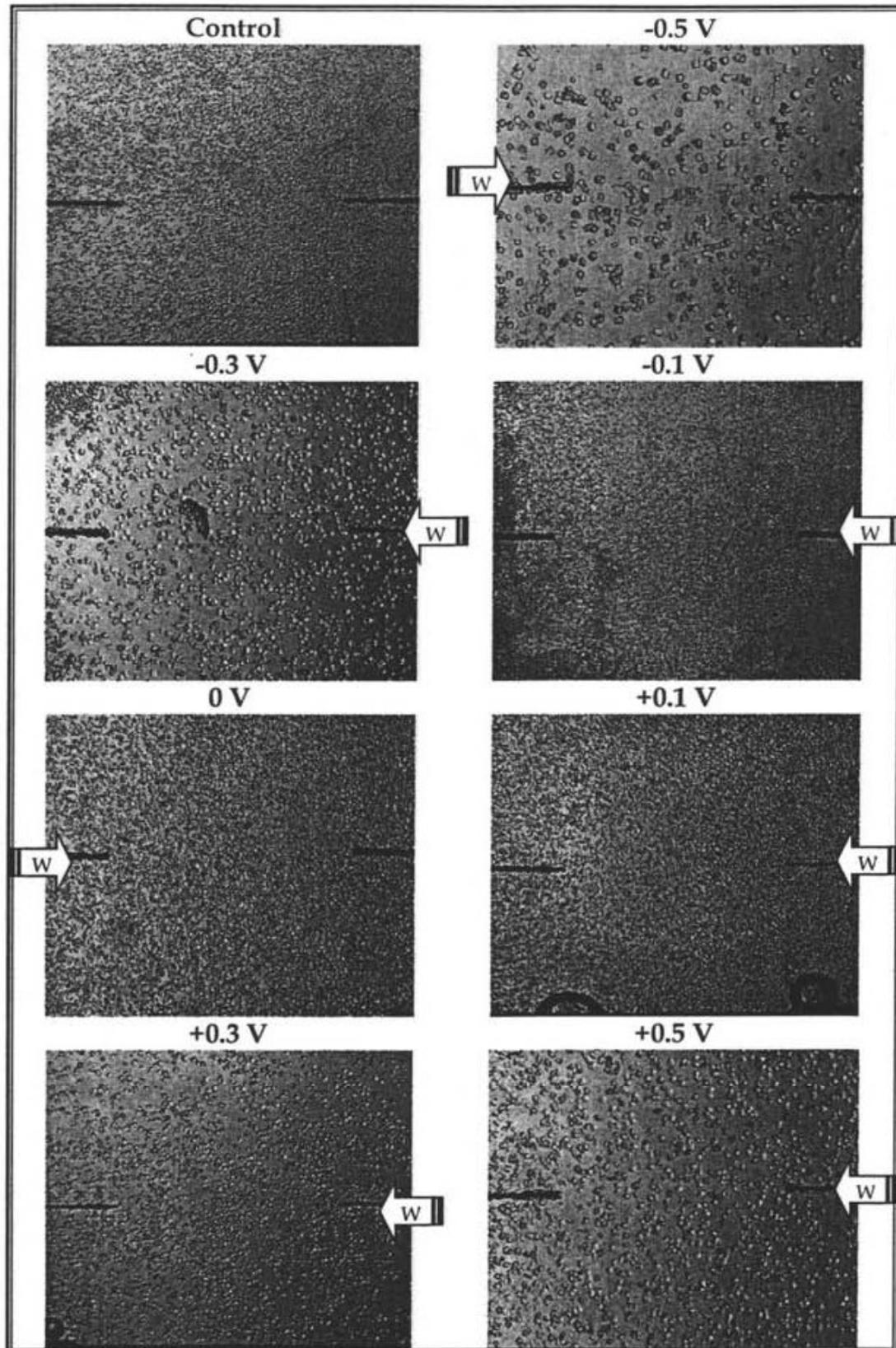


Figura 24: Cristales obtenidos bajo la imposición de diferentes potenciales durante 24 horas en una celda tipo A con electrodos de Pt ($200\mu\text{m}$ de diámetro) [Lisozima] = 30mg/mL , [NaCl] = 40mg/mL en buffer de acetatos a pH 4.5 y 15°C . Las flechas indican el electrodo de trabajo para cada experimento.





La Figura 25 muestra el tamaño de los cristales con respecto al potencial impuesto. El tamaño de cristal que se obtiene en las mejores condiciones ($-0.5V$, $T=15^{\circ}C$) es del orden de $400\ \mu m$ en 24 horas de cristalización y las condiciones menos favorables para la cristalización fueron a un potencial de $-0.1V$ donde se obtienen cristales de $100\ \mu m$ en el mismo tiempo.

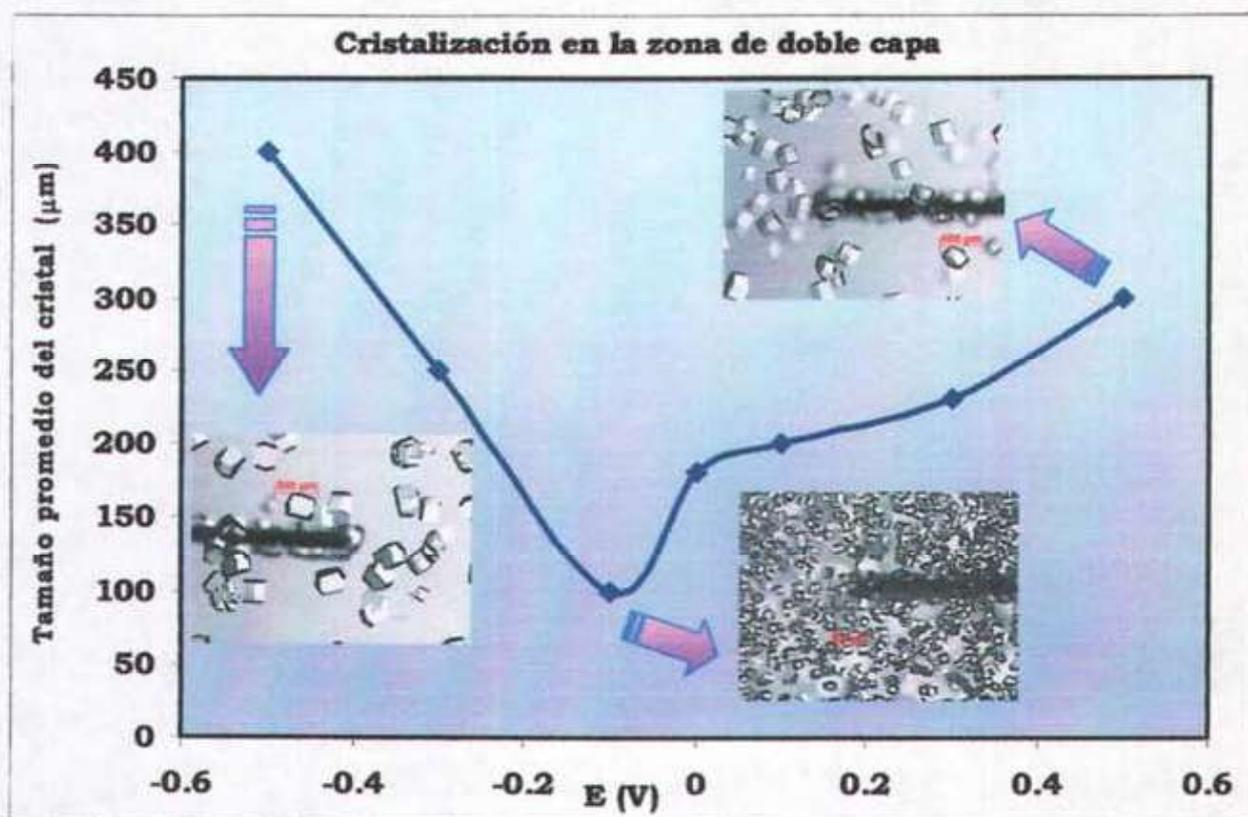


Figura 25: Gráfica del tamaño promedio del cristal vs el potencial impuesto. Cristalizaciones realizadas en una celda tipo A con electrodos de Pt ($200\ \mu m$ de diámetro) durante 24 horas, $[Lisozima] = 30\ mg/mL$, $[NaCl] = 40\ mg/mL$ en buffer de acetatos a pH 4.5 y $15^{\circ}C$.

A diferencia de los experimentos en gel a corriente controlada, en estos experimentos realizados en disolución a potencial controlado, no se observa ninguna preferencia de cristalización hacia alguno de los electrodos, y los cristales tienen un tamaño homogéneo en la totalidad de la celda (Figura 26).



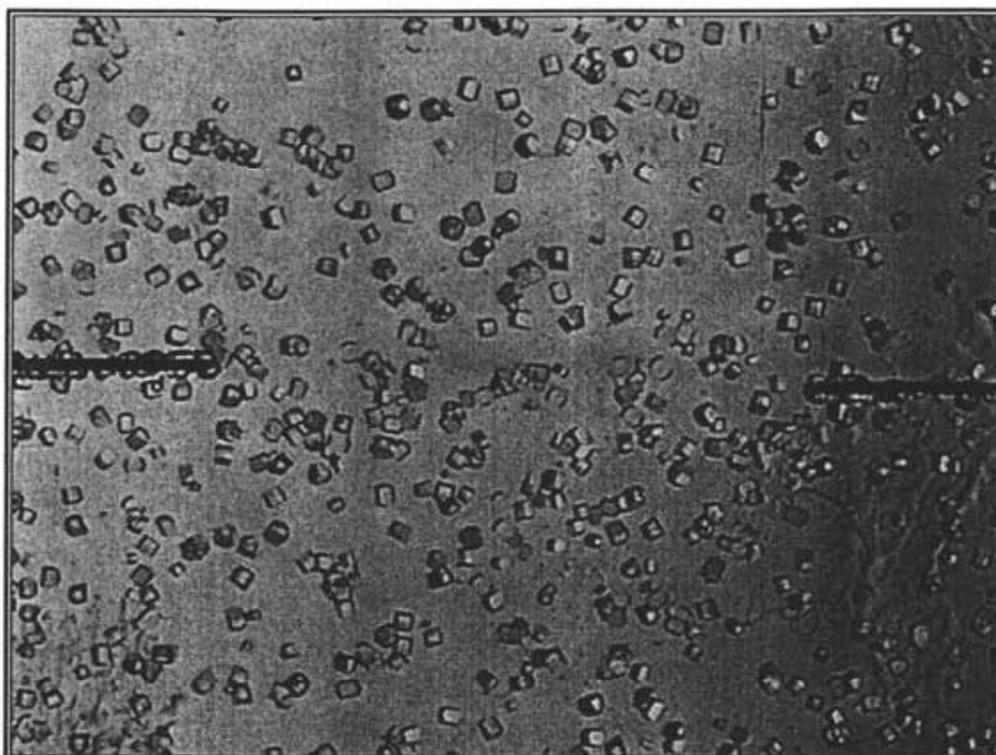


Figura 26: Cristales obtenidos bajo la imposición de un potencial (-0.5V) durante 24 horas en una celda tipo A con electrodos de Pt (200 μm de diámetro). [Lisozima] = 30mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL en buffer de acetatos a pH 4.5 y 15°C.

En estas condiciones no se observa desprendimiento de gases, lo que confirma que en los valores de potencial estudiados no se presentan las reacciones electroquímicas observadas a corriente controlada. En estos valores de potencial la corriente que circula jamás alcanza valores tan altos estabilizándose a un valor constante (en el intervalo de nA) minutos después de haber cerrado en circuito eléctrico (Figura 27).



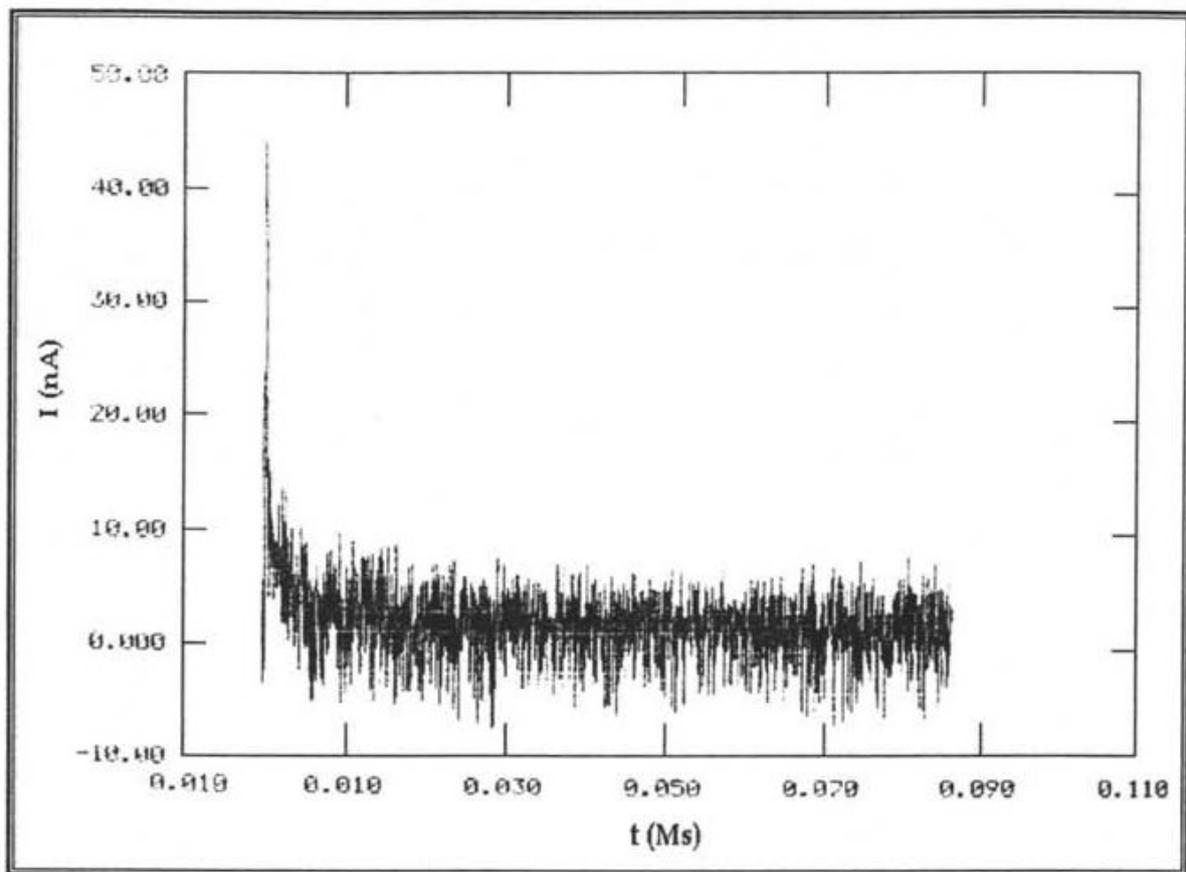


Figura 27: Cronoamperograma del experimento de cristalización imponiendo un potencial de 0.5 V durante 24 horas (86 400 segundos).

Cuando los experimentos se realizan a $\pm 0.5V$ y $18^{\circ}C$ (temperatura óptima reportada para crecimiento de lisozima en disolución⁷), los cristales obtenidos son más chicos equivalentes a los obtenidos a $\pm 0.3V$ a $15^{\circ}C$ (Figura 24), lo que pone en evidencia que la temperatura óptima para llevar a cabo los experimentos con imposición de un campo eléctrico interno en disolución es de $15^{\circ}C$. Estos resultados no mejoran a otros valores de potencial, dentro del intervalo estudiado.





VI.2.3.1 Cristalización de lisozima en gel

Generalmente las cristalizaciones en gel presentan una mejor calidad en los cristales, además de generar cristales de buen tamaño, mayores que los obtenidos en disolución. Por tal motivo se decidió realizar el mismo estudio de imposición de potencial en la cristalización de lisozima, utilizando la disolución batch de lisozima en gel. Sin embargo, en todo el intervalo de potenciales estudiado, se observó prácticamente el mismo tamaño en los cristales (Figura 28). No obstante los cristales obtenidos bajo imposición de potencial crecieron más grandes que los controles. Esto quiere decir, que la imposición de potencial sí afecta el tamaño del cristal, pero dentro del intervalo donde no hay reacciones electroquímicas, este potencial no es suficientemente fuerte para influenciar un cambio en el tamaño del cristal en cada valor de potencial.

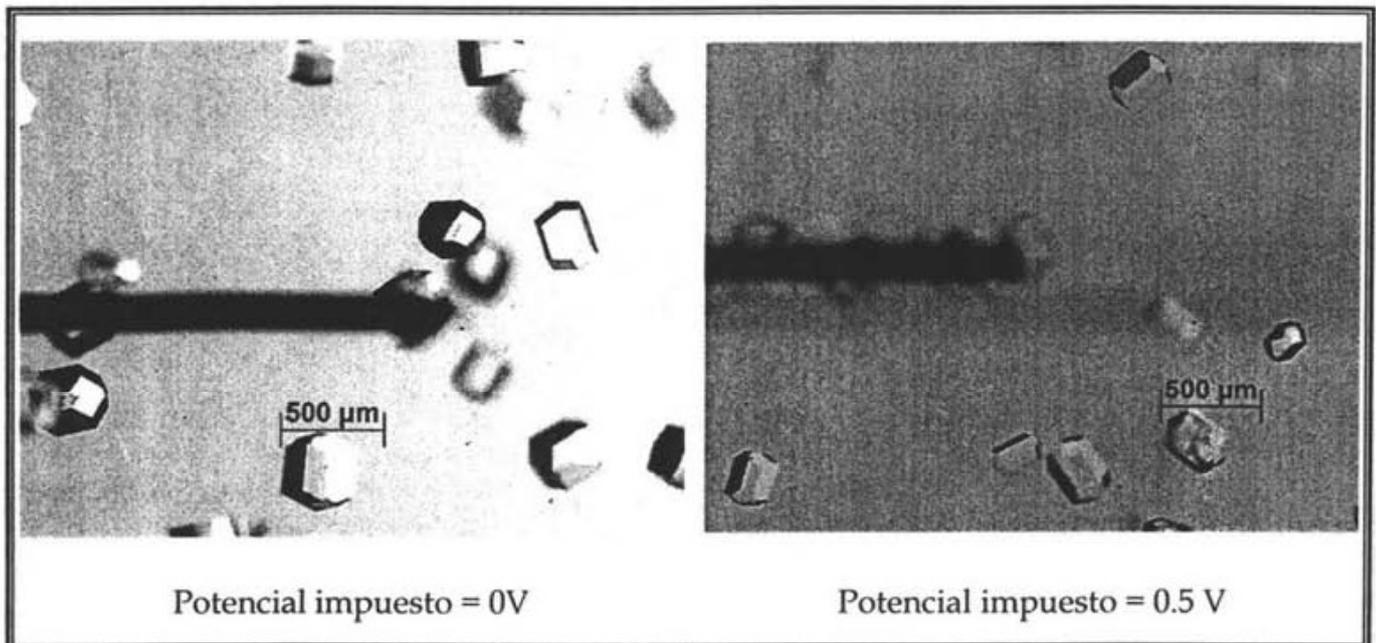


Figura 28: Cristales obtenidos en el electrodo auxiliar (-) bajo la imposición de potencial, durante 24 horas en una celda tipo A con electrodos de Pt (200 μ m de diámetro) [Lisozima] = 30mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL y [agarosa] = 0.066% w/v en buffer de acetatos a pH 4.5 y 15°C.





A diferencia de las cristalizaciones en disolución bajo imposición de potencial, cuando se cristaliza en gel sí se observa la tendencia por cristalizar cerca del electrodo negativo (cátodo). Sin embargo, esta preferencia sólo es evidente en la superficie del electrodo, es decir, los cristales se pegan en la superficie del cátodo sin afectar el tamaño de los cristales en el resto de la celda. Este fenómeno está de acuerdo con la presencia de la electromigración, porque a pesar de circular corriente por el sistema, a potencial controlado ésta es mucho menor y el efecto de la migración de la lisozima sólo se observa muy cerca del electrodo, en el resto de la celda los cristales presentan un tamaño homogéneo. Este fenómeno se muestra en la Figura 29, donde podemos observar que bajo la imposición de un potencial de 0V no se observan los cristales pegados en el electrodo. En contraste, el electrodo auxiliar (-) bajo la imposición de un potencial de 0.5V presenta crecimiento de cristales sobre la superficie del electrodo.

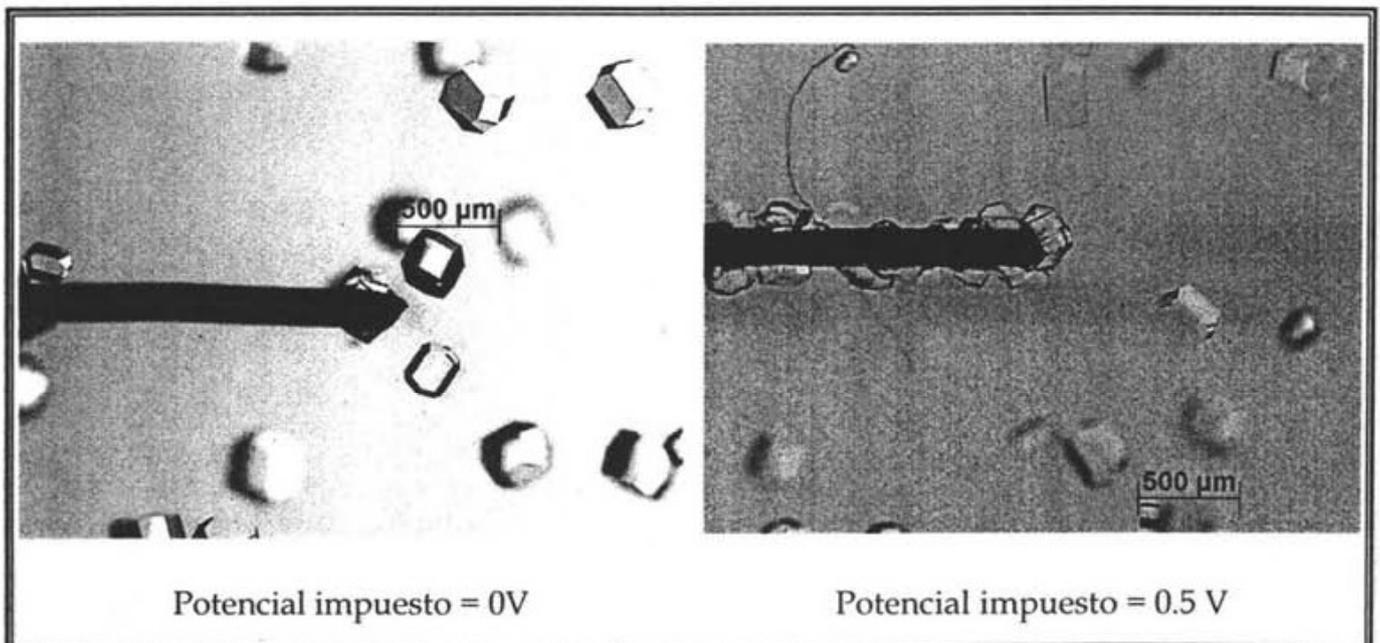


Figura 29: Fotografía de las cercanías del electrodo auxiliar (-) bajo la imposición de potencial, durante 24 horas en una celda tipo A con electrodos de Pt (200 μ m de diámetro). [Lisozima] = 30mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL en buffer de acetatos a pH 4.5 y 15°C.





El análisis de los experimentos anteriores nos permite observar que la fuerza generada por un campo eléctrico es diferente si se aplica una corriente eléctrica constante o un potencial constante.

Los potenciales impuestos durante las cristalizaciones realizadas no generan corrientes muy altas (del orden de nA, Figura 27) y, por lo tanto, el efecto de la migración es mayor a corriente controlada que a potencial controlado, es decir, la velocidad de transporte por migración fue menor en los experimentos realizados a potencial constante.

Por otro lado, sabemos que las cristalizaciones en gel también disminuyen la velocidad de movimiento de las moléculas, teniendo en disolución una mayor velocidad en el transporte de masa.

Estos fenómenos se ven reflejados en la cristalización de proteínas como lo observamos en la Tabla 4.

Tabla 4a: Diferencias entre la cristalización de lisozima en gel y en disolución, a una corriente constante de $2\mu\text{A}$ /circuito

Parámetro evaluado	Cristalización realizada en:	
	Gel	Disolución
Nucleación:	Controlada	Masiva
Tamaño de los cristales:	Grandes	Pequeños
Direccionalidad hacia el cátodo:	Alta	Muy alta
Tiempo de cristalización:	24 hrs.	12 hrs.
Velocidad de movimiento en las partículas:	Media	Alta





Tabla 4a: Diferencias entre la cristalización de lisozima en gel y en disolución bajo la imposición de potencial (entre 0.5 y -0.5V, por donde circulo una corriente del orden de nA).

Parámetro evaluado	Cristalización realizada en:	
	Gel	Disolución
Nucleación:	Controlada	Control medio
Tamaño de los cristales:	Grandes	En función del potencial impuesto
Direccionalidad hacia el cátodo:	Sólo en las cercanías del electrodo.	No presenta
Tiempo de cristalización:	24 hrs.	12 hrs.
Velocidad de movimiento en las partículas:	Muy Baja	Baja

Como ya se ha mencionado, una cristalización de buena calidad busca que la velocidad con la que llegan las moléculas a la superficie del cristal (velocidad de transporte) sea igual o menor a su velocidad de reorganización sobre la superficie (cinética de superficie).¹⁹ Las tablas 4a y 4b nos muestran que, bajo la influencia de un campo eléctrico, la menor velocidad de movimiento en las partículas se presenta en los experimentos en gel a potencial controlado. Sin embargo, a esta velocidad de transporte la cristalización es muy lenta requiriendo de 24 horas para obtener los monocristales de proteína, por lo tanto, si lo que se quiere es mejorar el tiempo de la cristalización sin disminuir la calidad del monocristal, se deben realizar las cristalizaciones a una velocidad de transporte muy cercana a la velocidad con la que se acomodan las moléculas sobre la superficie del cristal. Esto llevará a una cristalización de buena calidad en el menor tiempo posible. Lo anterior lo podemos observar en los experimentos a potencial controlado en disolución, ya que en estas condiciones experimentales un cambio en el potencial aplicado (pequeña variación de





corriente) provoca una variación notable en el tamaño del cristal, lo cual implica que se está trabajando a una velocidad de transporte de moléculas muy cercana a la velocidad de su reorganización sobre la superficie del cristal.

Los resultados anteriores nos permitieron obtener, a un potencial controlado de $-0.5V$ en disolución durante 12 horas, cristales del mismo tamaño que los obtenidos en 24 horas en gel a potencial controlado. Los experimentos en disolución a $-0.5V$ generan una velocidad de transporte de moléculas ligeramente menor que la velocidad con la que se acomodan las moléculas dentro del cristal, es decir, se obtienen cristales de buena calidad en el menor tiempo posible.

Estos resultados permiten distinguir que los experimentos a potencial controlado en disolución proporcionan las condiciones idóneas para estudiar la velocidad de reorganización de las moléculas sobre la superficie del cristal, es decir, permite el estudio de la cinética de superficie para la lisozima.

VI.2.4 Estudio del potencial de carga cero

Dentro del estudio electroquímico también se realizaron experimentos de cronocoulombimetría, los cuales se llevaron a cabo en disolución y bajo las mismas condiciones de las cristalizaciones a potencial controlado. Con esta técnica se estudió la carga de la doble capa, para encontrar el potencial de carga cero (PC_0). Esto permitiría comprender un poco más el fenómeno de la electromigración de lisozima a partir de la distribución de cargas en los electrodos.

Para realizar dichos experimentos se construyó una celda con tres electrodos, en donde se incluye un electrodo de referencia de $Ag/AgCl$. Esta celda se construyó igual que las celdas de cristalización tipo A (Figura 10), solo que adicionalmente se le





colocó el electrodo de referencia a una distancia equidistante de los electrodos. Para construir este electrodo se usó un capilar sellado con platino y lleno de una disolución saturada de KCl, en donde se introdujo un alambre de plata. (Figura 28 y Anexo II).

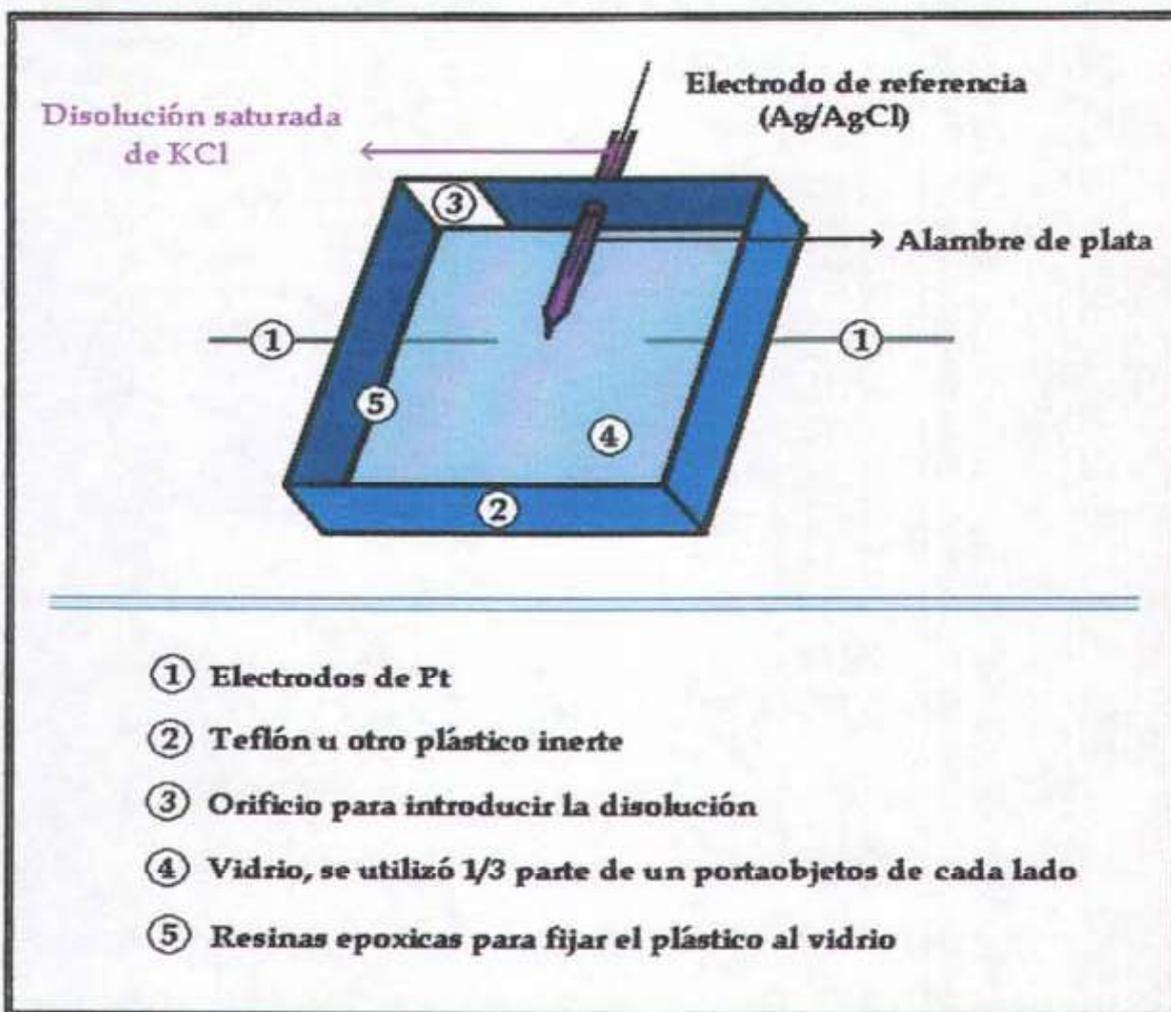


Figura 28: Celda de cristalización con tres electrodos, utilizada para los experimentos de cronocoulombimetría

En dichas celdas y con el medio de cristalización ($\text{NaCl} = 40 \text{ mg/mL}$ en buffer de acetatos a $\text{pH} = 4.5$ y $T = 15^\circ$) se hicieron experimentos de cronocoulombimetría a diferentes valores de potencial (E_2), dentro del intervalo donde se presentaban las





barreras del medio (barrera catódica = $-0.5V$ y barrera anódica = $1.1V$)^{††}. El potencial inicial (E_1) fue el potencial de corriente nula, el cual se obtuvo mediante una cronopotenciometría a corriente nula durante 3 horas. El tiempo de carga fue de 1 segundo (τ), dejando pasar el doble de tiempo (2τ) para que se descargara la interfase. El programa de perturbación para dichos experimentos se presenta en la Figura 29. Este consistió en cinco pulsos de potencial, observando que en el quinto pulso se presenta la mayor carga y por lo tanto es con esta carga con la que se observan mejor las diferencias presentes en el intervalo de potencial estudiado.

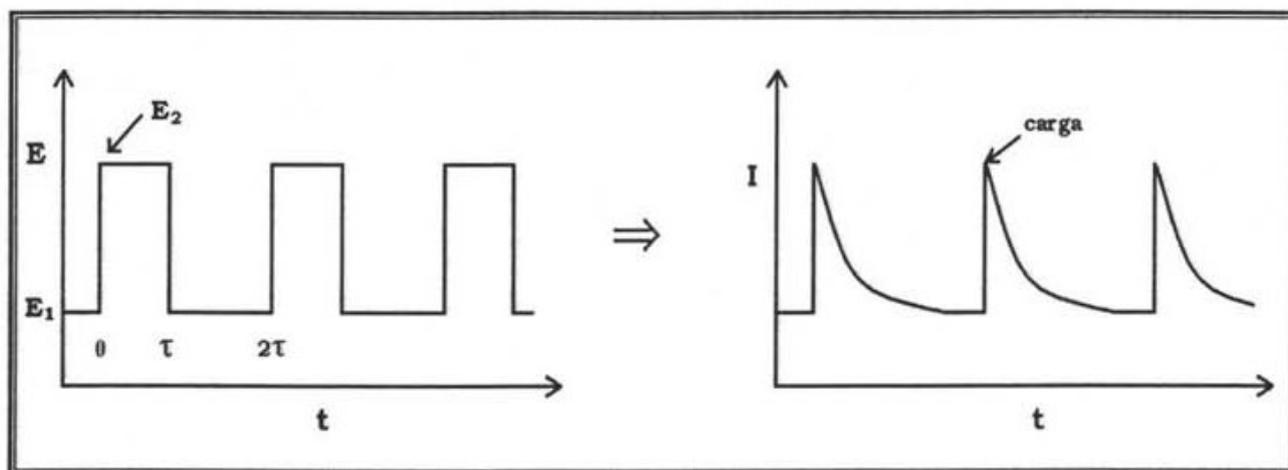


Figura 29: Programa de perturbación empleado en los experimentos de cronoculombimetría y su respuesta tipo. Potencial inicial (E_1) = Potencial a corriente nula = $0.34V$ para el medio de cristalización y $0.25V$ para el medio con lisozima. Potencial de pulso (E_2) = $-0.45, -0.30, -0.15, 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75, 0.90$ y $1.05 V$ (se corrió un programa de perturbación para cada potencial). Tiempo del pulso (τ) = $1s$, tiempo de descarga (2τ) = $2s$. Experimentos realizados en una celda de tres electrodos: $E_T = Pt$, $E_{aux.} = Pt$ ($200\mu m$ de diámetro), $E_{ref.} = Ag/AgCl$

El programa de perturbación anterior se aplicó a diferentes potenciales dentro de las barreras ($E_2 = -0.45, -0.30, -0.15, 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75, 0.90$, y $1.05V$), obteniendo para cada potencial la carga de la doble capa del quinto pulso y graficándola contra el potencial de pulso (E_2). El procedimiento anterior se realizó tanto en presencia como en ausencia de lisozima y las gráficas se muestran en la Figura 30.

^{††} Estas barreras cambiaron respecto a las obtenidas en el voltamperograma de la Figura 21, debido a que en este caso fueron obtenidas contra un electrodo de referencia de $Ag/AgCl$.



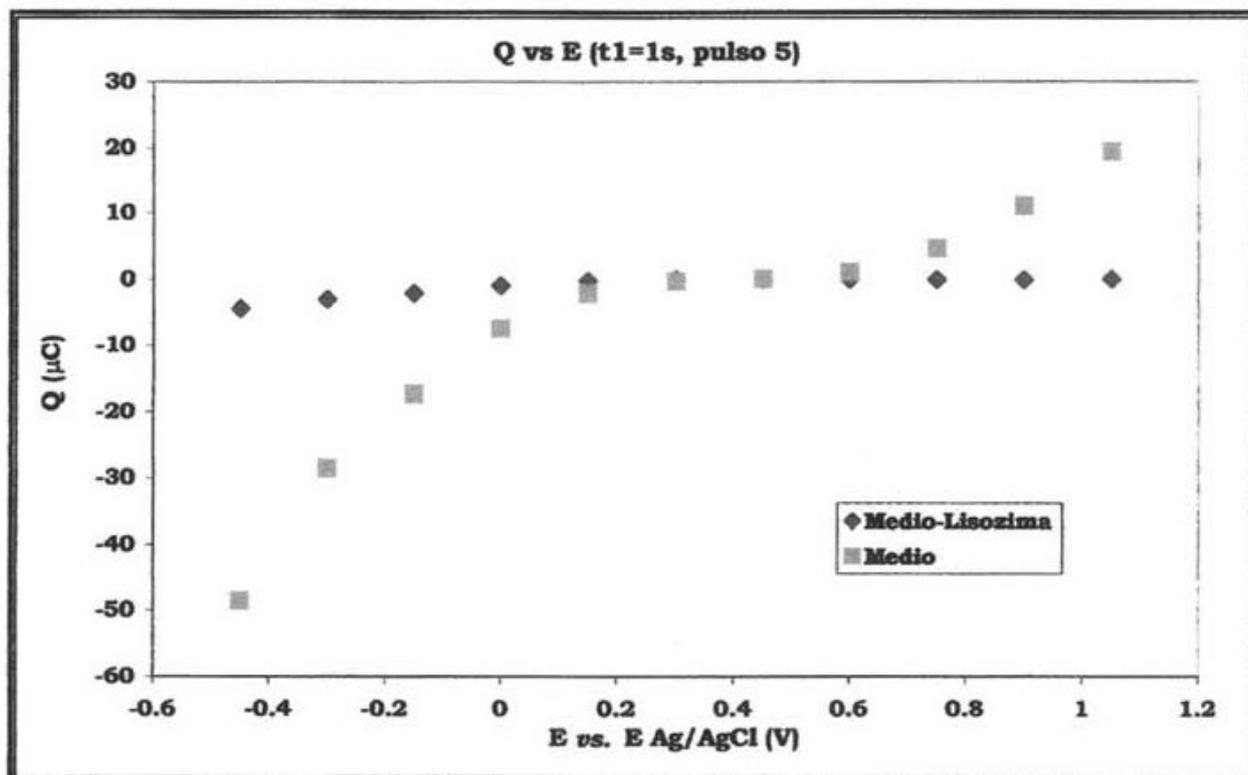


Figura 30: Gráfica de carga de la doble capa vs el potencial. Carga medida en el quinto pulso con un tiempo de carga de 1 segundo. Medio: [NaCl] = 40 mg/mL en buffer de acetatos a 200 mM, pH 4.5 y 15°C. Medio-Lisozima: [Lisozima] = 30 mg/mL, [NaCl] = 40 mg/mL en buffer de acetatos a 200 mM, pH 4.5 y 15°C. Experimentos realizados en una celda de tres electrodos: $E_T = Pt$, $E_{aux} = Pt$ (200µm de diámetro), $E_{ref} = Ag/AgCl$

Es importante destacar que las curvas del medio y del medio-lisozima presentan la misma tendencia registrada en voltamperometría cíclica (Figura 21).

De la gráfica anterior se obtuvo la capacitancia diferencial o capacitancia de la doble capa (dq/dE), la cual se graficó contra el E promedio (Figura 31). Esta capacitancia se obtuvo sólo para el medio de cristalización, debido a que fue ahí donde se observó el mayor cambio en la carga de la doble capa.



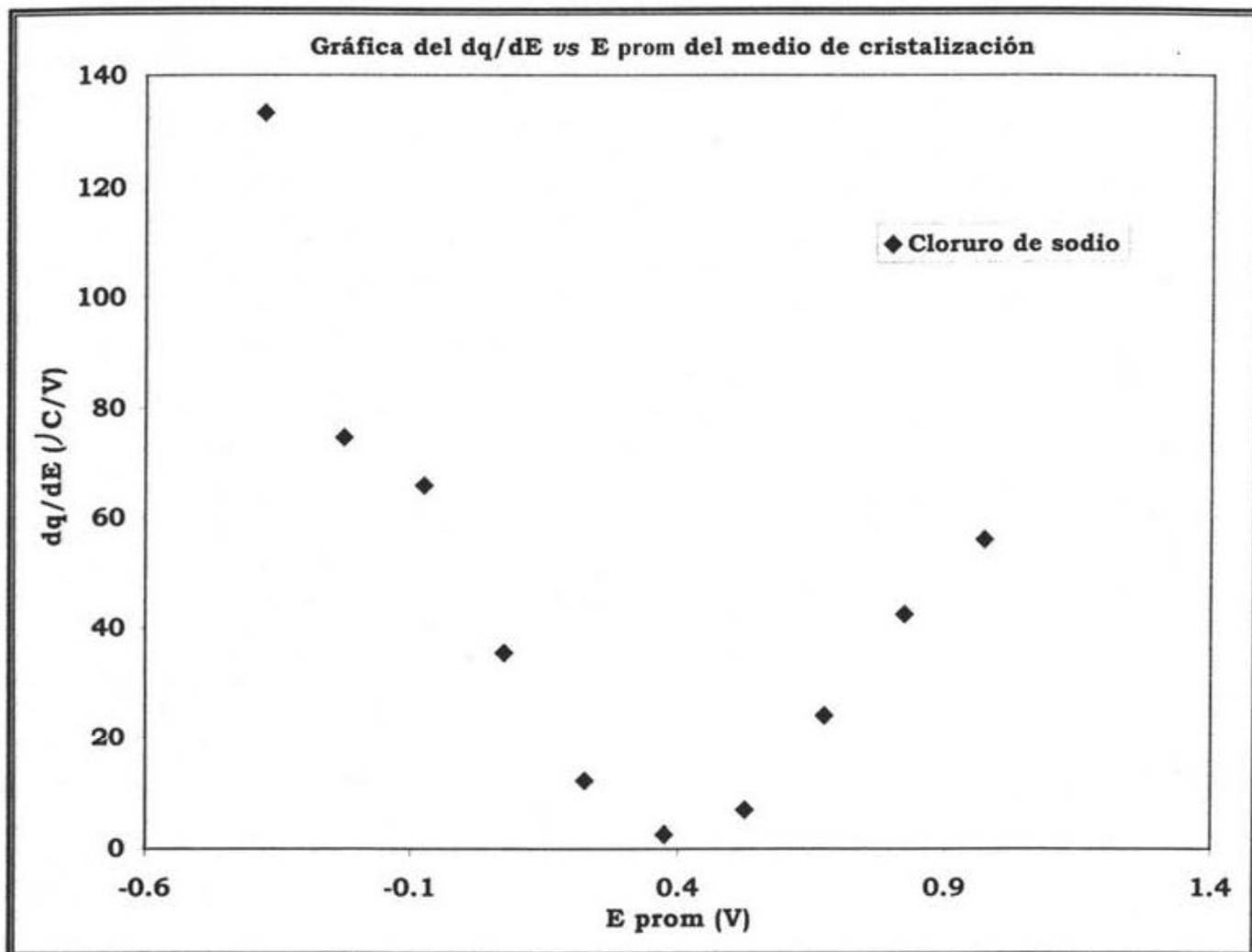


Figura 31: Gráfica de carga de la doble capa vs el potencial promedio, del medio de cristalización para la lisozima. Carga medida en el quinto pulso, utilizando un tiempo de carga de 1 segundo.

De esta última grafica se obtiene el potencial de carga cero, potencial en el cual la gráfica presenta un mínimo, cuyo valor fue de 0.375V. Esto quiere decir que en el medio de cristalización para lisozima, a partir de este potencial y hacia valores más positivos la doble capa está cargada positivamente, por el contrario hacia valores menores de potencial la doble capa está cargada negativamente. El potencial de carga cero obtenido fue ligeramente mayor que el potencial a corriente nula (0.34V), lo cual permite observar que, aún sin imponer corriente eléctrica, el acomodo de las moléculas en la doble capa genera una carga negativa que atrae a las moléculas de





lisozima, como fue observado en los controles experimentales (sin imposición de campo eléctrico).

Estos resultados nos permitieron explicar a partir de que potencial, puede migrar la lisozima dentro del campo eléctrico generado por la imposición de potencial. Ésta es posiblemente la razón por la cual la gráfica de potencial *vs.* tamaño de cristal, no es simétrica alrededor de la imposición de un potencial de 0 V. Por otro lado, cerca del potencial de carga cero (0.375V), donde la carga del electrodo de trabajo es 0 y por lo tanto la lisozima no es atraída hacia la superficie del electrodo, se presenta un aumento en la nucleación y los cristales tienen un tamaño menor y más irregular.

Esta gráfica se compara satisfactoriamente con la observada por el tamaño de los cristales *vs.* E y el potencial no corresponde dado que la referencia usada en ambos experimentos no fue la misma.

VI.2.5 Pruebas preliminares con catalasa

Finalmente se decidió aplicar el mismo procedimiento experimental a potencial controlado para la cristalización de otra proteína como lo es la metaloenzima catalasa de hígado de bovino, la cual es bien conocida en investigaciones electroanalíticas redox. Estas enzimas redox son electroactivas, por lo que su estudio requiere de una selección cuidadosa del valor de potencial, para evitar cualquier posible degradación de la enzima por cambios en el estado redox.

Para seleccionar el potencial al cual se llevaría a cabo la cristalización, se realizó un voltamperograma cíclico de la catalasa, que mostró el intervalo de potencial en el cual las reacciones electroquímicas no ocurren (entre -0.7 y +0.2V). Por lo tanto se llevó a cabo la cristalización de la metaloenzima bajo una imposición de -0.7V a 15°C en las





condiciones descritas en la parte experimental. Los resultados se muestran en la Figura 32.

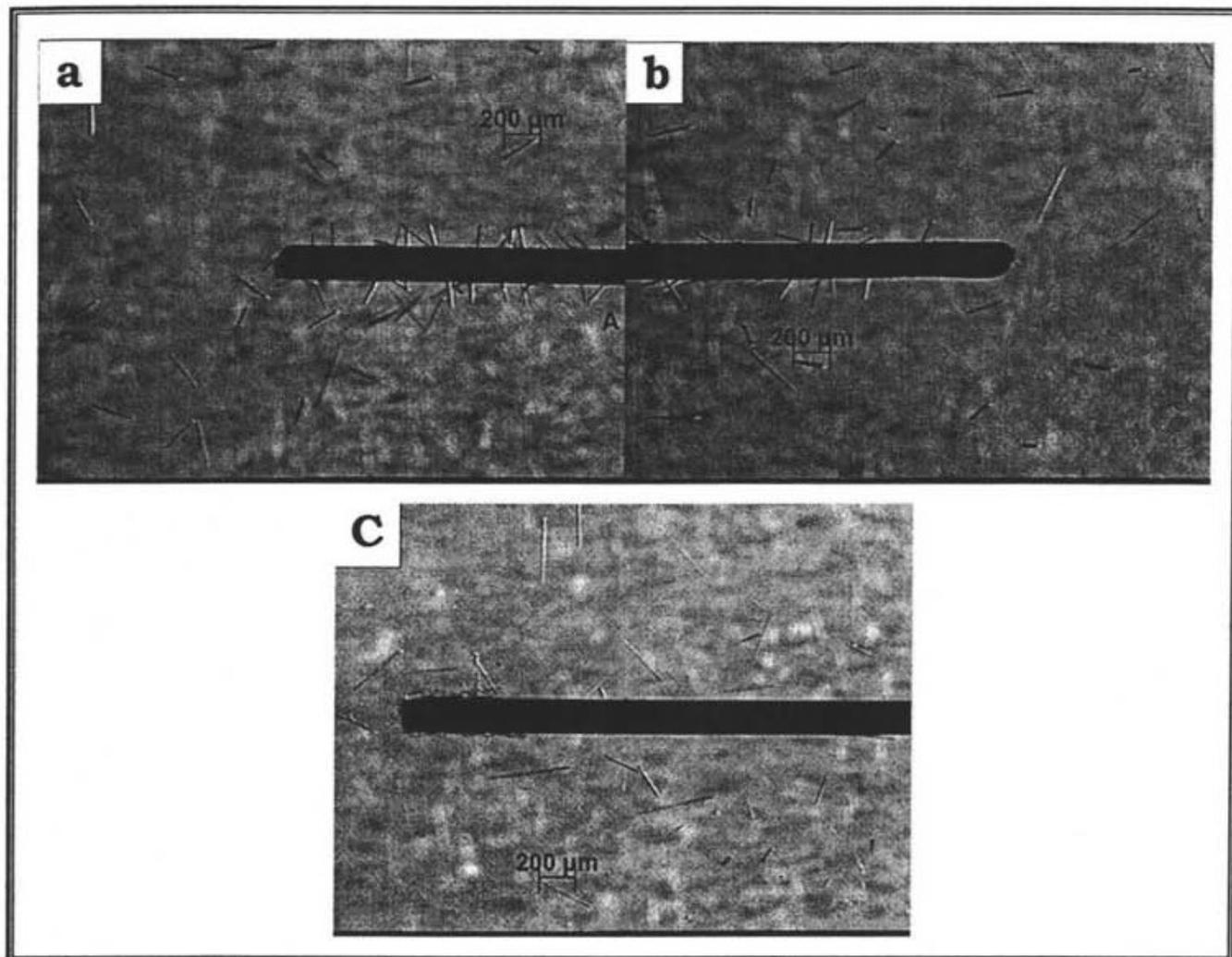


Figura 32: Cristales de catalasa obtenidos a -0.7 V en una celda tipo D durante 24 horas. a) ánodo, b) cátodo y c) control. Condiciones de cristalización: [Catalasa] = 10 mg/mL en buffer Tris-HCl a pH 8.5 y citrato de sodio 4% w/v, $T=15^{\circ}\text{C}$.

Los cristales crecidos bajo la imposición de potencial tienen la misma forma física que los del control, sin embargo éstos están orientados sobre los electrodos (en el control no se observa este fenómeno). En el ánodo se observa una mayor orientación de los cristales que en el cátodo, esto se puede explicar otra vez por el fenómeno de electromigración, debido a que la catalasa tiene un pI de 5.5 y al pH de trabajo





presenta una carga negativa. Por lo tanto la metaloenzima migra hacia el ánodo (electrodo positivo) en donde cristaliza principalmente orientándose sobre el ánodo, y por lo tanto es ahí donde se observa mayor número de cristales (Figura 32).

El tamaño del cristal no fue drásticamente afectado con la imposición del campo, ya que tanto en el ánodo como en el cátodo, e incluso en el control, se observa básicamente el mismo tamaño de cristal. Estos resultados indican que el crecimiento de los cristales es rápido, bajo las condiciones experimentales utilizadas, y que el campo eléctrico no afecta considerablemente el tamaño de los cristales de la catalasa. Posiblemente la calidad sea diferente, porque los cristales obtenidos bajo imposición de potencial se observan mejor definidos, pero para confirmarlo se requeriría hacer experimentos de difracción de rayos X.





VII. CONCLUSIONES





VII. CONCLUSIONES

VII.1 Cristalizaciones con imposición de corriente.

En los experimentos realizados en gel a corriente controlada, se observó una cristalización favorecida hacia el cátodo y fue en estos electrodos donde se obtuvieron los cristales de mayor tamaño. En el ánodo la cristalización es mínima y los cristales son pequeños.

En general, se logró aumentar el tamaño de los cristales, ya que en todos los casos los cristales crecidos bajo imposición de corriente son de mayor tamaño que los cristales obtenidos sin la imposición de ésta (experimentos control).

Se logró disminuir el tiempo de cristalización de 48 horas a sólo 24 horas, gracias a la imposición de un campo eléctrico interno.

El diseño y fabricación de cuatro diferentes celdas nos permitió observar el comportamiento de la cristalización bajo la influencia de diferente número de electrodos, en combinaciones de polaridad diversas. Con la celda tipo D se logró el mayor tamaño de los cristales y se observó claramente el efecto del campo eléctrico en el menor tiempo de cristalización.

Conforme aumenta el número de electrodos disminuye el tiempo de nucleación (aparecen más rápido los núcleos), pero ésta es menos controlada y de poca eficiencia debido a los gases presentes provenientes de reacciones redox en mayor cantidad.

Celdas con polaridades alternadas (cátodo-ánodo-cátodo-ánodo-etc) permiten una mejor distribución de la corriente y reducen las reacciones redox presentes por la





imposición de corriente eléctrica. Esto genera un menor número de burbujas permitiendo una nucleación controlada y un mayor tamaño de los cristales.

VII.2 Cristalizaciones con imposición de potencial.

Realizando los experimentos en disolución bajo la imposición de potencial, se logró disminuir el tiempo de cristalización a menos de 12 horas y mejorar la calidad de los cristales normalmente obtenidos en estas condiciones.

Se evitó la interferencia de la fuerza de gravedad sobre los experimentos realizados en disolución, manipulando la posición de la celda, lo que permitió observar el efecto del potencial sobre la cristalización.

Se estudió el efecto del potencial, obteniéndose la dependencia del tamaño del cristal con respecto al potencial impuesto. Esto nos permitió encontrar las condiciones experimentales donde se pueden obtener los mejores cristales, tanto en tamaño como en calidad (-0.5V a $T=15^{\circ}\text{C}$, ver Tabla 5). Adicionalmente el control de potencial abre el campo de estudio para la cinética de superficie de lisozima.

Los experimentos con catalasa sustentaron la posibilidad de extrapolar esta técnica de electromigración de proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico interno, al mismo tiempo que mostraron cambios importantes en la orientación y definición de los cristales obtenidos provocados por el potencial aplicado.

La determinación del potencial de carga cero, permitió explicar la forma de la curva tamaño *vs.* potencial y abrir un mejor panorama al entendimiento de los fenómenos de cristalización de proteínas influenciada por un campo eléctrico interno.





Finalmente la Tabla 5 muestra las condiciones óptimas para cristalizar lisozima y catalasa, obtenidas de los métodos desarrollados en la presente tesis.

Tabla 5: Condiciones óptimas para la cristalización de las proteínas lisozima y catalasa.

	Lisozima	Catalasa^{††}
Concentración	30 mg/mL	10 mg/mL
Agente precipitante	[NaCl] = 40 mg/mL	[Citrato de sodio] = 4% w/v
Medio	Buffer de acetatos	Buffer Tris-HCl
pH	4.5	8.5
Temperatura	15°C	15°C
Campo eléctrico impuesto por:	Control de potencial a -0.5 V	Control de potencial a -0.7 V
Celda de cristalización	Tipo A (con 2 electrodos)	Tipo D (con 2 electrodos)
Tamaño de los cristales obtenidos.	~ 500µm	~ 250µm

^{††} La catalasa no fue estudiada en todo el rango de potenciales dentro de sus barreras electroquímicas, por lo que consideramos que experimentos a potenciales positivos en solución podrían proporcionar mejores condiciones de cristalización a esta proteína. Tampoco se probó la celda tipo A con dos electrodos, en la cual suponemos se obtendrán básicamente los mismos resultados que en la celda tipo D.





VIII. PERSPECTIVAS





VIII. PERSPECTIVAS

- Encontrar un modelo matemático que pueda definir el campo eléctrico en cada punto de la celda, para lo cual sería factible construir una celda donde los electrodos fueran dos placas paralelas. En este tipo de celda el campo eléctrico generado es homogéneo, además de que ya existen modelos matemáticos que lo describen.

- Una vez descrito totalmente el campo eléctrico dentro de las celdas, podrían realizarse estudios cuantitativos que describan la influencia del campo eléctrico durante el fenómeno de la cristalización.

- Estudiar el fenómeno de cristalización con electrodos de otro material (Au, Ag, etc.) con el fin de mejorar las condiciones experimentales eliminando la afinidad de la lisozima por el platino.

- Estudiar a fondo los fenómenos de la doble capa con el fin de mejorar el recubrimiento de los electrodos con lisozima, para la construcción de un posible sensor de proteoglucanos y glucosaminoglucanos.

- Estudiar la cinética de superficie de la lisozima, mediante un análisis cuantitativo de los experimentos a potencial controlado en solución.





- Ampliar esta técnica de cristalización hacia proteínas con funciones redox, ampliando los estudios a potencial controlado más allá de las barreras electroquímicas, con el fin de mejorar las condiciones de cristalización de este tipo de proteínas.

- Generalizar el método de cristalización para todo tipo de proteínas y moléculas





IX. ANEXOS





IX. ANEXOS

Anexo I

Metodología experimental para la construcción de las celdas de cristalización.

Para construir las celdas de cristalización, se realizó primero el sello de teflón. Este se construyó a partir de tiras de este material, las cuales tenían 1mm de espesor. De dichas tiras se cortaron 4 pedazos de 20mm de largo y se unieron con resinas epóxicas transparentes (marca Resipoxy o TOP) por los extremos para formar un cuadrado (ver Figura 33). Se esperó a que secara completamente el pegamento por 1 hora antes de continuar la construcción de la celda. Las dos perforaciones por las cuales se introducen las disoluciones fueron realizadas directamente en el teflón. El lugar donde fueron colocados los electrodos se marcó con un surco realizado con una navaja sobre el sello de teflón. Dentro del surco se colocó el electrodo y de esta manera el electrodo no afectó el grosor del sello. Una vez colocados los electrodos, se procedió a pegar las dos tapas de vidrio para terminar la celda con silicón transparente (marca Sista). Las tapas de vidrio se realizaron con la tercera parte de un portaobjetos de 76 x 26 mm (marca Lauka), por lo que estas tapas cubrían bien la dimensión final de la celda (Figura 34). Una vez terminada la celda se dejó secar por 2 h mínimo antes de utilizarlas.

Los electrodos utilizados fueron de alambre de platino (0.2mm de diámetro Alfa AESAR) y se aprisionaron de un lado de la celda por el separador de plástico y el portaobjetos, con 5mm inmersos dentro de la disolución (área aproximada = 6.4×10^{-2} cm²).



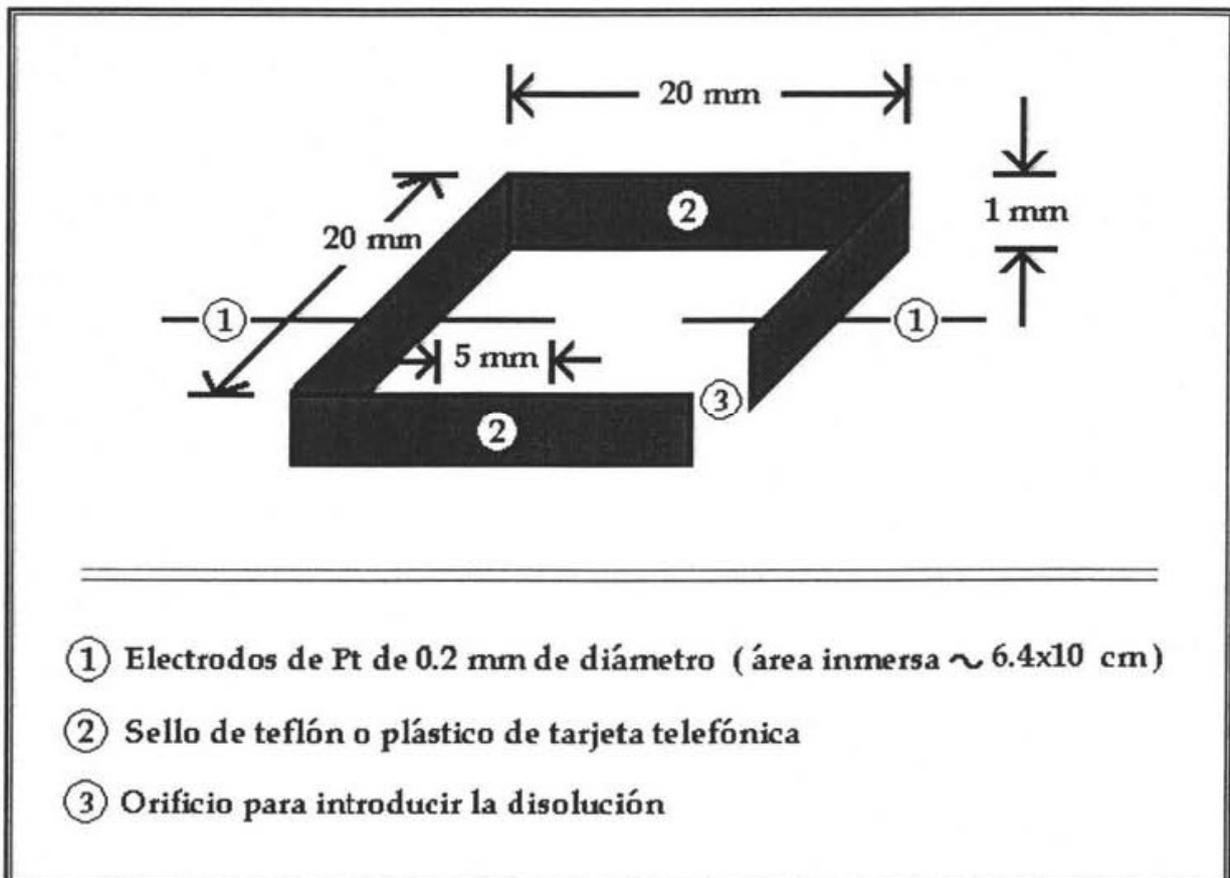


Figura 33: Sello de teflón o plástico inerte, utilizado para construir las celdas de cristalización.



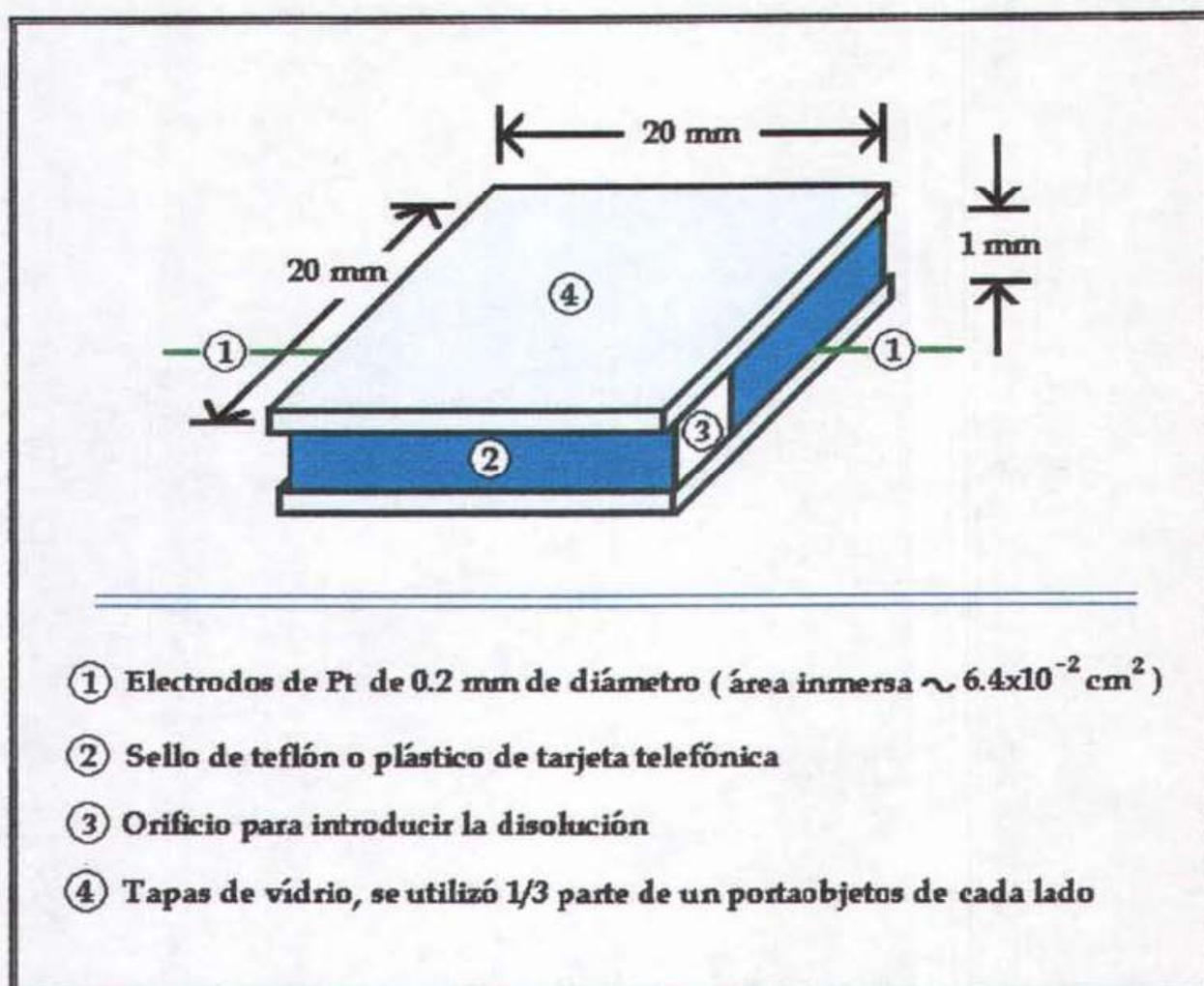


Figura 34: Celda de cristalización con dos electrodos, utilizada para la imposición de un campo eléctrico interno.

En el transcurso de los experimentos fue necesario realizar algunas modificaciones a las celdas previamente descritas. Estos cambios permitieron disminuir el tiempo de su construcción así como la disminución de fugas que estas presentaban. El cambio más fue la construcción del sello de teflón. Dado que este material es costoso y además dado que en las uniones de las tiras que formaban los sellos frecuentemente aparecían fugas, se decidió realizar el sello de una sola pieza con un material alterno.





Los nuevos sellos se fabricaron a partir de tarjetas telefónicas usadas ya que el grosor de éstas es de 1mm de espesor aproximadamente. En nuestra experiencia no presentó reacciones químicas o degradación alguna para las disoluciones que fueron empleadas. Las tarjetas telefónicas fueron lavadas con agua y jabón, para posteriormente enjuagarlas con agua destilada y secarlas con etanol antes de ser utilizadas. El hecho de realizar el sello en una sola pieza aumentó la hermeticidad de la celda y la rigidez de la misma.

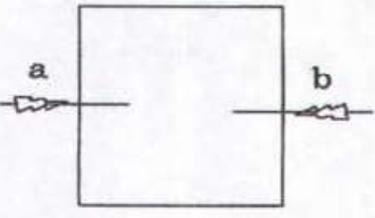
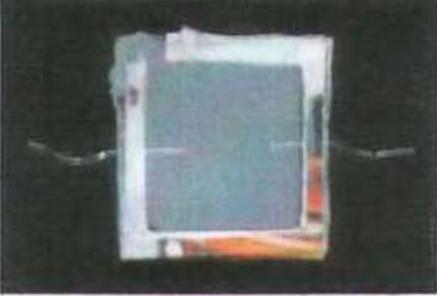
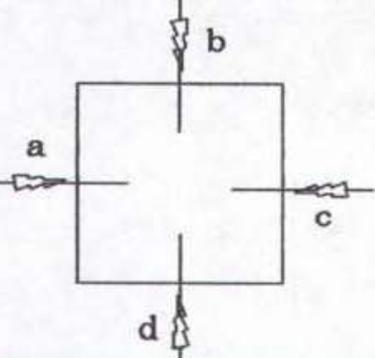
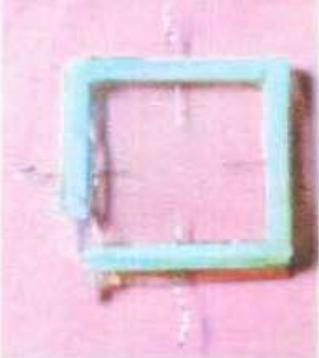
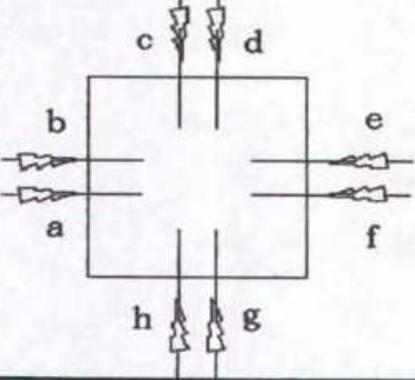
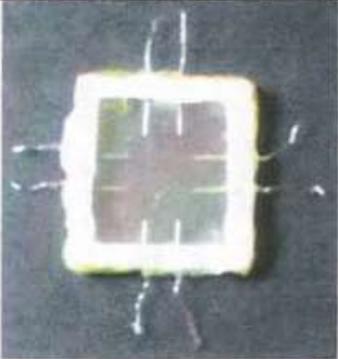
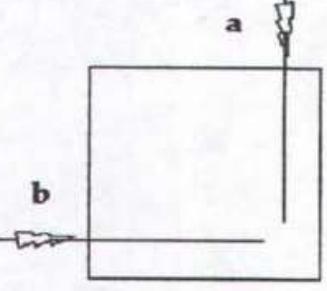
La entrada de las disoluciones fue también modificada haciendo, en lugar de los dos orificios que se describieron previamente, una sola entrada cortando un pequeño tramo de 3mm aproximadamente del sello. Una vez que la disolución era introducida, este se colocaba en su lugar sellado con silicón.

Algunas de las modificaciones realizadas a las celdas de cristalización se pueden observar en la Tabla 6.





Tabla 6: Modificaciones realizadas a las celdas de cristalización para la imposición de un campo eléctrico interno.

Tipo de celda		Detalles experimentales.
Diagrama	Fotografía	
		Base cuadrada: de plástico de tarjeta telefónica. Entrada para solución: espacio descubierto en la esquina.
		Base cuadrada de teflón Entrada para solución: espacio descubierto en la esquina.
		Base cuadrada: de teflón. Entrada para solución: Dos orificios.
		Base cuadrada de plástico de tarjeta telefónica. Entrada para solución: Dos orificios ó espacio descubierto en la esquina.





Anexo II

Fabricación del electrodo de referencia.

Para los estudios a potencial controlado se requirió una celda de tres electrodos que incluyera un electrodo de referencia (Figura 35). Éste fue construido de tal manera que se pudiera introducir a la celda y lo más cercano al electrodo de trabajo. El electrodo consistía en un capilar delgado de 1mm de diámetro, el cual se estiró bajo la flama y fue sellado en la parte inferior con un alambre de Pt de 0.2 mm de diámetro. En el capilar se introdujo un alambre de plata recubierto con AgCl electrogenerado a partir de la oxidación del alambre con una pila de 9V en una disolución de KCl (0.1M). El capilar fue llenado con disolución 0.1 M de KCl y se selló con silicón.

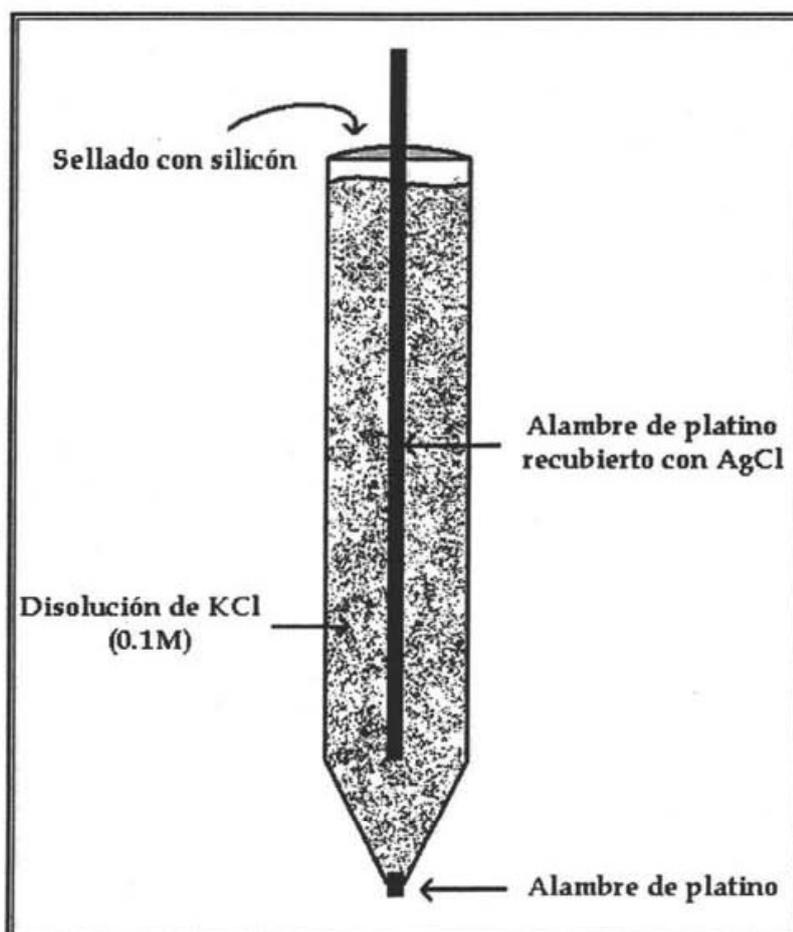


Figura 35: Electrodo de referencia construido para la celda de tres electrodos.





Este electrodo se insertaba a la base plástica, antes de cubrirla con el vidrio, y se pegaba con resinas epóxicas procurando que quedara cerca de nuestro electrodo de trabajo.

Anexo III

Artículo publicado del trabajo realizado en la presente tesis.





ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Crystal Growth 275 (2005) e1437–e1446

JOURNAL OF
CRYSTAL
GROWTHwww.elsevier.com/locate/jcrysgr

Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes: effect of the potential control

Elizabeth Nieto-Mendoza^a, Bernardo A. Frontana-Urbe^{a,*}, Gen Sasaki^b,
Abel Moreno¹

^aLab. de Electroquímica y Electrosíntesis, Instituto de Química-UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Mexico, D.F. 04510, Mexico

^bCenter for Interdisciplinary Research, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

Available online 18 December 2004

Abstract

Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization in gels and solution using a crystal growth cell with multiple electrodes at constant current (2 μ A per circuit) are discussed. In this work, the advantages and disadvantages of different electrode dispositions number, and electrode connections inside the cell are shown. A pH change effect was discarded as the main factor affecting the selective growth of the crystals at the cathode and the fact is explained in terms of electromigration phenomena. Additionally, controlled potential experiments were carried out in order to avoid parasitic reactions observed at constant current, resulting in an increase of reproducibility and better control of crystal growth.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

PACS: 81.10; 81.10.Dn; 82.45.Tv; 87.50.Rr

Keywords: A1. Biocrystallization; A1. Optical microscopy; A2. Electrochemical growth; A2. Growth from solutions; B1. Biological macromolecules

*Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 4507;
fax: +52 55 5616 2217.

E-mail address: bafrontu@servidor.unam.mx
(B.A. Frontana-Urbe).

¹In sabbatical year at the Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS. UPR 9002, F67084 Strasbourg Cedex, France. Permanent address: Dept. Bioquímica Instituto de Química-UNAM, Mexico.

1. Introduction

Nowadays more than 70% of the structures of proteins have been solved by X-ray diffraction methods thanks to the monocrystals availability, which were obtained using diverse crystal growth techniques [1]. The rest of the structures have been

0022-0248/\$ - see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jcrysgr.2004.11.233





obtained by NMR and modeling predictions. However, obtaining monocrystals of suitable high quality at atomic level is not easy, and it has turned into the key point and limiting factor for the studies that require the knowledge of the 3D molecular structure like molecular biology or the study of the physical-chemistry of proteins. In order to obtain protein single crystals of high-quality new crystal growth methods need to be developed, that allow optimize the induction time and the size of crystals without diminishing the quality of them. There are some studies which have considered some physico-chemical parameters to control the nucleation phenomena of proteins by applying magnetic [2,3] and classical external electric fields [4–6], the high-throughput methods coupling temperature and concentration of the chemicals used for crystallization [7], and high pressure [8].

The application of an electric current to a protein solution, which generates an internal electric field, has been investigated previously [9–11]. The first studies applying an internal electric field in a crystal growth cell with parallel platinum electrodes, demonstrated the reduction of the induction time of crystallization and preference to crystallize near the cathode when the protein is positively charged [9]. On the other hand, when coupling the electric and magnetic fields an augmentation on the orientation, the homogeneity, and the average size of the obtained crystals was observed along the crystallization process [10]. Recently, an electrical direct current was applied to the gel acupuncture method using two platinum electrodes located in straight line with a gel gap separation between them; the nucleation was observed toward the anode (although the protein was positively charged in the buffer solution) [11].

Based on these previous studies and taking into account that these have been performed applying a direct current (ranging from 2 to 4 μA), it was important to determine whether the determinant factor for controlling the nucleation phenomena is the disposition of the electrodes in the cell, the electrical current used or the applied potential during the growth process. In order to obtain more

insight about the electromigration phenomena, the present work describes the advantages and disadvantages of different cell geometries and electrode connections using constant current. An internal electric field was generated by imposing a controlled potential all along the crystallization step, this condition let to obtain a major selectivity of the electrochemical reactions that occur at the electrodes favoring only the crystallization process.

2. Experimental section

2.1. Materials and methods

Lysozyme (Seikagaku Co. Code 100940 six times recrystallized) solution 30 mg/ml was prepared in 200 mM sodium acetate buffer pH 4.5. The precipitating agent, NaCl 40 mg/ml, was prepared using the same buffer solution. Agarose (Sigma, A4679) was prepared in water using a constant concentration (0.066% w/v). Equal volumes of precipitating agent, gel, and protein solutions were mixed together and introduced to the growth cell. For experiments using catalase (Sigma Catalog number C3155), a solution of 10 mg/ml was filtered with 0.2 μm filter and diluted in buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.5, 4% w/v sodium citrate was used as precipitating agent and prepared in the same buffer solution. The experiments were performed at constant temperature ($T \pm 0.1^\circ\text{C}$) using an ad hoc plate connected to a constant temperature water recycler device. All the experiments at controlled current ($2\ \mu\text{A} \pm 0.1$) were carried out using a galvanostat VIMAR (model FCC-17). The experiments at controlled potential were performed in a Potentiostat/Galvanostat EG&G Princeton Applied Research (model 273A) connected as usually it is done in the two electrode electrochemical cells (reference and auxiliary electrodes were interconnected to the same electrode) [12,13]. All photographs were collected by using a stereoscopic microscope Zeiss Stemi SV11 adapted to a digital camera and the software Axion Vision for data processing (provided by Zeiss Co.).



2.2. Cell preparation for crystallization experiments under internal electrical field

All the experiments were performed using different electrode geometries based on the control current crystallization cell recently published by Moreno and Sasaki [9] and Sasaki et al. [10]. The cells were constructed with glass cover slides separated either by a Teflon[®] or plastic strips and sealed with silicon glue. The crystal growth cells ($20 \times 20 \text{ mm}^2$) with a thickness of 1 mm were perfectly cleaned by sonication (5 min) before use. The electrodes used were platinum wires (Alfa AESAR Co., 0.2 mm diameter) introduced 5 mm inside the solution through orifices made to the Teflon separator near to one of the cover glasses. Afterward, the growth cell was filled with the batch solution, sealed with silicon glue and connected to the potentiostat/galvanostat as described in Ref. [10]. In all the experiments, a control was made with dipped electrodes in the batch solution using the same electrodes geometry, but without applying any electric current or potential difference.

3. Results and discussion

3.1. Effect of the geometry of the cell and electrode polarities disposition

The studies of crystallization in solution, used to be highly affected by the gravity force and the convective transport [14]. Due to this fact it was decided to carry out all the geometry effect experiments in gel media. The electromigration phenomena occurring during the crystallization of lysozyme under the influence of a direct current was evaluated using the cells depicted in Fig. 1. The experiments were carried out comparing the crystallization yield in terms of number of crystals and their size, using the three different types of cell with different electrode geometries and polarity disposition in the presence and the absence of an electric field.

In general for all the geometries when the electric current was applied, a decrease of the induction time for the nucleation and the pre-

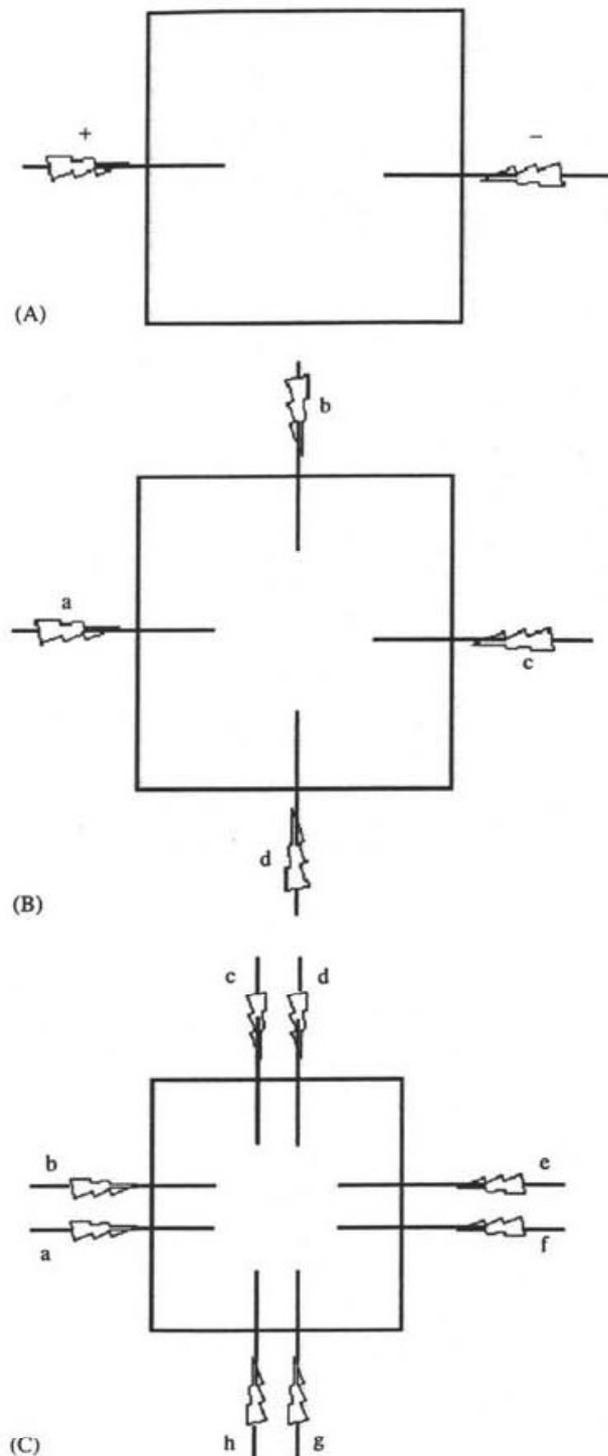


Fig. 1. Cells with different electrode geometries for the crystal growth experiments with: (A) two electrodes in line, (B) four electrodes at 90° , and (C) eight parallel electrodes at 90° and a separation of 5 mm.

ference to crystallize near the cathode without any favorable anode crystallization was confirmed for lysozyme, a protein with basic pI (Figs. 2a and b) as published previously. Using geometry A (Fig. 1) and applying a direct current, crystals showing almost their final size ($>300\ \mu\text{m}$) were detected around 24 h, whereas in the absence of the electrical current (control), the biggest crystals ($>150\ \mu\text{m}$) were observed around 48 h.

The crystals obtained for lysozyme around the cathode are bigger in size compared to the control and the anode, but their size was affected by the electrodes number and polarity disposition; the result of the average size of crystals near the electrodes using different geometries and electrode polarity disposition is shown in Fig. 3. Cells with a higher number of electrodes induced nucleation faster (see Table 1), but their behavior with respect to the size was not as efficient as those containing only two or four electrodes (vide infra). Using cell type B fitted with four electrodes and cell type C with eight electrodes ($2\ \mu\text{A}$ per circuit \pm) worked fine only if the electrodes have alternating polarities (Fig. 3, B2: $a = c = +$ $b = d = -$ and Fig. 3, C3: $a = c = e = g = +$ $b = d = f = h = -$). If this experimental condition is not respected (Fig. 3, B1: $a = b = +$ $c = d = -$ and Fig. 3, C1: $a = b = c = d = +$ and $e = f = g = h = -$ or C2: $a = b = e = f = +$ and $c = d = g = h = -$), and although the seed crystals were obtained in a shorter time, the cell is completely blocked by gases formation due to the high current flowing in the cell and the final crystal size decreased. These non-alternate dispositions generate cell regions highly influenced by the proximity of multiple electrodes of the same polarity. These unfavorable conditions catalyze parasitic electrochemical reactions like water electrolysis and gas formation in considerable amount. When the alternate electrode disposition was respected, the size of crystals in average was $>300\ \mu\text{m}$ in 24 h in the gel batch cell. This effect is due to the fact that the electrical current is better distributed around the growth cell avoiding regions of high negative or positive potential.

Along the experiments with geometry B2 (vide supra), it was observed that inside the quadrant limited by an anode and a cathode, there were

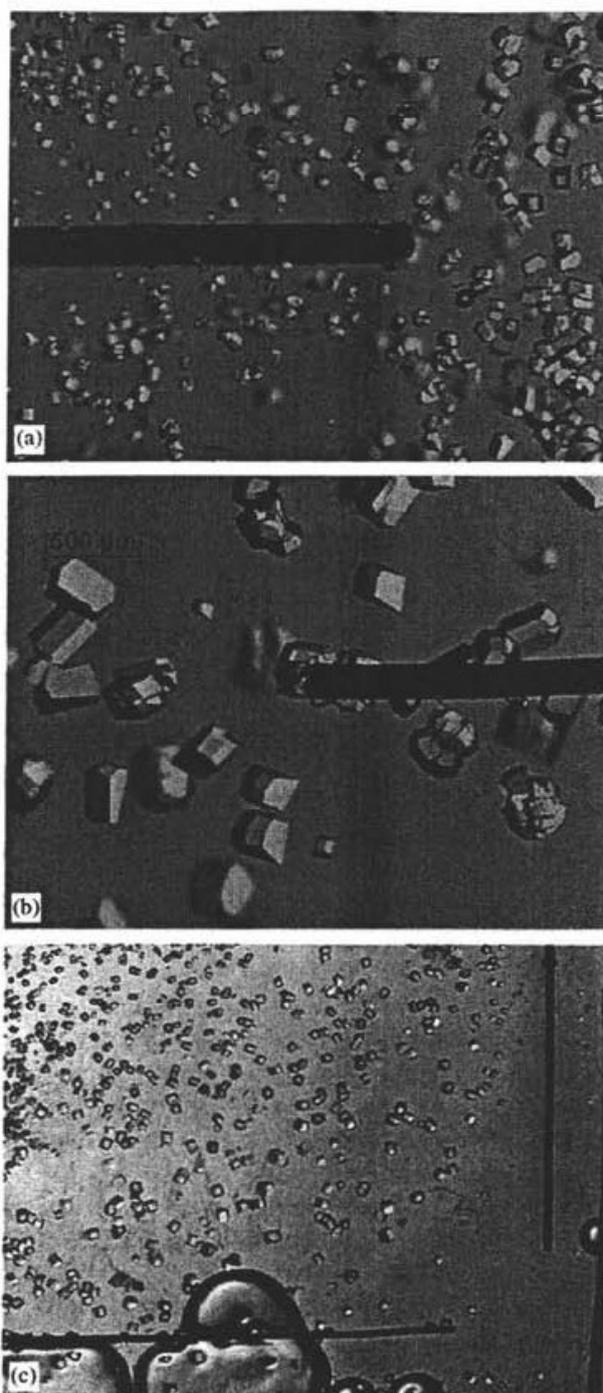


Fig. 2. Lysozyme crystals obtained applying direct current after 48 h: (a) geometry A the anode, (b) geometry A the cathode, and (c) perpendicular electrodes cell (anode = vertical electrode, cathode = horizontal electrode). Lysozyme 30 mg/ml in acetic buffer 200 mM pH 4.5 and NaCl 40 mg/ml, 0.066 w/v agarose $T = 18\ ^\circ\text{C}$. As reference the electrode platinum wire is $200\ \mu\text{m}$ diameter.

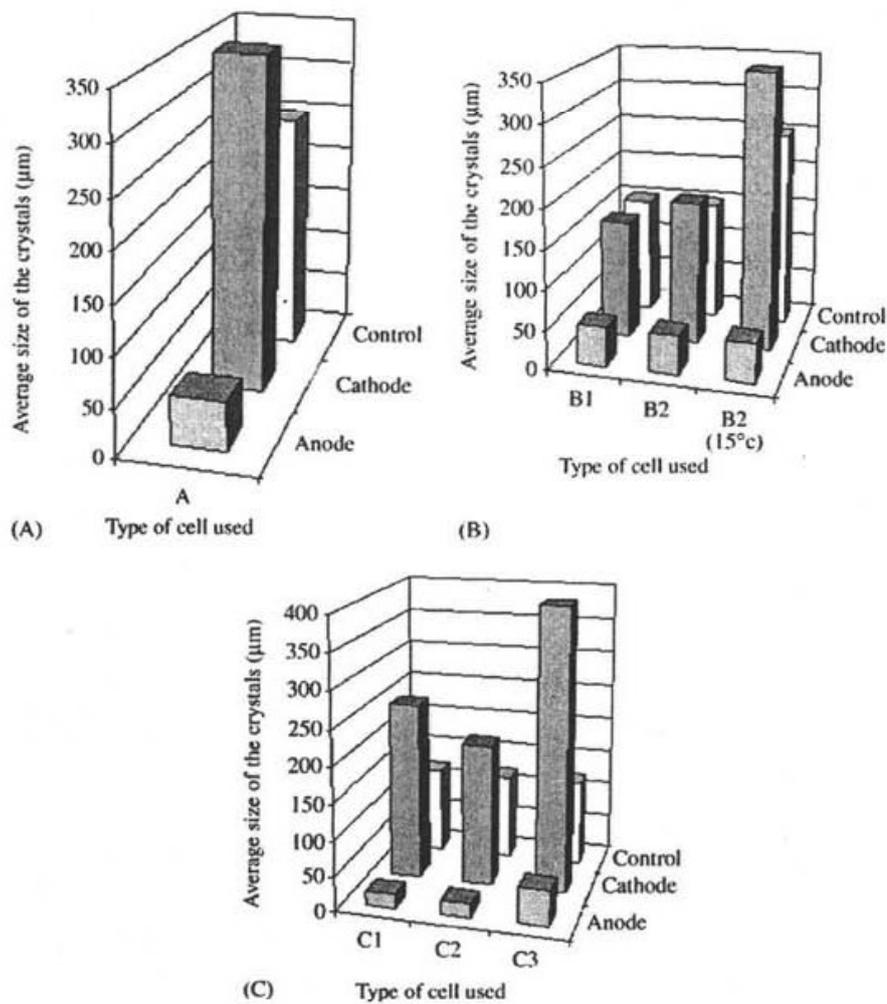


Fig. 3. Bars plot of the average size crystals near the electrodes versus type of crystal growth cell and electrode polarity disposition. B1: $a = b = +$ and $c = d = -$; B2: $a = c = +$ and $b = d = -$; C1: $a = b = c = d = +$ and $e = f = g = h = -$; C2: $a = b = e = f = +$ and $c = d = g = h = -$; C3: $a = c = e = g = +$ and $b = d = f = h = -$ (for a, b, c, etc., see Fig. 1). Temperature for the experiments was 18 °C except for B2 15 °C.

Table 1
Number of crystals in an area of 1 mm² around the tip of the cathode in the cell under controlled current conditions at different times of the crystallization process

Cell type	12 h	24 h	Cell type	12 h	24 h
A	1	2	B2	46	55
B1	17	22	C2	50	66

Note: Data obtained from the photographic follow-up of the process.

regions that showed the better crystals in terms of size and number than in the rest of the cell. An experiment with two perpendicular electrode disposition (Fig. 2c) demonstrated that the electrical field generated by the current flow was not uniform in all the cell and near the tips of the electrodes, where it is moderately intense, the biggest crystals were obtained. Just at the electrode tips the electrical current effect is so intense that the crystallization is not favored, probably by the



presence of a turbulent or convective ions movement. Far away from the electrodes the size of them was small (top left corner of Fig. 2c) just the region where the electrical field is the lowest. As observed previously no crystals were obtained around the anode.

In order to understand the crystallization behavior around the electrodes and to discard between a pH change effect around them due to water electrolysis (confirmed by the presence of gas bubbles in some experiments) and a pure electromigration phenomena as the main effect that favor the crystallization, a test of pH variation around the electrodes in a cell with geometry B2 (vide supra) was performed using the pH indicator phenolphthalein. This was added to the batch solution without lysozyme (10 mg/ml previously dissolved in 50 μ L EtOH) and the changes were recorded during 30 h using a stereoscopic microscope focusing the cathode surface (if a strong pH change occurs at the cathode the solution around must take a pink color). During the experiment and using the stereoscopic microscope, a change of the color solution (transparent at the pH working value) around the electrode was not detected, demonstrating that the buffer solution was concentrated enough to resist the pH changes provoked by the slow water electrolysis during the crystallization process. With the change of pH discarded, the explanation of cathode directed crystallization is attributed exclusively to the electromigration phenomena. In an electrochemical cell, the electrical current flows from the cathode to the anode and in a liquid phase it is transported by the charged ions in movement [12]. Lysozyme is positively charged at the pH working value and instead of the major part of the charge must be transported by the ions having the higher mobility (AcO^- , Cl^- , H^+ or Na^+), this current flow facilitates the movement of the charged protein toward the cathode in a non-convective way, favoring the crystallization near and over this electrode in a shorter time. Experiments based on controlling the potential more than applying a direct current could give more insight about the crystallization process and to gain in terms of reproducibility and experimental availability. By scanning different temperatures (from 15° to 30°),

it was found that reducing the temperature up to 15 °C the size of crystals was improved compared to those experiments performed at 18 °C (Fig. 3, B2, 15 °C) and other temperatures did not favor the crystallization. This was the reason for carrying out the following experiments at this optimized temperature. X-ray diffraction experiments have demonstrated that crystals grown under an internal electrical field using constant current have the required quality to obtain the 3D protein structure [11].

3.2. Crystallization at controlled potential

In agreement with the previous results when gases are generated inside the cell, the effect of the electric field decreases and therefore the efficiency of the crystal obtaining is even worse than the control. These gases are the result of multiple electrochemical reactions that are generated when the potential cell is not controlled, as in the experiments at controlled current, where an increase of the potential value is typical to observe during the electrical imposition. The possible electrochemical reactions that can occur in the media contained in the crystal growth cell are described in the top of Fig. 4 [15]. Taking into

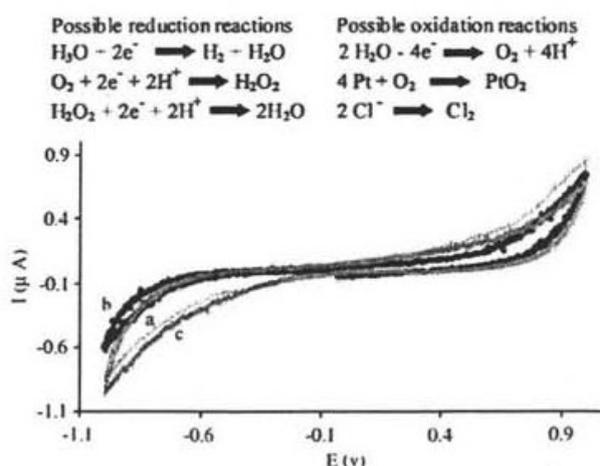


Fig. 4. Possible electrochemical reactions that occur at the electrodes and cyclic voltammograms obtained (a) without lysozyme, (b) after addition of lysozyme, and (c) after the crystallization process at controlled potential of -0.5 V . Cell type A, lysozyme 30 mg/ml in acetic buffer 200 mM pH 4.5 and NaCl 40 mg/ml.





account the possibility of these electrochemical processes, cyclic voltammetry studies were performed without and with lysozyme (Figs. 4a and b, light line and dark line, respectively) using a cell type A (Fig. 1). This experiment can give insight about the potential values where the parasitic electrochemical reactions occur. When lysozyme is added (Fig. 4b), this enzyme does not show any electrochemical activity in our experimental conditions, only a slight decrease of the cathodic charge current was observed, which shows evidence of a change in the structure of the electrical double-layer [12,13]. In the case of the anodic barrier, there is no change observed in the presence or absence of lysozyme. A plateau region can be clearly observed when lysozyme was added (Fig. 4b) between -0.75 and 0.75 V, here the only phenomena is the charge with ions of the double-layer over the surface of both electrodes. Larger values of applied voltage show an exponential growth for the curve of the cathodic and the anodic current, clear signal that the parasitic electrochemical reactions start to take place or electro-modification of the enzyme occurs [16]. Therefore, the studies of crystal growth under the presence of an internal electric field generated by a constant potential value were carried out within the plateau interval of potential where no electrochemical reactions could happen.

The quality of the crystals obtained by gel techniques is ideal for the high-resolution X-ray diffraction experiments, due to the absence of convective effects [14]. Nevertheless, it has been reported that in solution the crystal growth is faster than in gel when a constant current is applied [9], also, the experimental setup for solution experiments is easier than in gel. In order to see if the crystal quality in solution could be improved by the electrical controlled potential, the effect of the potential during the crystallization of lysozyme in the potential range -0.5 to $+0.5$ V was evaluated, using cells type A. As a consequence of using solution, the sedimentation effect due to the gravity force was strongly observed in most of the experiments performed. Due to this fact, the electrodes were located touching the inner part of the top cover glass of the cells; with the purpose of avoiding any blockage of the electrodes

by the crystals. Scanning temperature experiments between 15 and 30 °C demonstrated that, as in gel at controlled current, the optimal temperature was 15 °C. The studies at the different values of controlled potential at the chosen interval let to observe a clear effect of this variable on the number and size of crystals (Fig. 5). At potential values $> \pm 0.3$ V and in the half of the time needed for the control (5 h for the control), the optically well-shaped and larger crystals in terms of average size were obtained. Fig. 5 and the insets show a parabolic tendency, where the best crystal growth conditions in terms of average size are obtained when potential value is fixed at ± 0.5 V at $T = 15$ °C and the worst at -0.1 V. In the ideal case (taking into account these conditions), the larger crystals having an average size of 400 μm were grown at -0.5 V in 3 h. It is worth to mention that performing the experiments at controlled potential the gas production is completely avoided. Fact that confirms that at the chosen values of potential the parasitic electrochemical reactions observed in the controlled current experiments are not present. At the values of potential studied the current that circulates through the circuit at the initial minutes never reaches high values (tenths of nA) and it decays with an asymptotic behavior until stabilization at a lower constant value minutes after closing the electric circuit.

When the experiments were performed at ± 0.5 V and 18 °C, the obtained crystals are in average smaller than those obtained at 15 °C and the rate of crystallization decreased drastically. This suggests that the optimal temperature for experiments under the influence of an internal electric field either in solution or gel is 15 °C. These results do not improve, neither changing the values to other potentials nor the temperatures, along the studied interval. After the crystal growth experiments controlling the potential, a cyclic voltammetry was recorded. The voltammogram showed that the initial interface electrode was recovered (Fig. 4c) which demonstrates that almost all the lysozyme has been consumed by the crystallization and its concentration in solution is very low. Crystal data analysis previously done for lysozyme and thaumatin [11] demonstrated that there was not any changes in the crystal quality, but the only



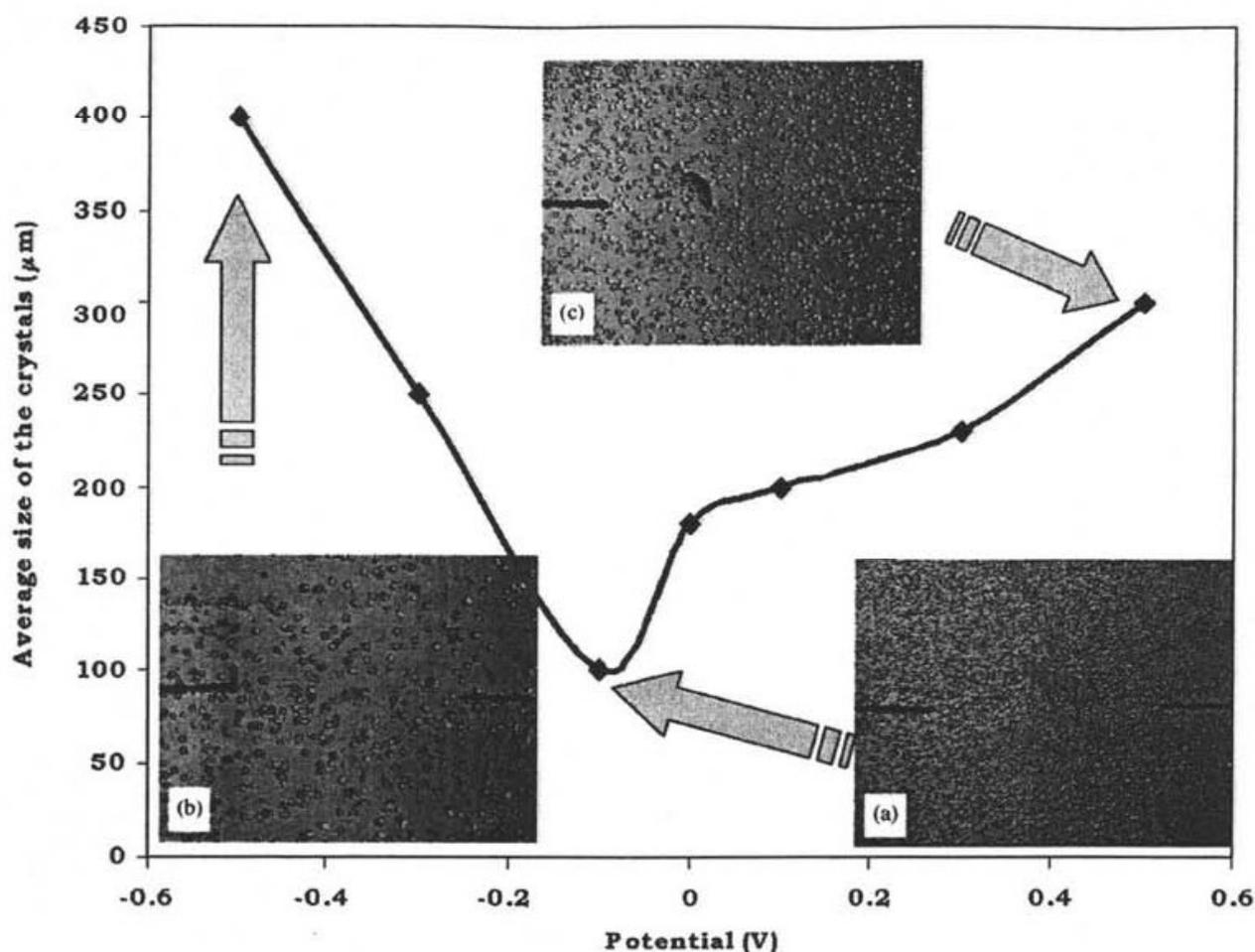


Fig. 5. Plot of the average size of the crystals obtained under controlled potential conditions versus the applied potential with the respective photographs of the crystals obtained at different constant potentials: (a) -0.1 V, (b) -0.5 V, and (c) -0.5 V; -0.1 V, and 0 V showed the same behavior observed for the control. Cell type A, lysozyme 30 mg/ml in acetic buffer 200 mM pH 4.5 and NaCl 40 mg/ml, after 24 h at 15°C . As reference the electrode platinum wire is 200 μm diameter.

parameter which was modified is the induction time for the nucleation.

Finally, we decided to apply the same experimental setup to the metallo-enzyme catalase from bovine liver, which is well known in electro-analytical redox investigations. This metallo-enzyme has an acidic pI of 5.5 , compared to the basic of lysozyme (pI 11.5), which was useful to compare its behavior under the electrical field. These redox enzymes are electro-active, and then the potential value must be selected cautiously in order to avoid enzyme degradation or changes in the redox state. A cyclic voltammogram of the catalase showed that the potential interval where no electrochemi-

cal reactions are generated was between -0.7 and $+0.2$ V. The result of the catalase crystallization at controlled potential at -0.7 V at 15°C is shown in Fig. 6. Interesting, the crystals grown have the same physical shape than those of the control, but they attach to the electrodes (fact not observed at the control (6c)) and the orientation of the crystals around the anode (along the direction of the c crystallographic axis of the catalase crystal), while in the cathode there are few of them and the crystal orientation was not as clear observed as in the anode. The size was not really affected by the internal electrical field but there is a clear effect in the crystal orientation. The electromigration

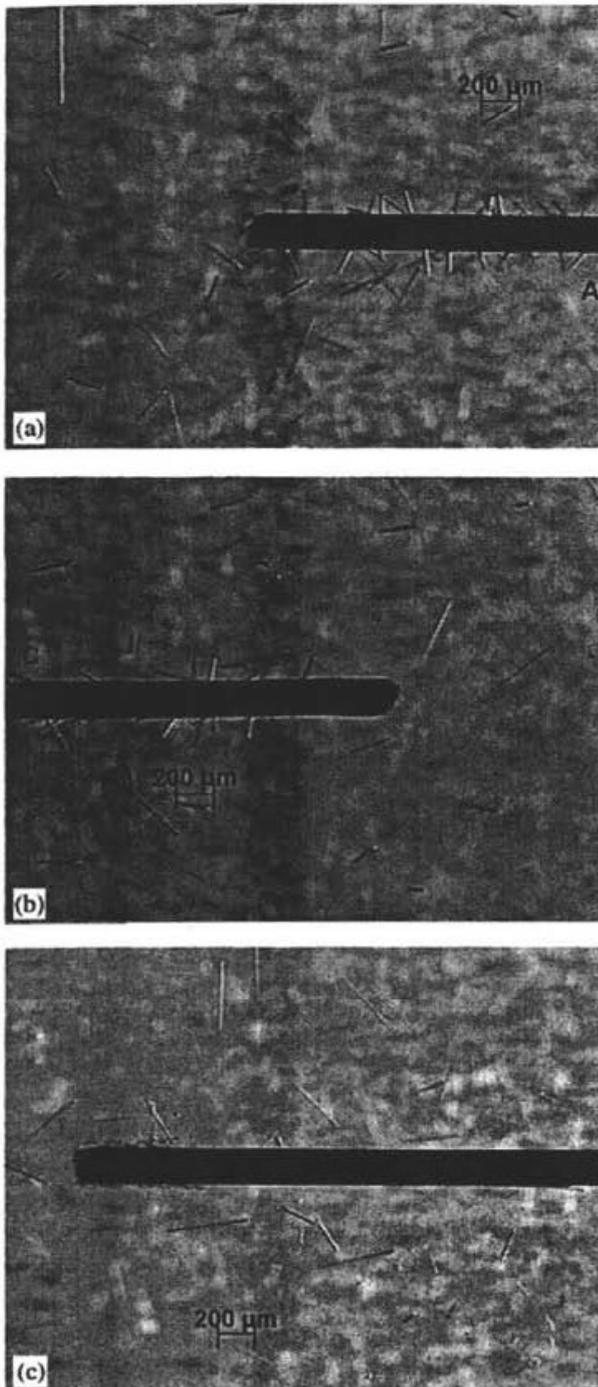


Fig. 6. Photographs of the catalase crystals obtained at -0.7 V in a cell with perpendicular electrodes after 24 h at 15°C : (a) anode, (b) cathode and (c) control. Catalase 10 mg/ml in Tris-HCl buffer 100 mM pH 8.5 and sodium citrate 4% w/v, $T = 15^{\circ}\text{C}$.

phenomena can explain again why the catalase, negatively charged at the working pH, moves to the anode (positive electrode) favoring the growth of crystals near this electrode. The size crystals comparison between the control and the experiment at controlled potential showed that almost the same size was obtained. This result indicates that the crystal growth is faster in the experimental condition used and the electrical field effect does not affect considerably the crystal size for this metallo-enzyme.

4. Conclusions

This contribution has shown that using a constant current cell, the electrode number and polarity of the electrodes are important to control the protein crystal growth and nucleation phenomena. When the cell has several electrodes working at the same polarity, the regions influenced by them presented parasitic reactions that generate gas in the cell, affecting the crystallization process and decreasing the size of the crystals. In order to decrease this unfavorable effect the electrodes must be disposed in alternate polarity and no more than four with the same current. When working at controlled potentials it was easier to carry out reproducible experiments for controlling the nucleation phenomena and the crystal growth processes. In these conditions, all the parasitic reactions are avoided and the experiments showed a clear influence of the applied potential value. Lysozyme crystals of $400\ \mu\text{m}$ obtained in solution after 3 h at -0.5 V and 15°C showed well tetragonal-shaped crystals, and preliminary X-ray diffraction experiments demonstrated that they are suitable for determining the 3D structure in terms of the crystal quality. Catalase crystals obtained using the controlled potential approach, showed a clear effect on the crystal orientation preference. This research will open new insights on coupling the effects of temperature and controlled potential that deserve to be taken into account for the future investigations on protein crystallization using the electro-migration phenomena.



Acknowledgements

The authors are indebted to Mrs. Antonia Sánchez Marín and Miss. Gabriela Salcedo for the grammar and English style corrections. The fruitful discussions with Chem. Carlos Frontana helped us to solve some crystallization cell setup problems. E.N.-M. thanks to CONACYT-Mexico for her M.Sc. scholarship. This research was partially financed by the projects of CONACYT 36155E and DGAPA-UNAM project number IN204702. One of the authors (A.M.) acknowledges the financial support from DGAPA-UNAM and CNRS during his sabbatical year at Strasbourg France at the IBMC-CNRS. This is contribution number 2473 from Instituto de Química-UNAM.

References

- [1] Protein Data Bank, <http://pdb.ccdc.cam.ac.uk/pdb/holdings.html>.
- [2] G. Sazaki, E. Yoshida, H. Komatsu, T. Nakada, S. Miyashita, K. Watanabe, *J. Crystal Growth* 173 (1997) 231.
- [3] M. Ataka, E. Katoh, N.I. Wakayama, *J. Crystal Growth* 173 (1997) 592.
- [4] C.N. Naney, A. Perkova, *J. Crystal Growth* 232 (2001) 285.
- [5] M. Taleb, C. Didierjean, C. Jelsch, J.P. Mangeot, A. Aubry, *J. Crystal Growth* 232 (2001) 250.
- [6] M. Taleb, C. Didierjean, C. Jelsch, J.P. Mangeot, B. Capelle, A. Aubry, *J. Crystal Growth* 200 (1999) 575.
- [7] G. Juárez-Martínez, P. Steimann, A.W. Roszak, N.W. Isaacs, J.M. Cooper, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3505.
- [8] [a] A. Kadri, B. Lorber, G. Jenner, R. Giegé, *J. Crystal Growth* 245 (2002) 109;
[b] C. Charron, M.-C. Robert, B. Capelle, A. Kadri, G. Jenner, R. Giegé, B. Lorber, *J. Crystal Growth* 245 (2002) 321.
- [9] A. Moreno, G. Sazaki, *J. Crystal Growth* 264 (2004) 438.
- [10] G. Sazaki, A. Moreno, K. Nakajima, *J. Crystal Growth* 262 (2004) 499.
- [11] N. Mirkin, B.A. Frontana-Uribe, A. Rodríguez-Romero, A. Hernández-Santoyo, A. Moreno, *Acta Crystallogr. D* 59 (2003) 1533.
- [12] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, second ed., Wiley, New York, USA, 2001, pp. 423–432.
- [13] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, second ed., Marcel Dekker, New York, USA, 1996, pp. 165–171.
- [14] J.M. García-Ruiz, *Key. Eng. Mater.* 88 (1991) 87.
- [15] J.A. Dean (Ed.), *Lange's Handbook of Chemistry*, 33th ed., McGraw-Hill, New York, 1985, pp. 6-1–6-19.
- [16] D.J. Walton, P.G. Richards, J. Heptinstall, B. Coles, *Electrochim. Acta* 42 (1997) 2285.





X. REFERENCIAS





X. REFERENCIAS

- 1 Protein Data Bank, <http://pdb.ccdc.cam.ac.uk/>
- 2 G. Sazaki, E. Yoshida, H. Komatsu, T. Nakada, S. Miyashita, K. Watanabe, *J. Crystal Growth* 173 (1997) 231.
- 3 M. Ataka, E. Katoh, N. I. Wakayama, *J. Crystal Growth* 173 (1997) 592.
- 4 A. McPherson, *J. Crystal Growth* 122 (1997) 161.
- 5 C. N. Naneev, A. Perkova, *J. Crystal Growth* 232 (2001) 285.
M. Taleb, C. Didierjean, C. Jelsch, J. P. Mangeot, A. Aubry, *J. Crystal Growth* 232 (2001) 250.
M. Taleb, C. Didierjean, C. Jelsch, J. P. Mangeot, B. Capelle, A. Aubry, *J. Crystal Growth* 200 (1999) 575.
- 6 A. Moreno, G. Sazaki, *J. Crystal Growth* 264 (2004) 438-444.
- 7 G. Sazaki, A. Moreno, K. Nakajima, *J. Crystal Growth* 262 (2004) 499.
- 8 N. Mirkin, B. A. Frontana-Urbe, A. Rodríguez-Romero, A. Hernández-Santoyo, A. Moreno, *Acta Crystallogr. D* 59 (2003) 1533.
- 9 A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, Edit. John Wiley and Sons, II edición, U.E., (2001), Pág. 423-432.
- 10 J. Edelman, J. M. Chapman, *Bioquímica Basica*, Edit. Compañía Editorial Continental S. A. de C.V., México, (1990), Pág. 16.
- 11 Varios, *Enciclopedia Hispánica*, Edit. Encyclopaedia Británica Publishers, Inc., E.U.A., (1992), Vol. 12, Pág. 139, 140.
- 12 A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Principios de Bioquímica*, Edit. Ediciones Omega S.A. de C.V., II edición, España, (1993), Pág. 179.
- 13 R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, *Bioquímica de Harper*, Edit. El Moderno S. A. de C.V., XIII edición, México D.F., (1994), Pág. 90.
- 14 <http://crystal.uah.edu/~carter/protein/lysozym.htm>
- 15 D. W. Martin, V. W. Rodwell, P. A. Mayes, *Bioquímica de Harper*, Edit. El Manual Moderno S.A. de C.V., VIII edición, México, (1982), Pág. 82-85.
- 16 M. C. Vaney, I. Broutin, P. Retailleau, A. Douangamath, S. Lafont, C. Hamiaux, T. Prangé, A. Ducruix and M. Riés-Kautt, *Acta Crystallogr. D* 57 (2001) 929.
- 17 S. Bone, *Biochimica et Biophysica Acta* 1078, 3, (1991) 336-338.
- 18 A. Moreno, V. Bolaños, J. Mas, *De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas*, Edit. JGH Editores, S. A. de C.V., México D.F., (2000), Pág. 1-39.
- 19 <http://lec.ugr.es/mundo-cientifico/texto.htm>





- 20 J. G. Dick, *Química analítica*, Edit. El Manual Moderno S.A. de C.V., México D.F., (1979), Pág. 484.
- 21 Villarreal, *Elementos de Electroquímica Formativa*, Edit. Libros de México S.A., México D.F., (1970), Pág. 1-10.
- 22 R. Chang, *Química*, Edit. Mc. Graw-Hill, E.U.A., (1992), Pág. 777-780.
- 23 H. Vassos, E. Galen, *Electroquímica analítica*, Edit. Limusa, México, (1987), Pág. 16-27.
- 24 C. E. Frontana, "Estudio electroquímico de metilconacytona y sus derivados metilados a pH impuesto en acetonitrilo", Tesis, F.Q., U.N.A.M., (2001), Pág. 20-21.
- 25 J. M. Costa, *Fundamentos de Electróica. Cinética electroquímica y sus aplicaciones*, Edit. Alambra S.A., España, (1981), Pág. 369.
- 26 J. M. Pingarrón, P. Sánchez, "Química Electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones", Edit. Síntesis, España, (1999), Pág. 25-27.
- 27 T. Shono, *Electroorganic Synthesis*, Edit. Academic Press Inc., U.E., (1991), Pág. 11.
- 28 G. H. Ayres, *Análisis Químico Cuantitativo*, Edit. Harla, II edición, E.U.A., (1970), Pág. 513-515, 557.
- 29 G. Charlot, J. Badoz-Lambling, B. Trémillon, *Les Réactions Electrochimiques*, Edit. Masson, Francia, (1959).
- 30 P. Sanchez, *Química Electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones*, Edit. Alambra, España, (1991), Pág. 8-13.
- 31 P. T. Kissinger, H. William R., *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*, Edit. Marcel Decker, II edición, U.E., (1996), Pág. 165-171.
- 32 J. M. García-Ruiz, *Key. Eng. Mater.* 88 (1991) 87.
- 33 H.-M. Lee, Y. W. Kim, J. K. Baird, *J. Crystal Growth* 232 (2001) 294-300.
- 34 <http://cat.middlebury.edu/~chem/chemistry/class/bio/ch322/lysozyme/pdb1hew.ent>
- 35 J. A. Dean (Ed.), *Lange's Handbook of Chemistry*, Edit. Mc. Graw-Hill, XIII edición, U.E., (1985), Pág. 6-1 - 6-19.
- 36 D. J. Walton, P. G. Richards, J. Heptinstall, B. Coles, *Electrochim. Acta* 42 (1997) 2285.

