



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CRECIMIENTO DE MONOCRISTALES DE PROTEÍNAS DE CALIDAD CRISTALOGRÁFICA EN UNA CELDA CON CAMPO ELÉCTRICO INTERNO DE INTENSIDAD VARIABLE”

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

QUÍMICA

P R E S E N T A

MARÍA ESTHER MORENO NARVÁEZ



MÉXICO, D.F.

2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTA: Dra. Rebecca Elizabeth Franco Y Bourland

VOCAL: Dr. José de Jesús García Valdés

SECRETARIO: Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe

1^{er} SUPLENTE: M. en C. Luís Tonatihut Sánchez Linares

2^o SUPLENTE: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Electroquímica y Electrosíntesis y Laboratorio de Bioquímica III del Instituto de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe

SUSTENTANTE: María Esther Moreno Narvéez





Parte de este trabajo se presentó en:

**12th INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE
Crystallization of Biological Macromolecules
CANCÚN, MÉXICO, 6-9 MAYO, 2008.**





DEDICATORIAS

A mi papá, mi mamá y mi hermano, las personas más importantes en mi vida. Gracias por estar siempre conmigo, apoyarme, escucharme, aconsejarme, ubicarme, quererme y sobre todo soportarme, que se que a veces no fue fácil. Estoy orgullosa de ser parte de su familia simplemente la mejor no podría pedir más.

AGRADECIMIENTOS

A la DGAPA-UNAM por la beca otorgada a través del proyecto PAPIIT: IN212207-3.

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo por permitirme realizar la mayoría de los experimentos dentro de su laboratorio así como por su ayuda y paciencia durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Bernardo A. Frontana Uribe por permitirme trabajar en su laboratorio, por su paciencia durante todo el tiempo que estuve ahí, por el tiempo invertido en esta tesis y por siempre brindarme su apoyo incondicional.

A la Dra. Rebecca Franco Y Bourland y al Dr. José de Jesús García Valdés, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por sus valiosas observaciones, aportaciones y sugerencias para mejorar el contenido de ésta.

Al M. en C. Luís Tonatihut Sánchez Linares, gracias por el tiempo dedicado a resolver mis dudas.

A mis compañeros de laboratorio: Gerardo, Joaquín, Yobana y Javier. Gracias por ayudarme cuando lo necesite, por todo el tiempo que compartimos y por siempre de alguna u otra manera alegrarme el día, me dio mucho gusto trabajar con ustedes.

A mis amigos de la facultad: Luz, Fabiola, Sergio, Laura Cynthia, Candy, Laura, Cristina, Israel, Iván Itzaé, Neftys, Mariana y Alfredo. Sin duda ustedes hicieron la diferencia durante el tiempo que estuve ahí, gracias por siempre saber como robarme una sonrisa, por todo el tiempo que pasamos juntos, por escucharme, por todos sus consejos, llantos, risas, locuras, traumas, por todo su apoyo y ayuda, en resumen gracias por su amistad. Los quiero mucho.





Abreviaturas

Å	angstrom
A	ánodo
C	cátodo
Ca	calcio
Con A	concanavalina A
Da	daltones
E	potencial
i	corriente
Mn	manganeso
MΩ	mega ohms
PEG	polietilenglicol
pI	punto isoeléctrico
RMN	resonancia magnética nuclear
RPE	resonancia paramagnética electrónica



**Índice**

I. Resumen	3
II. Introducción	5
III. Hipótesis	8
IV. Objetivos	10
V. Antecedentes	12
V.1. Proteínas	13
V.1.1. Funciones	13
V.1.2. Estructura	14
V.1.3. Estructura tridimensional	15
V.2. Cristalogenénesis biológica	16
V.2.1. Factores que afectan la cristalización	19
V.2.2. Influencia de los parámetros de cristalización	22
V.2.3. Métodos de cristalización de macromoléculas	23
V.3. Electroquímica	26
V.3.1. Procesos faradaicos y no faradaicos	27
V.3.2. Celdas electroquímicas – Tipos y definiciones	28
V.3.3. Variables en celdas electroquímicas	29
V.3.4. Transporte de iones en solución	30
V.3.5. Técnicas de electroanálisis	31
V.3.6. Electrólisis	32
V.3.7. Cristalización de proteínas electroquímicamente asistida	33
V.3.7.1. Estudios previos realizados	34
V.4. Proteínas a estudiar	34
V.4.1. Lisozima	34
V.4.2. Taumatina	36
V.4.3. Concanavalina A	37
VI. Parte experimental	39
VI.1. Instrumentación	40
VI.2. Materiales	40
VI.3. Reactivos	41
VI.4. Construcción de las celdas de crecimiento	42
VI.5. Preparación de disoluciones	43
VI.5.1. Disoluciones amortiguadoras	43
VI.5.2. Disoluciones para experimentos en disolución en celda batch	43
VI.5.2.1. Lisozima	43
VI.5.2.2. Taumatina	44
VI.5.2.3. Concanavalina A	44
VI.5.3. Disoluciones para experimentos en gel de agarosa en celda batch	45
VI.5.3.1. Lisozima	45
VI.6. Screening de taumatina	45
VI.7. Procedimiento experimental	47
VII. Resultados	49
VII.1. Experimentos en disolución	50
VII.1.1. Lisozima	50
VII.1.2. Taumatina	53
VII.1.3. Concanavalina A	57
VII.2. Experimentos en gel de agarosa	60
VII.2.1. Lisozima	60
VIII. Discusión	62





IX. Conclusiones	68
X. Perspectivas	71
XI. Referencias	73
XII. Anexos	76
XII.1. Anexo I. Esquema de la celda de crecimiento con medidas	77
XII.2. Anexo II. Fotografías de las celdas	78
XII.3. Anexo III. Fotografías de los cristales de las proteínas estudiadas	79
XII.4. Anexo IV. Costo de la celda de trabajo	81





I. RESUMEN





I. Resumen

En este trabajo se presentan los estudios realizados sobre el efecto del ángulo entre dos electrodos dentro de una celda para crecimiento de monocristales de proteína bajo la influencia de un campo eléctrico interno usando como proteína control lisozima. Para ello se diseñó una celda fácil de usar. El aplicar corriente eléctrica constante a celdas en donde los electrodos están formando diferentes ángulos (45°, 60°, 90°), modifica el proceso de cristalización. Estos cambios inducen una preferencia por la cristalización en ciertas zonas de la celda, obtención de cristales de mayor tamaño y mejor calidad, así como una disminución en el tiempo de cristalización.

Abstract

Investigations on the effect of the angle between electrodes in a protein monocystals growth cell with an internal electric field are discussed. For these studies a cell easy to use, was designed. When a constant current is applied to cells where the electrodes are set in different angles (45°, 60°, 90°), it produces a clear effect on the crystallization of the protein. These changes induce the preference of crystallization in certain areas of the cell, faster crystallization and the obtaining of crystals of better quality. As control protein was used lysozyme.





II. INTRODUCCIÓN





II. Introducción

El conocimiento de la estructura de una macromolécula impacta directamente en campos tan importantes como la biología molecular, la biofarmacia o la físico-química de proteínas, ya que este conocimiento permite ampliar las fronteras de la investigación en biología básica, además de ayudar a entender y solucionar problemas biotecnológicos.

Las técnicas más usadas en la actualidad para la caracterización tridimensional de las proteínas son: la resonancia magnética nuclear (RMN), el modelado molecular y la difracción de rayos X. Hoy en día, alrededor del 70% de las estructuras de proteínas se han obtenido mediante la técnica de difracción de rayos X, y el resto mediante resonancia magnética nuclear o modelado molecular ¹. La gran limitante de los dos últimos es el peso molecular de las proteínas; por lo que proteínas mayores a 50kDa solo pueden ser estudiadas mediante difracción de rayos X. Sin embargo, el factor limitante de ésta es la obtención de monocristales de alta calidad, que permitan alcanzar una resolución mayor a 2 Å de distancia interatómica.

Con el propósito de mejorar la calidad y/o acelerar la obtención de monocristales de proteínas, se ha estudiado el efecto de variables físicas o químicas no convencionales para aumentar la velocidad de nucleación y crecimiento de los monocristales. Entre las más importantes podemos mencionar el uso de campos magnéticos ^{2,3}, de campos eléctricos externos ^{4,5,6}, de campos eléctricos internos ^{9,10,13,29}, de acoplamiento de cambios de temperatura y concentración automatizados ⁷, así como, estudios en alta presión. ⁸

Con respecto a los estudios en campos eléctricos internos, experimentos recientes demostraron que al hacer circular una pequeña corriente eléctrica entre dos electrodos de platino (del orden de algunos μAcm^{-2}) sumergidos en una disolución con proteína, el campo eléctrico generado permite dirigir la cristalización hacia uno de los electrodos, obtener cristales de alta calidad y acelerar el proceso de cristalización. ^{9,10} En esos estudios, se destacó que para obtener cristales de buen tamaño y calidad es importante controlar la corriente que circula en la celda, así como la disposición y número de los





electrodos dentro de ésta. Un gran número de electrodos perjudica el proceso y la disposición perpendicular de dos electrodos resultó la más prometedora.^{10,13}

Por lo que retomando esos resultados y tomando como base la celda en la que los electrodos están formando un ángulo de 90° , el propósito del presente trabajo es estudiar tres distintos ángulos comprendidos entre el intervalo de $0-90^\circ$. Este cambio permitirá variar la corriente eléctrica que circula sobre la superficie de los electrodos en función del ángulo formado entre ellos y su longitud. De esta manera se podrá modificar el campo eléctrico interno generado. De acuerdo a esto lo que se busca determinar es la influencia que tiene el ángulo entre dos electrodos en la cristalización.





III. HIPÓTESIS





III. Hipótesis

Si se controla el ángulo entre los electrodos que conforman la celda de crecimiento de monocristales de proteína y con ello la corriente eléctrica que circula entre estos, se permitirá modular la fuerza del campo eléctrico generado, entonces, se obtendrán monocristales de calidad cristalográfica más rápidamente que sin corriente eléctrica usando proteínas cuyas condiciones de cristalización son conocidas.





IV. OBJETIVOS





IV. Objetivos

Objetivo general

Demostrar que la técnica de crecimiento de monocristales de proteínas dentro de una celda con campo eléctrico interno de intensidad variable y con la posibilidad de ajustar ángulos, permite obtener cristales de calidad cristalográfica de distintos tipos de proteínas en menor tiempo, sin perder calidad.

Objetivos particulares

- 1) Construir una celda para crecimiento de monocristales de proteínas con un campo eléctrico interno variable que sea económica, práctica, de uso general y patentable.
- 2) Demostrar que el crecimiento de monocristales de proteínas, en una celda sometida a un campo eléctrico interno es un proceso general a las proteínas independientemente de su peso molecular y tipo.
- 3) Estudiar el efecto del ángulo entre los electrodos que conforman la celda de crecimiento y la polaridad de los electrodos.





V. ANTECEDENTES





V.1. Proteínas

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes de las células. Constituyen el 50% o más de su peso seco. Además la información genética es expresada en su mayor parte por éstas. Son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función celulares. Su estructura, así como la relación con su función biológica y actividad constituyen problemas centrales de la bioquímica actual. Existen varias clases con funciones biológicas diferentes. De manera general se pueden clasificar en dos grupos:

Tabla 1. Clasificación general de las proteínas.

Fibrosas	Globulares
Se hallan constituidas por cadenas polipeptídicas ordenadas de modo paralelo a lo largo de un eje formando fibras o láminas largas.	Están constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas.

Composición

Las proteínas están constituidas fundamentalmente por cadenas de aminoácidos y, ocasionalmente, por grupos prostéticos. Todas poseen C, H, N y O, mientras que casi todas contienen azufre. Las hay que presentan algunos elementos adicionales, particularmente P, Fe, Zn y Cu.

Cada tipo de proteína tiene una mezcla característica de 20 aminoácidos. Los 20 aminoácidos casi nunca se dan en cantidades iguales en las proteínas. Algunos pueden aparecer solamente una vez, o ninguna, en un tipo determinado de proteínas, mientras que otros pueden presentarse varias veces. El aminoácido más abundante es la leucina.

V.1.1. Funciones

Las propiedades de una proteína están determinadas, en su mayor parte, por su estructura tridimensional y su función sólo puede comprenderse refiriéndola a ésta. Existe para cada proteína un segmento de DNA que codifica la información que especifica su secuencia de aminoácidos. En una célula típica existen miles de proteínas diferentes, cada una codificada por un gen y encargada de realizar una tarea específica.





Podemos clasificar las proteínas en función de sus papeles biológicos.

Tabla 2. Tipos de proteínas y función.

Proteínas	Función
Enzimas	Son proteínas altamente especializadas que tienen actividad catalítica. Virtualmente todas las reacciones químicas de las biomoléculas orgánicas de las células están catalizadas por enzimas. Ejemplo: lipasas.
Proteínas de transporte	Fijan y transportan moléculas o iones específicos de un órgano a otro. Ejemplo: hemoglobina.
Proteínas nutrientes y de reserva	Estas almacenan nutrientes requeridos para el crecimiento. Ejemplo: ovoalbúmina y caseína.
Proteínas contráctiles o motiles	Confieren a las células y orgánulos la capacidad de contraerse, cambiar de forma o moverse. Ejemplo: actina y miosina.
Proteínas estructurales	Actúan como filamentos de soporte, cables u hojas para conferir fuerza o protección a las estructuras biológicas. Ejemplo: colágeno y queratina.
Proteínas de defensa	Defienden a los organismos contra la invasión por otras especies o los protegen contra las heridas. Ejemplo: inmunoglobulinas.
Proteínas reguladoras	Ayudan a regular la actividad celular o fisiológica. Ejemplo: hormonas.

V.1.2. Estructura

La descripción estructural de las proteínas, se ha formulado refiriéndolas a cuatro niveles de organización:

- 1. Estructura primaria.** Es la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica.
- 2. Estructura secundaria.** Se refiere a dos motivos estructurales específicos: la hélice α y la conformación β plegada. En esta no se tiene en cuenta la conformación de las cadenas laterales.
- 3. Estructura terciaria.** Es la estructura tridimensional del polipéptido completo.
- 4. Estructura cuaternaria.** Se refiere a la asociación de una o más cadenas polipeptídicas (subunidades) que se asocian mediante interacciones no covalentes y en algunos casos por enlaces disulfuro.



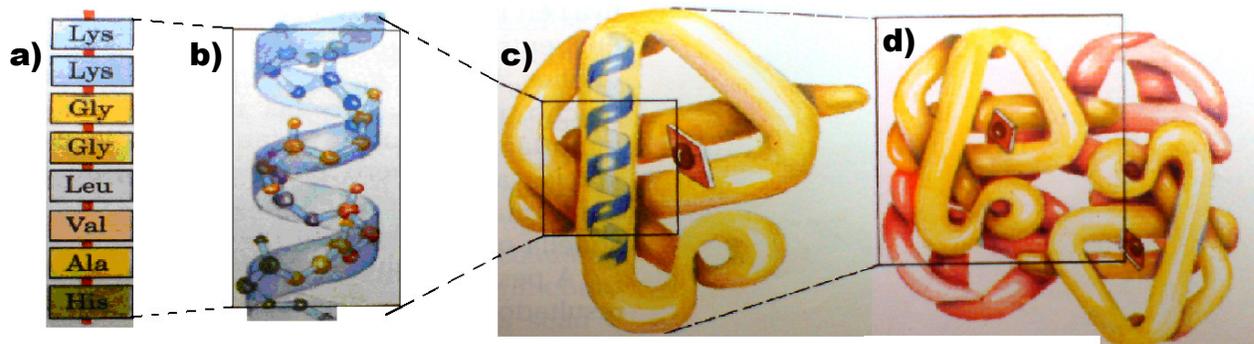


Figura 1. Niveles de estructura en proteínas. a) Estructura primaria. b) Estructura secundaria. c) Estructura terciaria. d) Estructura cuaternaria.

V.1.3. Estructura tridimensional

Importancia de la cristalización de biomoléculas - determinación de la estructura tridimensional

1. Las comparaciones de secuencia entre proteínas análogas del mismo individuo, de miembros de la misma especie y de miembros de especies relacionadas han proporcionado una visión importante de como funciona una proteína y han indicado las relaciones evolutivas entre las proteínas y los organismos que las producen. Estos análisis complementan y extienden estudios taxonómicos análogos basados en comparaciones anatómicas.¹⁷
2. Los análisis de la secuencia de aminoácidos tienen aplicaciones clínicas importantes ya que muchas enfermedades hereditarias se producen por mutaciones que conducen a un cambio de un aminoácido en una proteína. El reconocimiento de este hecho ha conducido al desarrollo de métodos de diagnóstico valiosos para muchas de tales enfermedades y, en varios casos, a terapias que alivian los síntomas (Diseño de fármacos).¹⁷
3. Con base en la estructura se pueden hacer modificaciones genéticas con algún fin práctico (incrementar estabilidad o afinidad por sustratos, inhibidores, etc.).⁹





En resumen se puede enlistar la importancia de conocer la estructura tridimensional de una proteína en:

- a) Estudios de relación estructura función.
- b) Estudios de mecanismos de interacción entre un inhibidor y una enzima.
- c) Diseño de fármacos.
- d) Diseño de productos genéticamente modificados.
- e) Entender las familias estructurales de las proteínas, cuáles son los plegamientos y la relación que existe entre estructura y función.

V.2. Cristalogénesis biológica

Es una ciencia multidisciplinaria que estudia la fisicoquímica del crecimiento de cristales de macromoléculas biológicas, ya sean proteínas, ácidos nucleicos o polisacáridos, y de la búsqueda de mejores condiciones para su cristalización. Apareció junto con las técnicas biotecnológicas modernas, y particularmente con la ingeniería de macromoléculas. La razón fue la necesidad de un conocimiento estructural de las biomoléculas. La complejidad de la cristalogénesis biológica se debe al requerimiento del manejo de numerosas técnicas de aislamiento, purificación y cristalización.²⁶ Además el estudio fisicoquímico de moléculas de alto peso molecular es más complicado que el de moléculas pequeñas, debido principalmente al gran número de parámetros que se debe controlar y a las peculiares propiedades fisicoquímicas que poseen.¹⁹

Tabla 3. Similitudes entre la cristalización de macromoléculas y compuestos de bajo peso molecular.

Cristalización de macromoléculas y compuestos de bajo peso molecular
<p style="text-align: center;"><u>Similitudes</u></p> <ul style="list-style-type: none">▪ Obedecen las mismas leyes fundamentales de la termodinámica.▪ Pertenecen a la misma clase cristalina.▪ Las velocidades de crecimiento cristalino varían con las condiciones experimentales.▪ La sobresaturación es la fuerza motriz para la nucleación.▪ Los cristales tienen morfologías determinadas por estructuras moleculares o atómicas y por las condiciones de crecimiento cristalino.▪ Las morfologías pueden ser modificadas variando las condiciones experimentales y/o impurezas.



**Tabla 4.** Diferencias entre la cristalización de macromoléculas y compuestos de bajo peso molecular.

Cristalización de macromoléculas y compuestos de bajo peso molecular		
Diferencias		
<i>Característica</i>	<i>Moléculas pequeñas</i>	<i>Proteínas</i>
Tamaño de cristal.	De centímetros a metros.	Milímetros.
Tipo de enlace.	Todos los tipos y mezclas.	Molecular y puentes de hidrógeno.
Efecto de la carga electrostática.	Rara vez observado.	Importante.
Degradación de tipo biológico.	No observado en general.	Es importante.
Resolución estructural (morfología y tamaño).	Compleja.	Muy compleja.
Contenido de agua libre.	Como disolvente atrapado.	Forma parte de la estructura.

Cuando se planea cristalizar una macromolécula biológica, se debe conocer la solubilidad de la misma, y aunque tiende a variar con una gran cantidad de parámetros, puede ser propiamente descrita mediante el uso de los diagramas de Ostwald-Miers. Como el mostrado en la **Figura 2**, en donde la concentración del equilibrio (solubilidad) de la proteína se grafica con respecto a la concentración del agente precipitante.

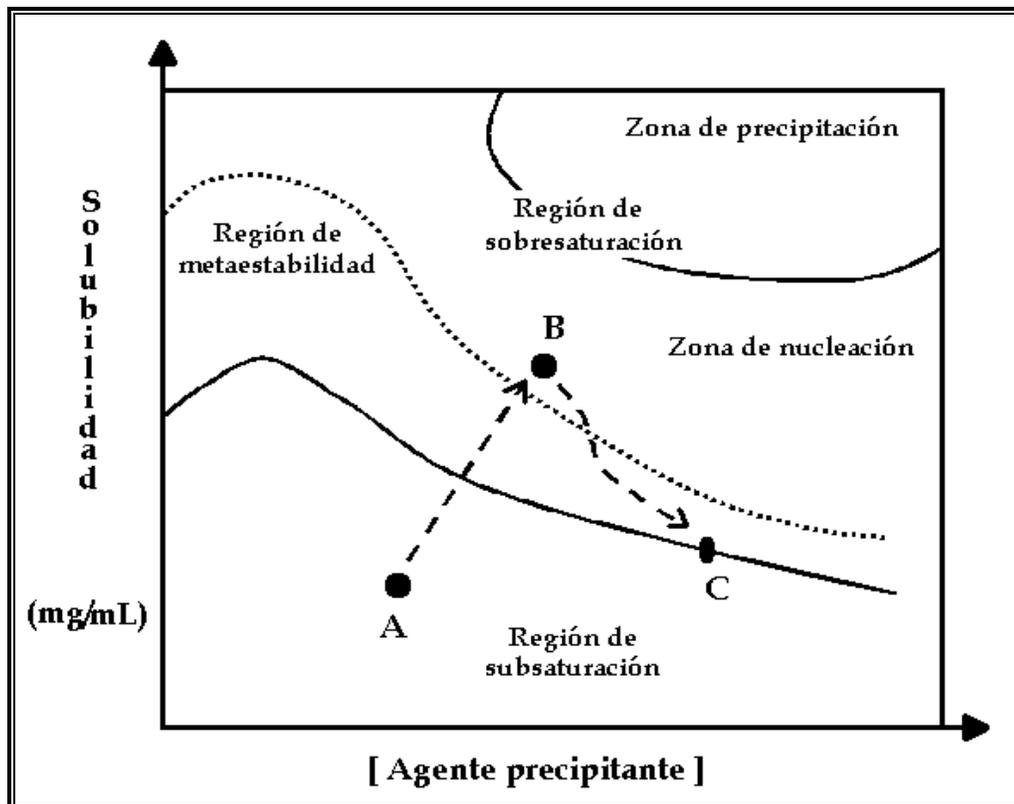


Figura 2. Gráfica de Ostwald-Miers. Esta gráfica muestra el camino de la cristalización de una macromolécula biológica, comenzando a una concentración de subsaturación (punto A), para posteriormente alcanzar una sobresaturación (punto B), donde se produce la nucleación, y finalmente se tiende al equilibrio en donde se obtienen los cristales (punto C).





De acuerdo a esta gráfica a bajas concentraciones de agente precipitante ocurre un fenómeno conocido como salting-in, el cual se explica debido a las interacciones electrostáticas no-específicas entre iones, fenómeno descrito en el marco de la teoría de Debye-Hückel. Sin embargo, a alta fuerza iónica, la solubilidad de la proteína está gobernada por efectos hidrofóbicos y decrece con la concentración de la sal empleada. El fenómeno conocido como salting-out permite que la proteína tienda a precipitar, separándose del seno de la disolución.

La cristalización involucra principalmente los siguientes pasos:

1. La formación del núcleo (fase de nucleación). Implica un 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 logra cuando se alcanza la sobresaturación (**punto B, Figura 2**) y puede llevarse a cabo sobre partículas de una 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 (fase de crecimiento). Es la etapa de transición en la que el núcleo aumenta su tamaño para formar el cristal. Debe realizarse a una velocidad y temperatura constante 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 2**).
3. La obtención del cristal. En esta etapa el cristal llega a su tamaño final (**punto C, Figura 2**). Si el proceso de cristalización se realizó 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, con lo que se obtienen patrones de difracción con alta resolución que puedan caracterizar el cristal.





V.2.1. Factores que afectan la cristalización

La cristalización de proteínas debe ser entendida considerando dos factores: el equilibrio termodinámico que está relacionado con la solubilidad y el factor cinético, que se relaciona con el control de la nucleación y crecimiento cristalino. Para la cristalización de una proteína es necesario alcanzar el punto de sobresaturación, un estado termodinámicamente metaestable. Una vez que se inicia la cristalización, el sistema tiende a alcanzar el estado de equilibrio.

Como se sabe, las soluciones de macromoléculas son sistemas fisicoquímicos extremadamente complejos, cuyas propiedades varían en función del entorno en el que se encuentren debido a los múltiples grupos ácido-base que contienen los aminoácidos que las conforman. Es por ello que son dependientes de diferentes condiciones tales como: **la temperatura, el pH, la fuerza iónica, los aditivos, la composición del disolvente y la pureza de la proteína.** Consecuentemente el tamaño de los cristales depende del grado de sobresaturación y del comportamiento cinético que haya tenido la proteína en la nucleación y crecimiento cristalino, por lo que es esencial controlar estos factores.

A continuación se describirá cada uno de los factores que afectan la cristalización:

Temperatura ¹⁹

La solubilidad de las proteínas usualmente se incrementa con la temperatura, pero lo contrario es también observado en algunos casos. Como la mayoría de las proteínas son estables entre 0 y alrededor de 40 °C, la temperatura solo puede modificarse dentro de un intervalo limitado. De manera general, la solubilidad de éstas es más sensible a variaciones de la temperatura cuando hay bajas concentraciones de sal.

pH

Las proteínas son portadoras, en general, de numerosos grupos ionizables que exhiben una variedad de valores de pKa's. Cada proteína muestra un valor de pH característico en el que las cargas positivas de la molécula se contrarrestan exactamente con las cargas negativas. En este valor de pH, que es el punto isoeléctrico de la proteína, (pI),





la solubilidad de la molécula tiende a ser la más baja, ya que su carga neta es igual a cero. Si una proteína se encuentra en un pH por encima de su pI , ésta va a tener una carga neta negativa y cuando se encuentra por debajo va a tener una carga neta positiva.¹⁶

Variaciones en el pH afectan fuertemente la solubilidad de la proteína, debido a que al cambiar las propiedades ácido-base del medio, se modifican las interacciones moleculares del medio con la macromolécula y las interacciones intramoleculares de la misma.

Cabe recordar también que:¹⁹

- La mayoría de las proteínas no son estables a lo largo de un rango amplio de pH.
- Los cristales obtenidos a diferentes valores de pH pueden pertenecer a distintos grupos espaciales.
- Cuando se varía el pH cerca del pK_a de los residuos de aminoácidos cargados más numerosos, la solubilidad cambia rápidamente.
- Cuando se modifica el pH lejos de los valores de pK_a de los residuos de aminoácidos cargados, la solubilidad cambia lentamente.
- La naturaleza del amortiguador usado es de suma importancia, puesto que puede presentar interacciones con el material biológico, cambiando así la solubilidad de la proteína, por lo que debe tomarse en cuenta, así como su concentración. También hay que recordar que estudiar la solubilidad de una proteína a lo largo de un amplio rango de pH usualmente significa cambiar la naturaleza del mismo.

Efecto de las concentraciones salinas - Fuerza iónica¹⁶

La solubilidad de una proteína en disolución acuosa es una función sensible a las concentraciones de sales disueltas. La concentración salina se expresa en términos de la fuerza iónica, I , que se define:

$$I = 1/2 \sum c_j Z_j^2$$





En esta ecuación c_j es la concentración molar de las especies iónicas y Z_j es su carga iónica. Este parámetro es de utilidad para cuantificar los efectos de las cargas. Sin embargo, la solubilidad de una proteína a una fuerza iónica determinada varía con el tipo de iones que se hallan en la disolución. La eficacia con que éstos influirán sobre la solubilidad de la biomolécula dependerá principalmente de su tamaño e hidratación.

La solubilidad cuando la fuerza iónica es pequeña aumenta, en general, con la concentración salina (salting-in). La explicación de este fenómeno de disolución por salado es que, a medida que se incrementa la concentración de sal en la disolución de proteína los contra-iones recubren con más eficacia a las múltiples cargas de las moléculas de proteína incrementándose, por ello, la solubilidad de ésta.

Al contrario cuando las fuerzas iónicas son elevadas, las solubilidades de las proteínas disminuyen, como ocurre con otras sustancias (salting-out). Este efecto, conocido como precipitación por salado, es una consecuencia primaria de la competencia entre los iones de la sal que se han añadido y los demás solutos disueltos por las moléculas de solvatación. Cuando las concentraciones salinas son altas, se hallan solvatados tantos iones que la cantidad del grueso del disolvente de que se dispone llega a ser insuficiente para disolver otros solutos. En términos termodinámicos, la actividad del disolvente disminuye. De aquí que las interacciones soluto-soluto se hacen más fuertes que las interacciones soluto-disolvente y el soluto precipita.

Disolvente

Para la elección del disolvente adecuado, se deben considerar los siguientes aspectos:

- a) Debe disolver a la proteína sin producirle alteraciones estructurales.
- b) La capacidad de disolver la proteína debe durar largos periodos de tiempo, es decir, que sea estable en tiempos prolongados.

Los disolventes orgánicos tienden a precipitar a las proteínas ya que disminuyen la constante dieléctrica del medio, provocando cambios en las interacciones intramoleculares (soluta-soluta, disolvente-soluta, entre otras).¹⁹ Sin embargo pueden





modificar la estructura de la proteína, por lo que es recomendable evitarlos. Otro tipo de agentes precipitantes son los polietilenglicoles (PEG), estos cuentan con propiedades de exclusión de disolvente, reestructurándolo y promoviendo una separación de fases. Estos polímeros, a pesar de ser compuestos orgánicos no afectan la estructura de la proteína por lo que son ampliamente usados en la cristalogénesis biológica.¹³

Pureza¹⁹

Como las macromoléculas son extraídas de matrices biológicas complejas, la purificación juega un rol extremadamente importante en la cristalogénesis. Sin embargo, la pureza no es un requerimiento absoluto ya que a veces es posible obtener cristales a partir de mezclas. Pero esos cristales son en su mayor parte pequeños o crecen como masas policristalinas, poseen defectos, y son de calidad de difracción mala, y así no pueden ser usados para estudios de cristalografía de rayos X. Para ello, monocristales de alta calidad y tamaño apreciable (0.2mm por lo menos para la dimensión de una cara) son necesarios. En cristalogénesis la pureza debe ser de “grado cristalográfico”, las macromoléculas no solo tienen que ser puras en términos de carencia de contaminantes, sino también deben ser conformacionalmente puras y sin agregados.

V.2.2. Influencia de los parámetros de cristalización¹⁹

La influencia de los parámetros de la cristalización puede evaluarse a través de un diagrama de solubilidad (**Figura 3**). El cual debe contener las siguientes zonas:

- 1) La curva de saturación o curva de equilibrio, divide las regiones de subsaturación y sobresaturación, ésta posee una naturaleza termodinámica.
- 2) El área bajo la curva de saturación, la solución aquí es subsaturada y la macromolécula jamás cristalizará.
- 3) La zona por encima de la curva de solubilidad es denominada región de sobresaturación, donde la concentración de la proteína es más alta que la concentración de equilibrio, para una concentración de sal dada. Aquí la descripción de fenómenos de agregación tiene que ver con aspectos cinéticos relacionados con la nucleación y crecimiento de cristales.



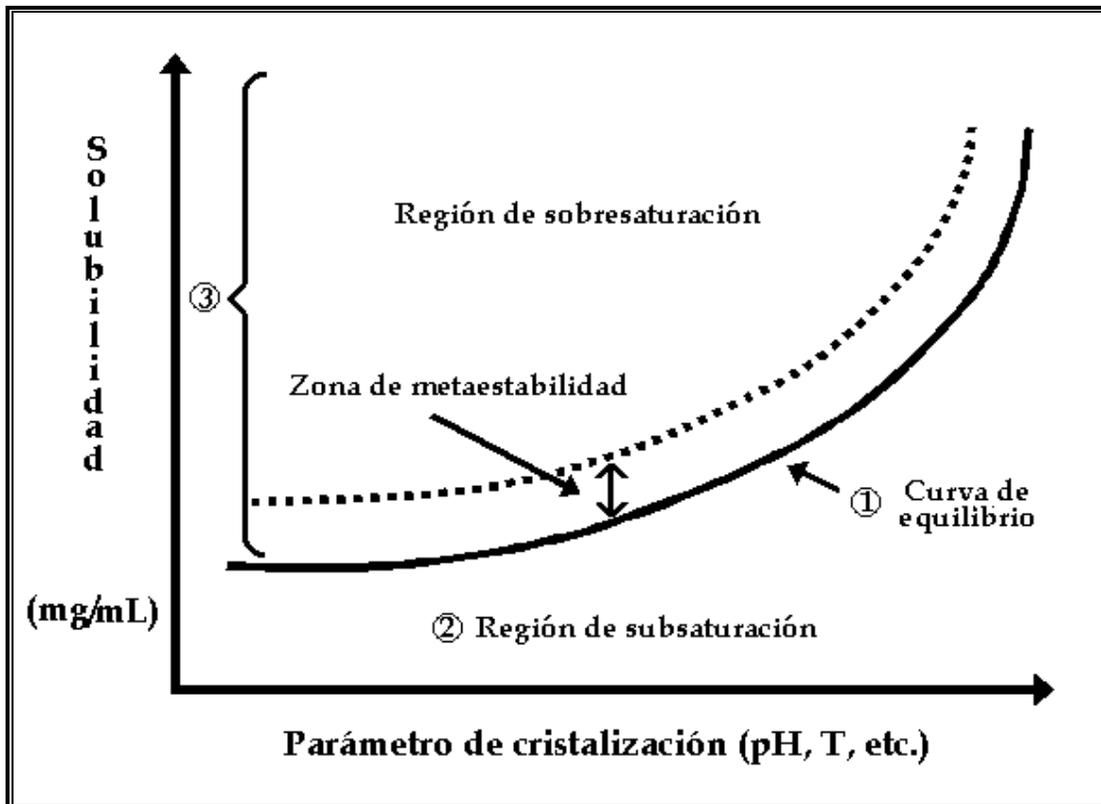


Figura 3. Zonas de la curva de solubilidad para una proteína. 1) La curva de saturación o equilibrio. 2) La región de subsaturación. 3) La región sobresaturada.

En general el crecimiento de un cristal debe realizarse lentamente, para de esta manera lograr un arreglo regular de iones, moléculas o macromoléculas, que permitan la obtención de un cristal de calidad cristalográfica.

El transporte de masa debe ser controlado fundamentalmente por difusión, con lo que se asegura que la velocidad de acomodo de las proteínas en el cristal es adecuada para generar cristales de alta calidad.

V.2.3. Métodos de cristalización de macromoléculas

Para la obtención de cristales biológicos se utilizan diversos métodos de cristalización. Existen métodos en disolución, donde la cristalización puede ser en microdiálisis o macrodiálisis. En ambos la macromolécula se separa de un volumen grande de disolvente mediante una membrana permeable que da a las moléculas pequeñas (iones, aditivos, amortiguador y otros) paso libre, pero previene la salida de la biomolécula.



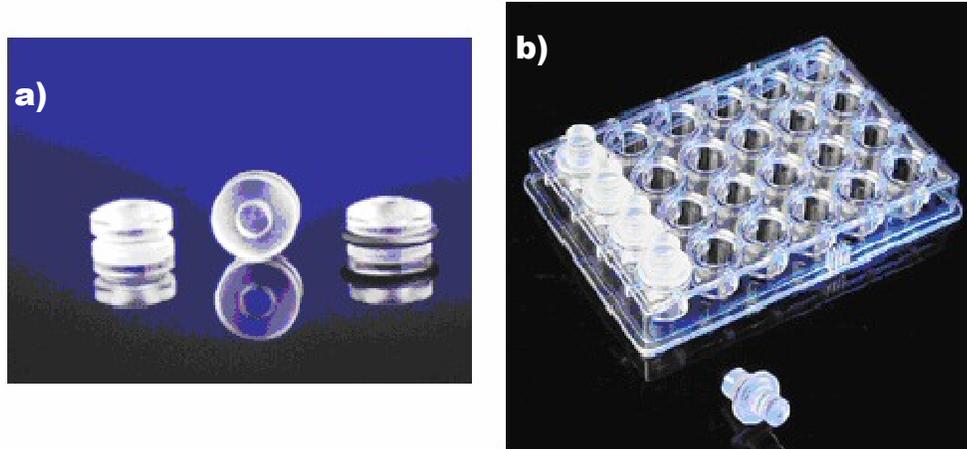


Figura 4. a) Botones de microdiálisis. b) Kit de cristalización mediante diálisis doble. Imagen tomada de http://imaisd.usc.es/raidt/raiosx/descrip_cristal.html#dialisis

Existen otros métodos que son probablemente los más ampliamente usados en todo el mundo, a estos se les llama métodos de difusión en fase vapor o mejor conocidos como clásicos. En éstos se tiene una gota que contiene la macromolécula a cristalizar con amortiguador, agente precipitante y aditivos, esta se equilibra contra un recipiente que contiene solución de agente precipitante a una concentración mayor que la que posee la gota. El equilibrio procede mediante la difusión de las especies volátiles (agua o disolventes orgánicos) hasta que la presión de vapor en la gota iguala la presión de vapor del recipiente. Si el equilibrio ocurre por intercambio de agua (de la gota al recipiente), esto conduce a un cambio en el volumen de la gota. Consecuentemente, la concentración de todos los componentes en la gota cambiará, hasta llegar a un nivel óptimo para que suceda la cristalización. Para especies con una presión de vapor mayor a la del agua, el cambio ocurre del recipiente a la gota. El mismo principio aplica para gota sedente, gota colgante y gota en sándwich.

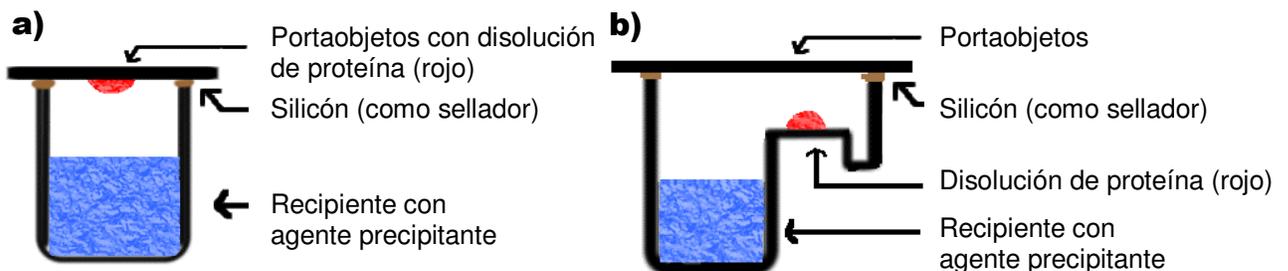


Figura 5. a) Diagrama del método de la gota colgante. b) Diagrama del método de la gota sedente. Imagen tomada de http://www.dt.k.u-tokyo.ac.jp/research/PC_2.htm





Otro método de cristalización, es el método batch y es el más sencillo para llevar a cabo la cristalización de una proteína. Consiste en mezclar todos los componentes necesarios para llevar a cabo la cristalización: la proteína, el agente precipitante a una concentración tal de proteína de modo que la sobresaturación es instantáneamente alcanzada; para posteriormente dejar reposar el sistema hasta obtener los cristales.

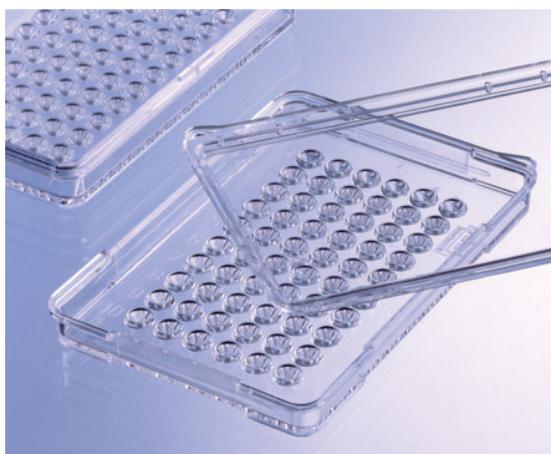


Figura 6. Plato Terasaki para cristalización en microbatch. Imagen tomada de <http://www.ultident.com/images/Greiner-Terasaki-Plate.jpg>

Sin embargo, a pesar de que se dispone de diversos métodos para lograr la obtención de cristales de alta calidad, es necesario desarrollar nuevas técnicas de crecimiento que permitan mejorar el tamaño del cristal y disminuir el tiempo requerido para obtenerlos. Es por eso que estos últimos años se han realizado estudios de algunos parámetros fisicoquímicos para controlar el fenómeno de cristalización. Entre los más relacionados con este trabajo se encuentran estudios de campo magnético, de electroenfoco y la aplicación de un campo eléctrico interno y externo.⁹

Con respecto a la aplicación del campo eléctrico interno que es el tema fundamental de esta tesis, estudios recientes demostraron que cuando se aplica una corriente eléctrica directamente a una disolución se genera un campo eléctrico interno, este campo eléctrico generado permite dirigir la cristalización hacia uno de los electrodos.¹³ Además, el proceso de obtención de monocristales de calidad cristalográfica fue acelerado drásticamente, requiriendo menos de la mitad del tiempo comparado con la cristalización sin corriente eléctrica.⁹ Para comprender un poco más este fenómeno se comentarán algunos antecedentes de electroquímica.





V.3. Electroquímica ¹¹

Es la rama de la química que estudia la interrelación de efectos eléctricos y químicos; se encarga de analizar las propiedades eléctricas (voltaje, corriente o resistencia y tiempo, o la combinación de estas) y su relación con los sistemas químicos.¹¹

Los fenómenos electroquímicos más ampliamente estudiados y utilizados son los que se llevan a cabo en disolución. Estos requieren de un flujo de cargas, es decir, es imprescindible la presencia de elementos portadores de carga eléctrica; denominados iones. Estas partículas “llevan” a los electrones liberados en el cátodo (**electrodo negativo, Figura 7**) hacia el ánodo (**electrodo positivo, Figura 7**) a través de la disolución mediante una reacción electroquímica. Sin embargo, para que la conducción eléctrica implique cambios fundamentales de tipo fisicoquímico en el seno de la disolución, se requiere de especies electroactivas, las cuales son verdaderos aceptores de electrones (especie oxidante) en el cátodo y donadores de electrones (especie reductora) en el ánodo. Cabe mencionar que como consecuencia del principio de electroneutralidad de las soluciones, ambas reacciones ocurren simultáneamente en ambos electrodos.

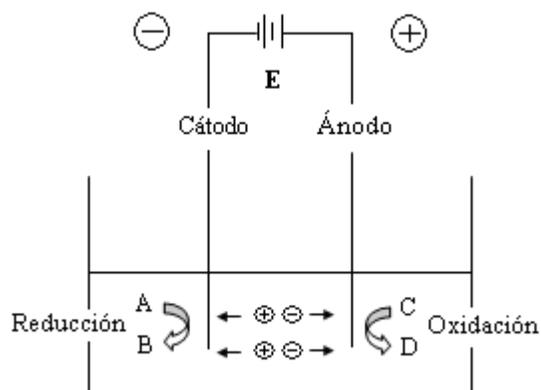


Figura 7. Disolución electrolítica con dos electrodos (cátodo y ánodo) y especies electroactivas A y C.

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.





- b) Los iones, una vez orientados, fluyen hacia los electrodos a una velocidad particular y con una dinámica característica proporcional al voltaje impuesto entre ambos electrodos (migración iónica).
- c) 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 o evolución de gases.
 3. Reaccionando químicamente para producir un nuevo compuesto (reacción acoplada).
 4. Reaccionando con el electrodo, formando compuestos poco deseables (corrosión o adsorción).

V.3.1. Procesos faradaicos y no faradaicos ¹¹

Dos tipos de procesos pueden ocurrir en los electrodos. Un tipo comprende reacciones en la que las cargas (ej. electrones) son transferidas a través de la interfase metal-solución. La transferencia de electrones causa que ocurran oxidaciones o reducciones. Como estas reacciones son gobernadas por la ley de Faraday (por ejemplo, la cantidad





de reacción química causada por el flujo de corriente es proporcional a la carga eléctrica que pasó por el sistema), se denominan procesos faradaicos. Los electrodos en los que ocurren procesos faradaicos son a veces llamados electrodos de transferencia de carga. Sin embargo, procesos como desorción o adsorción pueden ocurrir, y la estructura de la interfase electrodo-solución puede cambiar modificando el potencial o la composición de la solución. Estos procesos son llamados procesos no faradaicos. Ambos procesos, faradaicos y no faradaicos, ocurren cuando reacciones de electrodo se llevan a cabo.

V.3.2. Celdas electroquímicas – tipos y definiciones ¹¹

Las celdas electroquímicas en donde corrientes faradaicas están fluyendo se clasifican como celdas galvánicas o electrolíticas. Una celda galvánica es aquella en la que las reacciones ocurren espontáneamente en los electrodos cuando estos son conectados externamente por un conductor. Estas celdas son generalmente usadas para convertir energía química a energía eléctrica.

Una celda electrolítica es donde las reacciones son afectadas por la imposición de un voltaje externo mayor que el potencial del circuito abierto de la celda. Éstas son frecuentemente usadas para llevar a cabo reacciones químicas deseadas usando energía eléctrica. El electrodo donde ocurre la reducción es llamado cátodo (negativo) y el electrodo donde ocurre la oxidación es llamado ánodo (positivo).

Una corriente en la que los electrones atraviesan la interfase del electrodo a las especies en solución es una corriente catódica, mientras que cuando el flujo de electrones de las especies de la solución va hacia el electrodo es una corriente anódica.

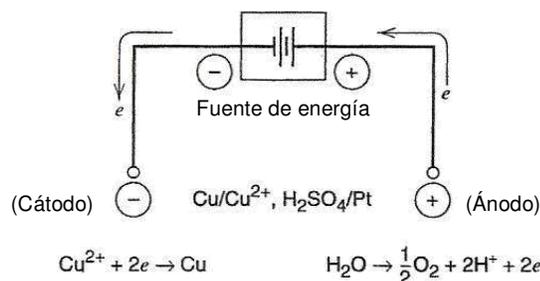


Figura 8. Celda electrolítica.





V.3.3. Variables en celdas electroquímicas

Las celdas electroquímicas permiten aplicar cierta variable de excitación (ej. un pulso de potencial) y medir una cierta respuesta (ej. la variación resultante de la corriente con el tiempo). Todas las demás variables del sistema son mantenidas constantes. El objetivo del experimento es obtener información (termodinámica, cinética, analítica, etc.) a partir de la observación de la excitación y funciones de respuesta y un conocimiento de modelos apropiados para el sistema.

Los procesos más importantes en las celdas electroquímicas son:

1. Transferencia de masa.
2. Transferencia de electrones en la superficie del electrodo.
3. Reacciones químicas anteriores o posteriores a la transferencia de electrones. Estos pueden ser procesos homogéneos (ej. protonación o dimerización) o heterogéneos (ej. descomposición catalítica) en la superficie de los electrodos.
4. Otras reacciones superficiales, como desorción, adsorción o cristalización (electrodeposición).

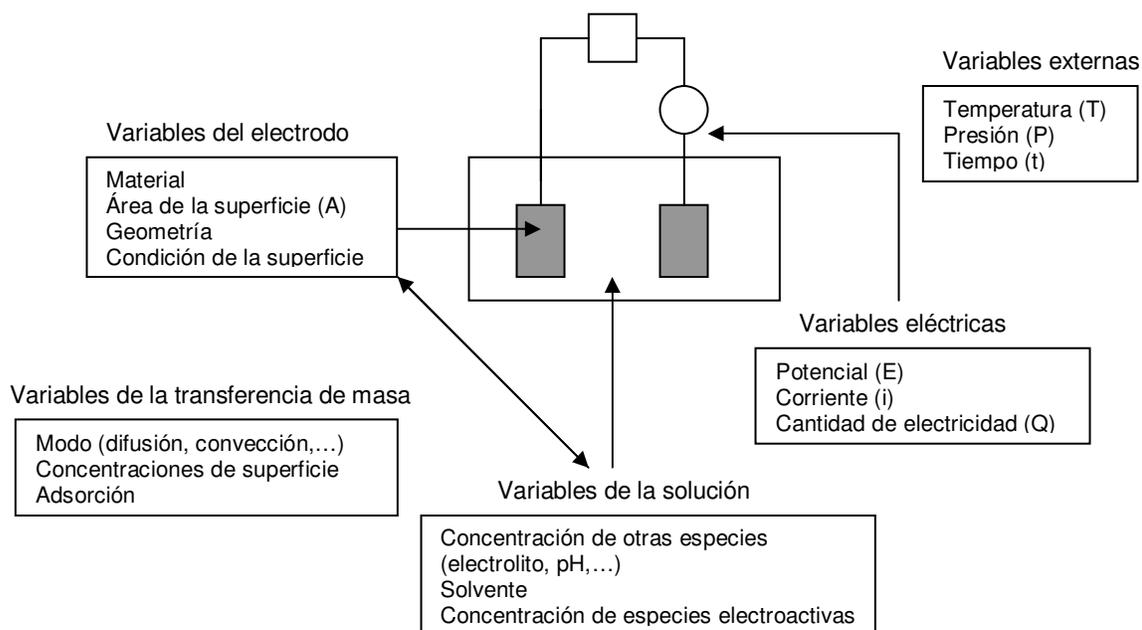


Figura 9. Variables que afectan la velocidad de una reacción de electrodo.





V.3.4. Transporte de iones en solución

Un sistema electroquímico se basa en reacciones de transferencia de carga en las interfases electrodo-electrolito. Estas reacciones involucran iones o moléculas que son componentes del electrolito. Por lo tanto, el transporte de partículas hacia o lejos de la interfase, se convierte una condición esencial para la transformación electroquímica continua de reactivos en la interfase. La transferencia de masa es el movimiento de material de un lugar en la solución a otro y ocurre por diferencias en potencial químico o eléctrico en las dos zonas o bien por el desplazamiento de un elemento de volumen de la solución. Juega un papel primordial en la dinámica electroquímica y presenta tres tipos:

1. Migración

Esta consiste en el movimiento de un cuerpo cargado bajo la influencia de un campo eléctrico (Un gradiente de potencial eléctrico). Ocurre cuando hay diferencias en potencial electrostático en varios puntos del electrolito, el campo eléctrico resultante produce un flujo de carga en la dirección del campo.

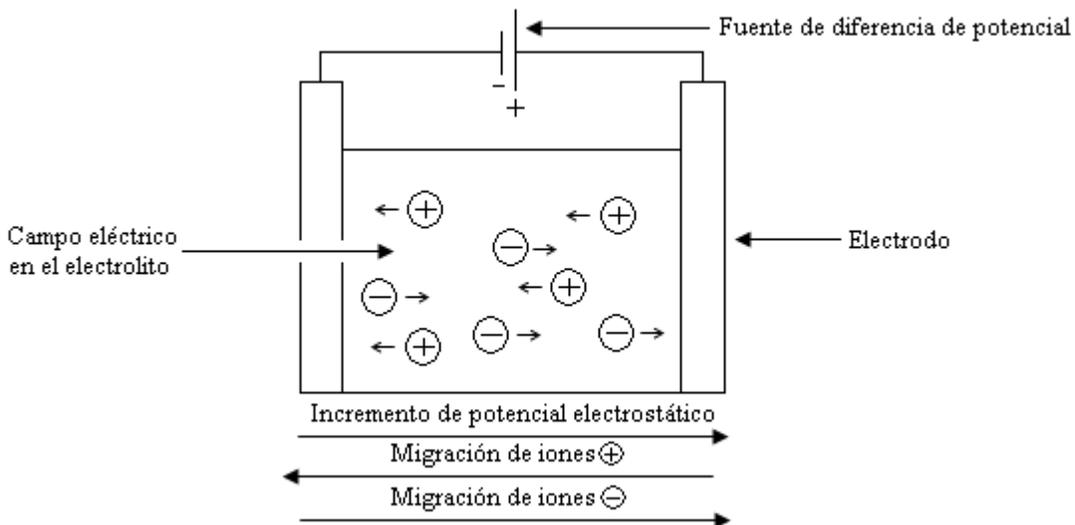


Figura 10. Migración de iones como resultado de un gradiente de potencial electrostático (ej. un campo eléctrico) en un electrolito. El campo eléctrico es producido por la aplicación de una diferencia de potencial entre dos electrodos inmersos en el electrolito.





2. Difusión

Es el movimiento de una especie bajo la influencia de un gradiente de potencial químico (ej. un gradiente de concentración). Ocurre cuando la concentración de las especies difusivas es desigual en diferentes partes del electrolito, el gradiente de concentración resultante produce un flujo de iones en dirección contraria al sitio de mayor potencial químico.

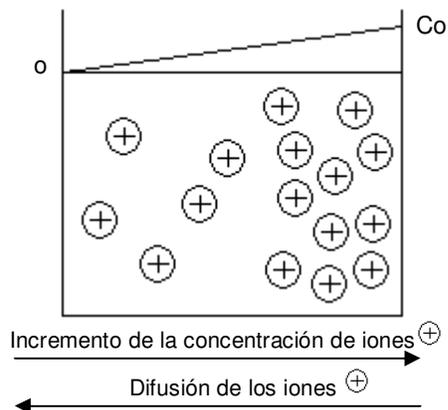


Figura 11. Difusión de iones positivos como resultado de un gradiente de concentración de estos iones en una solución electrolítica.

3. Convección

Es una agitación o transporte hidrodinámico, conocido como flujo de fluido debido a una convección natural (convección causada por gradientes de densidad) o a una convección forzada. Puede ser caracterizada como regiones estancadas, flujo laminar y flujo turbulento. Ocurre cuando existen diferencias de presión, densidad o temperatura en varias partes del electrolito, el líquido se empezará a mover como un todo o partes de él se moverán en relación a otras partes.

V.3.5. Técnicas de electroanálisis

Estas técnicas se basan en la imposición de una perturbación al sistema de estudio y la medida de respuesta obtenida, las cuales se diferencian entre sí por sus características operacionales. Entre ellas se encuentran:





- **Potenciométricas de corriente nula**

El objetivo es la medición de la diferencia de potencial, E_{celda} , entre dos electrodos cuando no fluye corriente alguna.

- **Galvanostáticas**

Cuando se aplica a la celda una intensidad de corriente dada, registrando los cambios en potencial.

- **Potenciostáticas**

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, estas 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.

V.3.6. Electrólisis

La electrólisis a corriente controlada que es la empleada en esta tesis, consiste en mantener la corriente eléctrica constante durante el transcurso de la reacción química. La cantidad total de carga eléctrica necesaria, para llevar a cabo dicha reacción, es determinada mediante la ley de Faraday, la cual esta 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, 485.4 C/mol).





En este método, a medida que progresa la electrólisis cambia la relación [Red]/[Ox], con lo que el potencial del electrodo se modifica hacia valores más altos. Este aumento de potencial puede dar lugar a la iniciación de otra reacción electroquímica (con frecuencia electrólisis del medio o reacciones de barrera). Por lo que debido a que el potencial del electrodo no se mantiene constante, no siempre es posible llevar a cabo este tipo de reacción selectivamente.

V.3.7. Cristalización de proteínas electroquímicamente asistida

Al obtener un cristal el mayor interés es que sea útil para obtener la estructura tridimensional de la proteína en cuestión. Es por esto que se han desarrollado nuevos métodos con el fin de resolver este problema y lograr que los cristales sean de una calidad tal, que sea posible usarlos para difracción de rayos X. Entre estos métodos se encuentra el uso de un campo eléctrico interno durante el proceso de cristalización.

La idea básica de este método es hacer que el sistema se encuentre en el área de nucleación del gráfico de solubilidad y dar energía al sistema para que espontáneamente se produzca la primera nucleación.²⁸

Este método requiere que los electrodos estén en contacto con la solución de cristalización y un control preciso de la corriente eléctrica aplicada ya que, de no ser así, se puede inducir reacciones electroquímicas no deseadas en los electrodos debido al cambio en el potencial.

La corriente capacitiva está asociada con la migración de iones que cargan la doble capa eléctrica de los electrodos con iones de polaridad opuesta. El fenómeno de transporte de iones provoca un flujo de masa controlado dirigido hacia los electrodos. En el caso de disoluciones de proteínas, estas macromoléculas pueden ser consideradas como macro iones debido a la carga neta que presentan al pH de cristalización.²⁸ Por lo que es posible acelerar el proceso de cristalización (debido a un incremento en la cinética de crecimiento cristalino), favorecer la cristalización hacia uno de los electrodos, adsorción cristalina sobre los mismos y lograr una calidad de cristales apta para difracción de rayos X.^{9,10,29,31}





V.3.7.1. Estudios previos realizados

Los estudios previamente realizados por Moreno y Sazaki (2004) al igual que Nieto-Mendoza E. (2005) y N. Mirkin (2005), coincidieron que el campo eléctrico ejerce un control en la nucleación. Moreno y Sazaki trabajando con un sistema de electrodos paralelos en contacto con una solución de lisozima y agente precipitante (batch) observaron que se formaban cristales en el entorno del cátodo y adsorbidos a éste.

Nieto-Mendoza E. usando celdas de crecimiento con múltiples electrodos, destacó que para conseguir cristales de buen tamaño y calidad, además de reducir el tiempo de obtención, es importante controlar la corriente que circula en la celda, así como la disposición y número de electrodos dentro de la misma. Un gran número de electrodos perjudica el proceso y la disposición perpendicular de dos electrodos resultó la más prometedora.

N. Mirkin mostró que la presencia del campo eléctrico permite tiempos de inducción menores, favoreciendo la nucleación pero sin alterar la calidad estructural.^{9,10,31}

Por último estudios más recientes (Pérez 2008) en donde se usó a la proteína citocromo c, mostraron que al aplicar corriente eléctrica el tiempo de cristalización se vió drásticamente disminuido, permitiendo obtener cristales en tan sólo una semana (contra 60 días en microsiembra), alcanzar una alta resolución de los mismos y la cristalización de sólo una de las isoformas presentes en la muestra.²⁹

V.4. Proteínas a estudiar

V.4.1. Lisozima

Es una proteína globular básica (pI 11) constituida por una cadena de 129 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 14.7 kDa. Su actividad consiste en catalizar la hidrólisis de los enlaces β -1,4 entre los residuos del ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en peptidoglucano, cumpliendo así una función antibacteriana, ya que destruye la pared de bacterias Gram positivas. También cataliza la hidrólisis entre los residuos de N-acetil-D-glucosamina en citodextrinas. Esta enzima solo es efectiva





contra bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas y levaduras son completamente resistentes a la lisis por ésta.

Su estructura contiene cuatro puentes disulfuro, los que provocan que su forma sea pseudo helicoidal (30x30x45Å) y que contribuyen a la estabilidad de su estructura (**Figura 12**). Aproximadamente un 40% de sus 129 aminoácidos se encuentran en fragmentos de hélice alfa, un 12% en estructura beta y el resto son regiones de enrollamiento al azar. Las hélices α se hallan situadas en una larga hendidura en el lateral de la molécula, denominada centro activo, donde tiene lugar la fijación del sustrato y se lleva a cabo la función biológica. El polisacárido bacteriano que actúa como sustrato de la lisozima se encaja en esta hendidura.

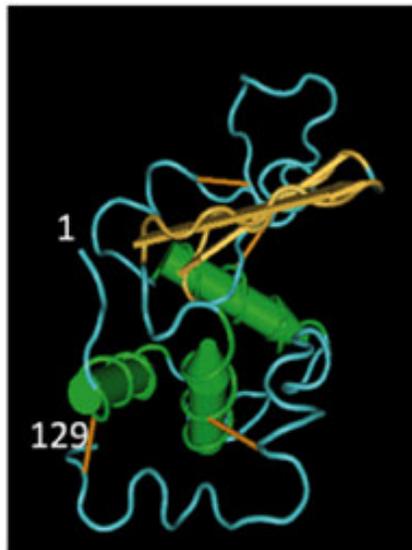


Figura 12. Estructura nativa de la lisozima de huevo de gallina. Los residuos de aminoácidos están numerados del grupo α terminal (N) al grupo terminal carboxilo (C). Las líneas naranjas indican los cuatro puentes disulfuro. Las hélices α son visibles en los rangos de 25 a 35, 90 a 100, y 120 a 125. Figura tomada de <http://www.biomedcentral.com/14712105/9/S7/P23>

Se presenta en diversos sitios y especies, en los humanos se encuentra en las secreciones mucosas como la saliva, lagrimas, moco nasal, flemas y tejidos. En los animales se halla en altas concentraciones en la clara de huevo de gallina. La función de la lisozima en este caso es proteger las proteínas y grasas que alimentarán al polluelo que se desarrolla contra el ataque de bacterias durante su crecimiento. En esta tesis se trabajó con lisozima de huevo de gallina.





La lisozima ha sido ampliamente investigada y utilizada como modelo para estudios de cristalización de macromoléculas, ya que posee bajo peso molecular, cristaliza muy rápido y sus condiciones de cristalización son ampliamente conocidas al igual que su función. Si se varían los agentes precipitantes y las condiciones generales de cristalización, puede cristalizar en distintos sistemas cristalinos: tetragonal, ortorrómbico, monoclinico y triclínico.

V.4.2. Taumatina

Es una proteína globular, aislada del fruto de los arbustos africanos *Thaumatococcus daniellii*, la cual produce un intenso sabor dulce cuando ésta interactúa con los receptores apropiados en la lengua. El grado de dulzor es miles de veces mayor al producido por un peso equivalente de sacarosa, lo que la hace buena candidata para sustitutos de azúcar no-calóricos.

La proteína nativa consta de seis proteínas estrechamente relacionadas (I, II, III, a, b y c), todas con una masa molecular de 22 kDa. Las dos proteínas más abundantes en la fruta son la taumatina I y la taumatina II. Consisten en 207 aminoácidos y su secuencia aminoácida es idéntica con excepción de 5 residuos. Como una particularidad carece de residuos de histidina, pero posee 8 puentes disulfuro y un pI de 12.

En esta tesis se trabajó con la taumatina I, los rasgos más sobresalientes de su estructura son:

Un dominio formado por dos láminas β formando un barril β aplanado. De las once cadenas β en este dominio, cada una es antiparalela a sus vecinos con la excepción del grupo NH_2 -terminal y el grupo $COOH$ -terminal, que son paralelos el uno al otro. A diferencia de otras proteínas con barriles β , las cadenas β de una lámina aplanada son casi paralelas a y sobre la cima de aquellas de la otra lámina. Una cadena β larga y una corta al final conectan las dos láminas para así formar el barril β aplanado. A este dominio están conectados dos dominios pequeños ricos en puentes disulfuro.



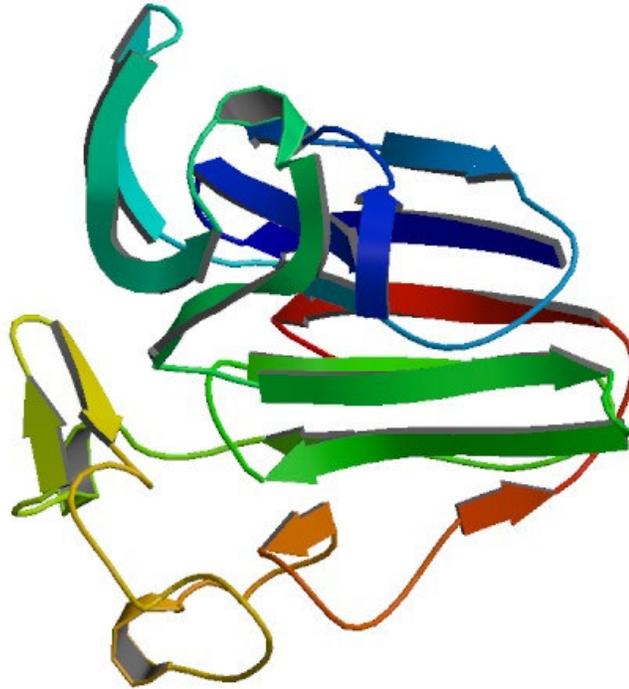


Figura 13. Estructura tridimensional de la proteína Taumatina de *Thaumatococcus daniellii*. Tomada de <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1THI>

Ha sido cristalizada en distintos sistemas cristalinos: ortorrómbico, monoclinico y tetragonal. Los cristales que se obtienen son bipirámides tetragonales.

V.4.3. Concanavalina A

La concanavalina A (Con A) es una proteína globular de origen vegetal, obtenida a partir de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, que pertenece a una clase de compuestos conocidos como lectinas (proteínas de las plantas capaces de aglutinar diferentes tipos de células e inducir transformaciones celulares y mitosis).

A pH alcalino o neutro, existe como un tetrámero de 4 subunidades idénticas de aproximadamente 26, 000 daltones (237 aminoácidos) cada uno. Por debajo de pH 5.6, la Con A se disocia en dímeros de 52,000 daltones. La estructura posee dos largas láminas β antiparalelas, una lámina torcida de siete cadenas que pasan por el centro de la molécula y una lámina inclinada de seis cadenas que forma la superficie trasera del monómero. Tiene pocas secciones helicoidales. En su forma nativa posee un metal





de transición (predominantemente Mn^{2+}) y un ión de Ca^{2+} por unidad monomérica. Posee un pI de 5.

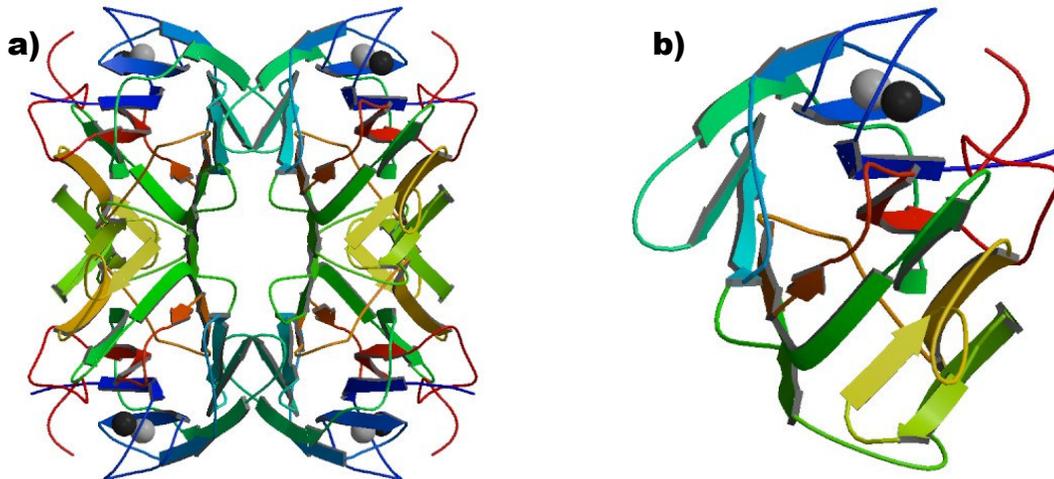


Figura 14. Concanavalina A. a) Molécula biológica. b) Unidad asimétrica. Tomada de <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3CNA>

La Con A aglutina eritrocitos de distintos animales y los gránulos de almidón, precipita el glucógeno, dextrano y diversas proteínas. Induce también transformaciones de los linfocitos por unión a centros específicos de las superficies celulares, aglutina células leucémicas y células de cultivos de tejidos que han sido transformadas por agentes carcinogénicos químicos, rayos X o virus. Se ha observado también que inhibe el crecimiento in vivo de diversos tumores.

Ha sido cristalizada en dos sistemas cristalinos: ortorrómbico y triclinico.





VI. PARTE EXPERIMENTAL





VI. Parte experimental

VI.1. Instrumentación

Tabla 5. Instrumentación.

Equipo	Marca	Modelo	Características
• Galvanostato	VIMAR	FCC-17	Posee siete canales de baja corriente de salida, impone corrientes dentro de un intervalo de 0.1 μ A a 10mA. Este equipo fue especialmente diseñado para los estudios a corriente controlada que se proponen y permite llevar a cabo siete experimentos en paralelo.
• Placa termostática			Se utiliza para llevar a cabo las cristalizaciones sobre esta, la cual se conecta al baño recirculador.
• Baño recirculador de temperatura controlada	Cole Parmer Polystat [®]	12101-10	Se conecta a la placa termostática para mantener la temperatura constante durante las cristalizaciones.
• Microscopio estereoscópico	Karl-Zeiss	Stemi SV11	Este se encuentra adaptado a una cámara digital acoplada a una computadora. Para la adquisición de imágenes se usa el programa Axiovision 3.0 de Zeiss Co.
• Sistema de purificación de agua	Millipore	Milli-Q _{plus}	Pack name QPAK [®] 1, Lot No. F6PN88399.
• pHmetro	Denver Instrument	UB-10, Ultrabasic	
• Centrífuga	Eppendorf	5415D	
• Balanza	Explorer [®] Pro de OHAUS	EP214C	

VI.2. Materiales

- Portaobjetos LAUKA De 26x76mm (1"x 3") Espesor \pm 1-1.2mm
- Lámina de estireno BCO De 76x120 Espesor 30 pts. (0.762mm)
- Silicón QUALTEX
- Resina epóxica RESISTOL^{M.R}
- Filtros NALGENE[®] Membrana de acetato de celulosa Tamaño de poro 0.2 μ m Cat. No. 171
- Platos Terasaki de 72 pozos greiner bio-one
- Platino Alfa Aesar (Johnson Matthey Company) 0.2032mm dia Standard Grade Thermocouple Stock #10287 Lot # E09N42





VI.3. Reactivos

Tabla 6. Reactivos.

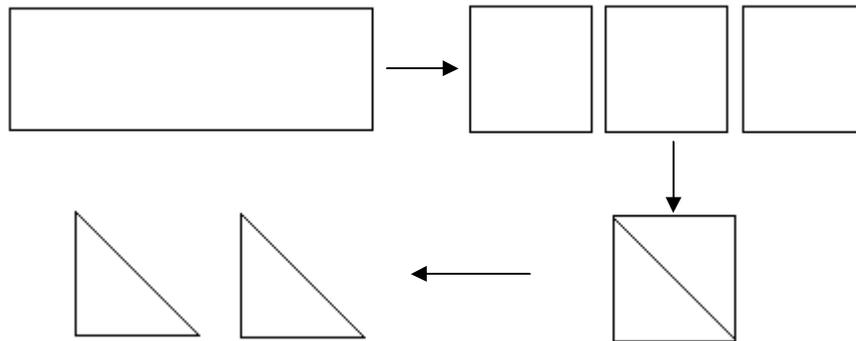
Reactivo	Marca	Características
• Lisozima, de huevo blanco de gallina (cristalizada)	SEIKAGAKU CORPORATION	Clave No. 100940 Seis veces recristalizada Lote No. E99303
• Taumatina (de <i>Thaumatococcus daniellii</i>)	Sigma	Mezcla de taumatina I y taumatina II con trazas de otras proteínas dulces. Lote 077K1067
• Concanavalina A tipo IV (de <i>Canavalia ensiformis</i>)	Sigma	Lote 46H7055
• Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma	
• Tartrato de sodio y potasio, 4- hidrato, cristal ($\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	J.T.Baker	
• Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Sigma- Aldrich [®]	
• Acetato de sodio trihidratado ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Sigma	
• Ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Aldrich [®] Sigma-Aldrich	
• Cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	Merck	
• Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma- Aldrich [®]	
• Tris-HCl	Sigma	
• Hidróxido de sodio (NaOH)	Sigma	
• Fosfato de sodio monobásico, anhidro (NaH_2PO_4)	Sigma	
• Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	Aldrich Chemical Company, Inc.	
• Agua Milli-Q		18.2 MΩcm
• IZIT? CRYSTAL INDICATOR	HAMPTON RESEARCH	
• Aceite mineral de baja densidad	Sigma	
• Agarosa	Sigma- Aldrich [®]	



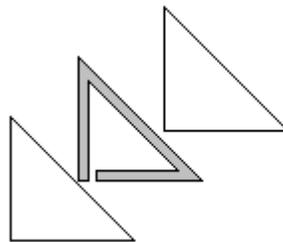


VI.4. Construcción de las celdas de crecimiento

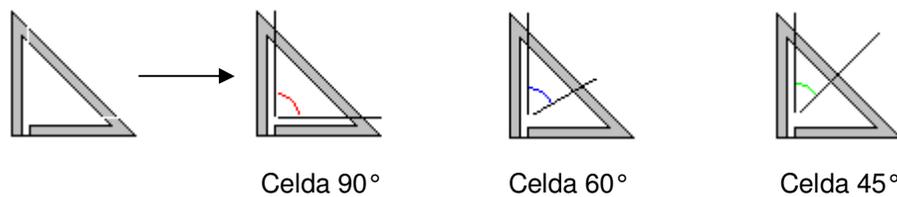
Las celdas fueron construidas utilizando portaobjetos, los cuales fueron cortados en forma de triángulo rectángulo (25x25x35mm),



en medio de dos de estas tapas de vidrio se colocó un sello de estireno de 0.762mm de espesor utilizando resinas epóxicas.



Posteriormente se hicieron dos orificios en el sello de estireno con una aguja caliente en los que fueron colocados los electrodos, a modo de electrodos se utilizaron alambres de platino. En total se construyeron tres tipos de celdas, las cuales se diferencian en el ángulo entre los electrodos (45°, 60°, 90°). **(Ver Anexo I y Anexo II)**





VI.5. Preparación de disoluciones.

VI.5.1. Disoluciones amortiguadoras

Amortiguador de acetatos (0.2 M) a pH 4.5

Para preparar 100 mL se disolvió 2.78 g de acetato de sodio trihidratado en un volumen de agua desionizada menor a 100 mL, una vez disuelto se midió el pH y se ajustó a 4.5 añadiendo ácido acético glacial, obtenido el pH deseado se llevó al aforo de 100 mL con agua desionizada.

Amortiguador de fosfatos (0.1 M) a pH 7.0

Para un volumen de 100 mL se disolvió 0.7342 g de fosfato de sodio monobásico, anhidro y 0.5493 g de fosfato de sodio dibásico en un volumen de agua desionizada menor a 100 mL, una vez disueltos se llevó al aforo de 100 mL usando agua desionizada.

VI.5.2. Disoluciones para experimentos en disolución en celda batch

VI.5.2.1. Lisozima

Disolución de lisozima [60 mg/mL]

Para la preparación de esta disolución se pesaron 30 mg de lisozima y se le añadió 0.5 mL de amortiguador de acetatos 0.2 M a pH 4.5.

Disolución de cloruro de sodio [80 mg/mL]

Se pesaron 40 mg de cloruro de sodio y se le agregó 0.5 mL de amortiguador de acetatos 0.2 M a pH 4.5.

Una vez preparadas, se mezclaron lentamente, añadiendo la disolución de cloruro de sodio a la de lisozima (para evitar la precipitación de esta última), la solución resultante es la disolución batch en condiciones de metaestabilidad, en la que la concentración final de lisozima es de 30 mg/mL y de NaCl 40 mg/mL. ¹³





VI.5.2.2. Taumatina

Disolución de taumatina [70 mg/mL]

Para su preparación se pesaron 35 mg de taumatina y se le añadió 0.5 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.0. La disolución resultante se centrifugó por 20 minutos a 10 000 rev/min, se separó el sobrenadante y se filtró por una membrana de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0.2 μ m.

Disolución de tartrato de sodio y potasio [100 mg/mL]

Para la preparación de esta disolución se pesaron 50 mg de tartrato de sodio y potasio y se le añadió 0.5 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.0. La disolución resultante se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0.2 μ m.

Una vez preparadas ambas disoluciones, se añadió lentamente la disolución de tartrato de sodio y potasio a la de taumatina, la mezcla resultante (disolución batch en condiciones de metaestabilidad), tiene una concentración final de taumatina de 35 mg/mL y de tartrato de sodio y potasio 50 mg/mL.

VI.5.2.3. Concanavalina A

En un eppendorf se colocó 1 mL de amortiguador 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0) y se le agregó MnCl_2 y CaCl_2 , en una cantidad tal que la concentración final de ambos fuera 0.02 M. A esta solución se le añadió 70 mg de Con A. ³⁴

En otro eppendorf se colocó 1 mL de amortiguador 0.01 M Tris-HCl (pH 8.5) y se le agregó sulfato de amonio para dar una concentración final de este 1 M.

Se mezclaron ambas y la disolución resultante se colocó en dos celdas, la celda control y la celda de trabajo, a la que se le aplicó una corriente constante de 2 μ A.





VI.5.3. Disoluciones para experimentos en gel de agarosa en celda batch

VI.5.3.1 Lisozima

Disolución de lisozima [90 mg/mL]

Para su preparación se pesaron 90 mg de lisozima y se le añadió 1 mL de solución amortiguadora de acetatos 0.2 M a pH 4.5.

Disolución de Cloruro de sodio [120 mg/mL]

Se pesaron 120 mg de cloruro de sodio y se le agregó 1 mL de solución amortiguadora de acetatos 0.2 M a pH 4.5.

Disolución de agarosa [0.2%]

Esta disolución se preparó disolviendo, en baño maría, 20 mg de agarosa en 10 mL de la solución amortiguadora de acetatos 0.2 M pH 4.5.

De cada disolución, se tomaron volúmenes iguales y se mezclaron. Dando así la disolución batch en gel, donde la concentración final de lisozima es 30 mg/mL, de cloruro de sodio 40 mg/mL y de agarosa 0.066% p/v.

VI.6. Screening de taumatina

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas de cristalización y en base a estas realizar los experimentos aplicando corriente eléctrica, se realizó un screening. Este consistió en hacer 6 disoluciones de taumatina y 9 disoluciones de tartrato de sodio y potasio en amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7, cada una con una concentración diferente (**ver tabla 7**). El método utilizado fue Microbatch bajo aceite usando platos Terasaki de 72 pozos.



**Tabla 7.** Concentraciones usadas para el screening de taumatina.

Carril	[Tartrato de sodio y potasio] (mg/mL)	Carril	[Taumatina] (mg/mL)
1	30	A	15
2	35	B	20
3	40	C	25
4	45	D	30
5	50	E	35
6	55	F	40
7	60		
8	65		
9	70		

El screening se realizó por duplicado, un plato se colocó a 4 °C mientras que el otro se colocó a 18 °C (temperaturas comúnmente usadas para encontrar condiciones de cristalización). Después de 12 días, se observaron cristales en los pozos: 1F, 2F, 4F, 5E, 7B, 9F, 10B y 10D (**Figura 15**), del plato colocado a 18 °C.

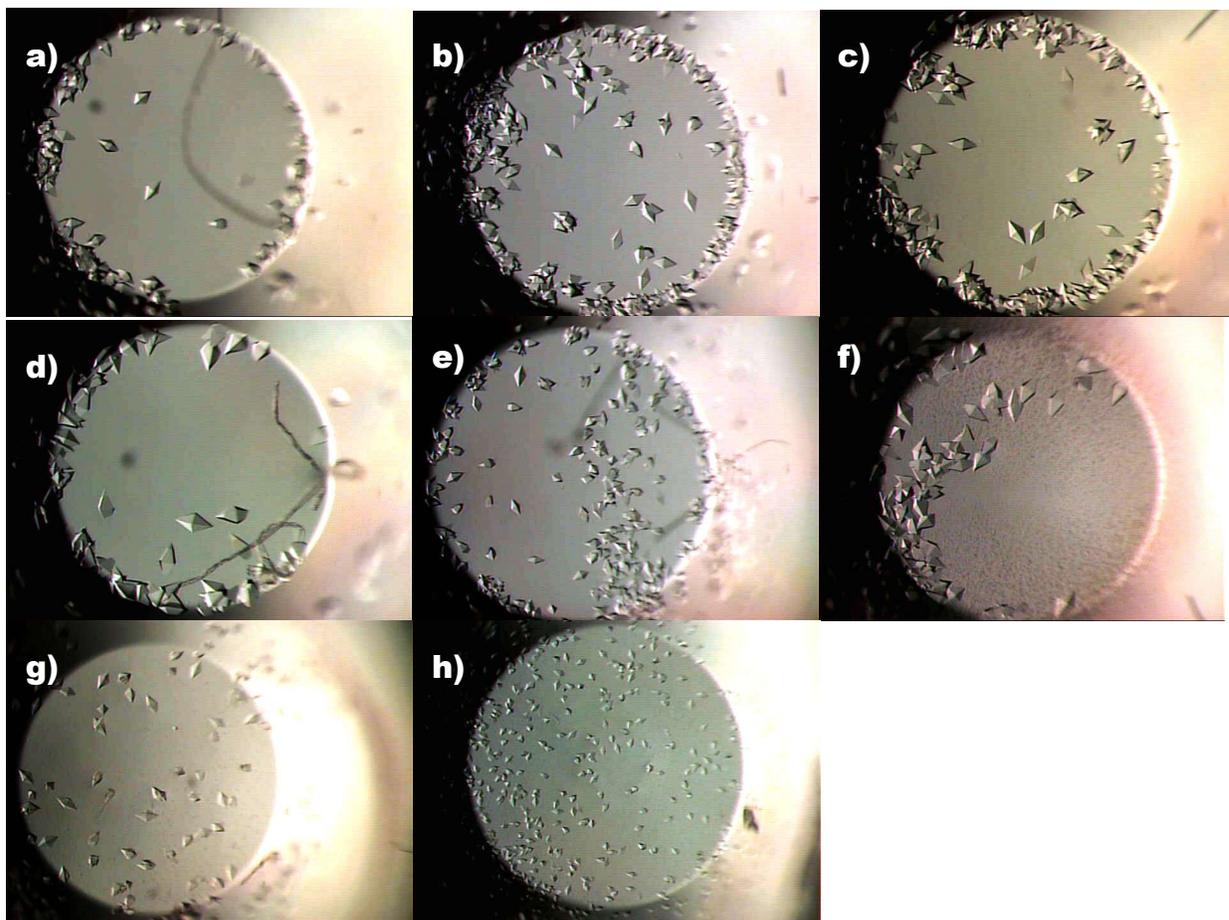


Figura 15. a) 1F. b) 2F. c) 4F. d) 5E. e) 7B. f) 9F. g) 10B. h) 10D. (Todas las fotografías se tomaron a la misma magnificación)





En base a lo observado y al comparar los cristales obtenidos a diferentes concentraciones tanto de agente precipitante como de proteína, se seleccionó la condición 5E, ya que en esta se tiene cristales de buen tamaño y la nucleación no es excesiva.

VI.7. Procedimiento experimental

Para la realización de los experimentos, las celdas construidas se llenaron con la disolución de trabajo (disolución Batch) por un orificio hecho en el sello de estireno. Estas se sellaron con silicón para evitar fugas y colocaron en una placa *ad hoc* termostática (**Figura 16**) la cual se encuentra conectada a un recirculador de agua con control de temperatura a una temperatura constante de 17°C para la lisozima, 18°C para la taumatina y 22°C para la concanavalina A.

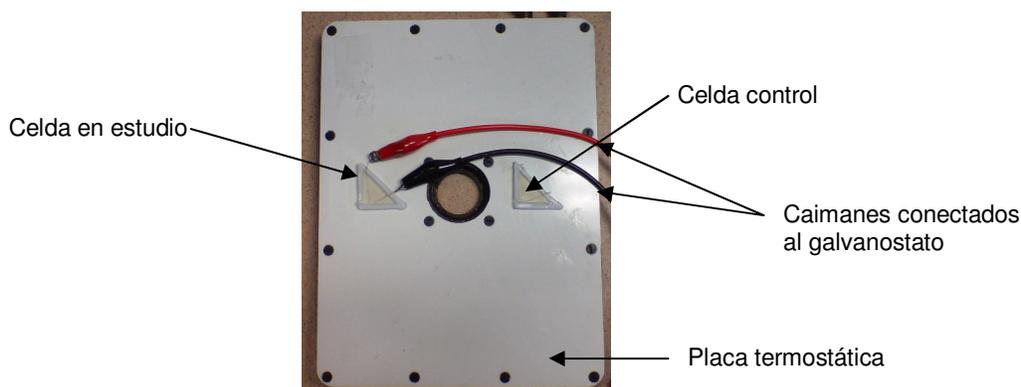


Figura 16. Celdas de trabajo sobre la placa termostática.

Para cada uno de los experimentos realizados una de las celdas fue conectada al galvanostato, a una corriente eléctrica constante de $2\mu\text{A}$ para experimentos en disolución y para experimentos en gel a una corriente eléctrica constante de $1\mu\text{A}$. Además para cada experimento se hizo un control, donde se tenía la misma disposición de los electrodos en la celda y la misma disolución de trabajo, pero sin corriente eléctrica.



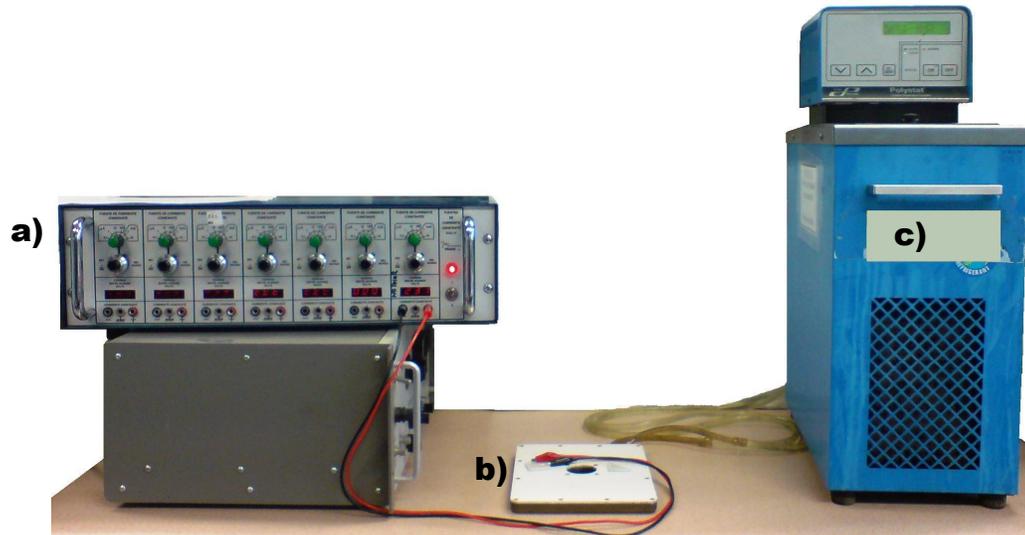


Figura 17. Fotografía del equipo de trabajo. a) Galvanostato VIMAR. b) Placa termostática con celdas de trabajo. c) Recirculador con control de temperatura.

Los cristales obtenidos se monitorearon tomando fotografías mediante un estereomicroscopio adaptado a una cámara digital acoplada a una computadora.

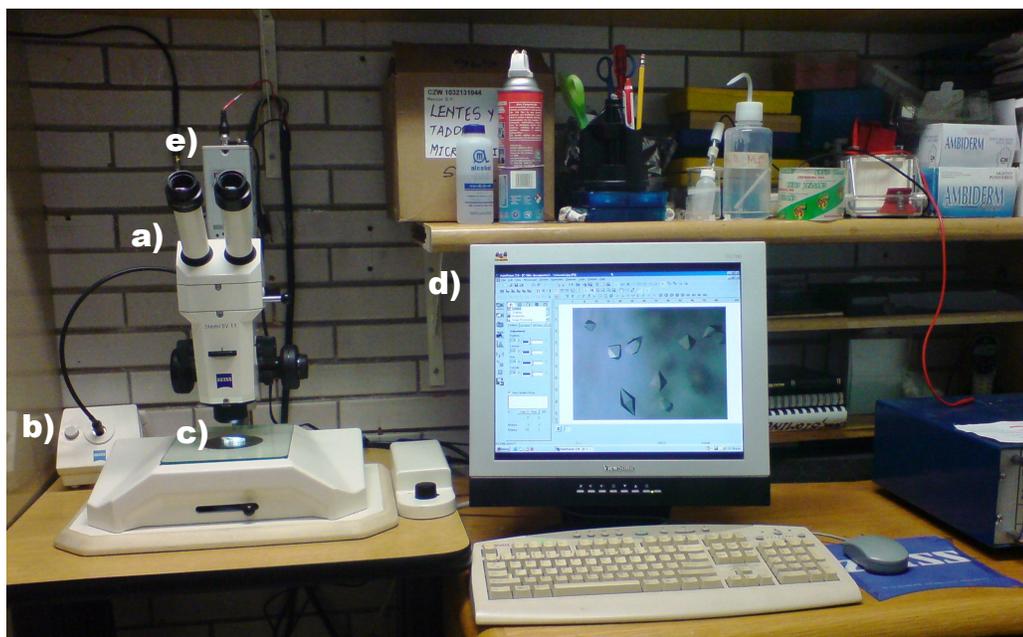


Figura 18. Fotografía del equipo para adquisición de imágenes. a) Estereomicroscopio. b) Fuente de iluminación externa de luz fría halógena. c) Celda en estudio. d) Computadora. e) Cámara digital.





VII. RESULTADOS





VII. Resultados

De los estudios realizados para los diferentes tipos de celdas, se comparó el tamaño, número de cristales formados, preferencia por la cristalización en ciertas zonas y el tiempo requerido para obtenerlos.

VII.1. Experimentos en disolución

VII.1.1. Lisozima

Para las celdas control se observó una mayor formación de cristales, pero como la nucleación no está controlada, existen muchos cristales unidos unos a otros formando masas policristalinas, además de que en estas la obtención de cristales fue más lenta.

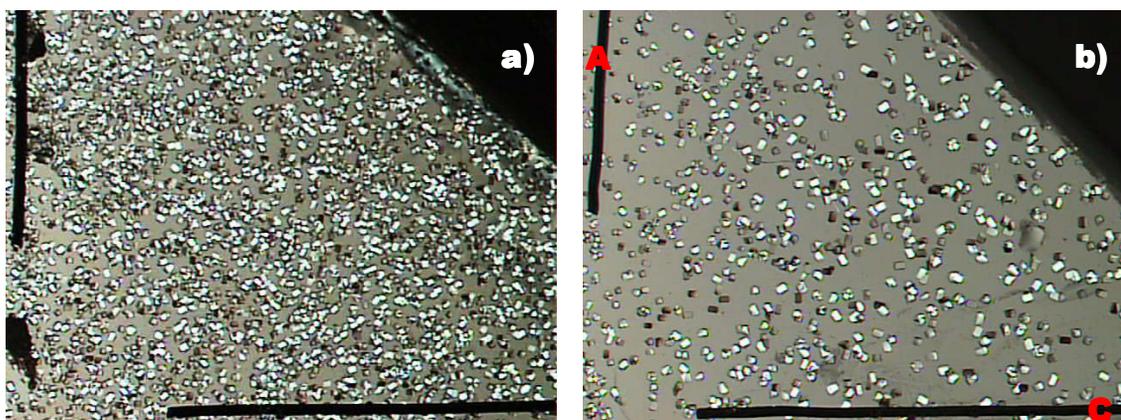


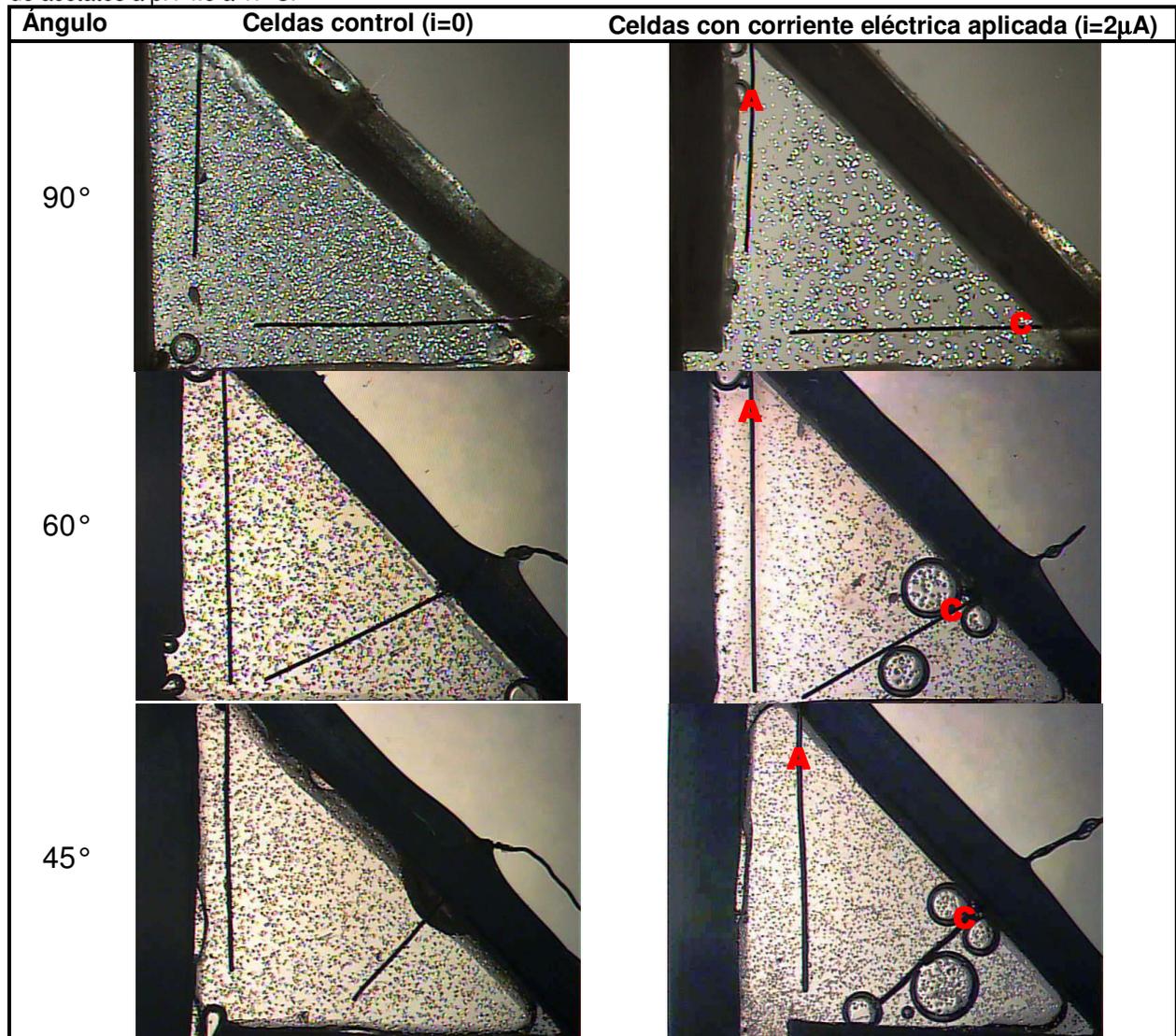
Figura 19. Cristalización en disolución después de 12 horas. a) $i = 0$, b) $i = 2\mu\text{A}$. Celdas con ángulo de 90° entre los electrodos. [Lisozima]= 30mg/mL, [NaCl]= 40mg/mL en amortiguador de acetatos a pH 4.5 a 17°C .

En las celdas con corriente eléctrica aplicada se notó que en todas las celdas (independientemente del ángulo y del largo del cátodo y el ánodo) la cristalización sigue un patrón de crecimiento en el cual la formación de cristales se va incrementando en las cercanías del cátodo (**Tabla 8**).





Tabla 8. Cristalización en disolución después de 12 horas. [Lisozima]= 30mg/mL, [NaCl]= 40mg/mL en amortiguador de acetatos a pH 4.5 a 17°C.



Debido a que la celda no es simétrica, el tamaño de los electrodos cambia al modificar el ángulo, por lo que existe un electrodo de mayor longitud (a excepción de las celdas con ángulo de 90° entre los electrodos). Inicialmente se realizaron experimentos en los cuales el ánodo era el electrodo más largo mientras que el cátodo era el más corto. Para todos los tipos de celda, se observó una preferencia por la cristalización cerca del cátodo, donde los cristales son de mayor tamaño que los obtenidos en el control y cerca del ánodo, además de que presentan menos defectos. Otra apreciación fue que al imponer una corriente eléctrica dentro de la celda, el tiempo de cristalización es





ligeramente menor, ya que la nucleación empezó más rápidamente en la celda con corriente eléctrica, por lo que cabe mencionar que la diferencia en tiempo de nucleación entre la celda control y la celda con corriente eléctrica es de aproximadamente 1 hora. Con respecto a los cristales, cerca del ánodo es donde hay menor formación y estos son de menor tamaño que los obtenidos en el control y en la zona del cátodo.

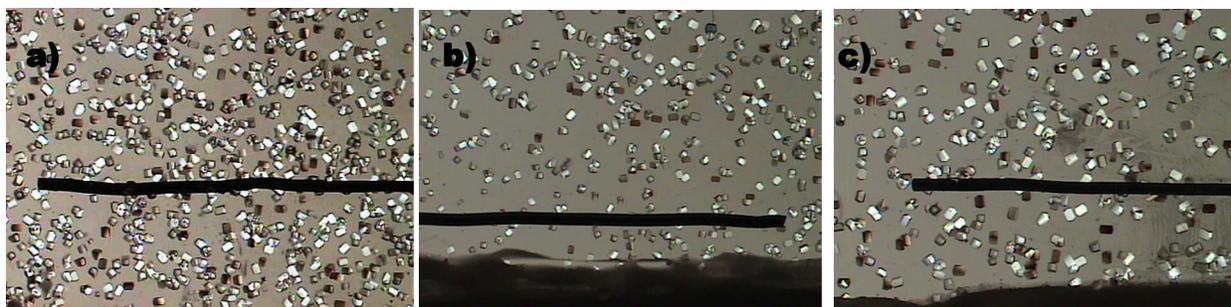


Figura 20. Cristalización en disolución después de 12 horas. a) Electrodo sin corriente eléctrica aplicada. b) Ánodo. c) Cátodo. [Lisozima]= 30mg/mL, [NaCl]= 40mg/mL en amortiguador de acetatos a pH 4.5 a 17°C.

También se observó que el cátodo tiende a recubrirse con cristales y que la manera en que este recubrimiento es más eficiente es cuando se tiene un ángulo de 60° o de 45°.

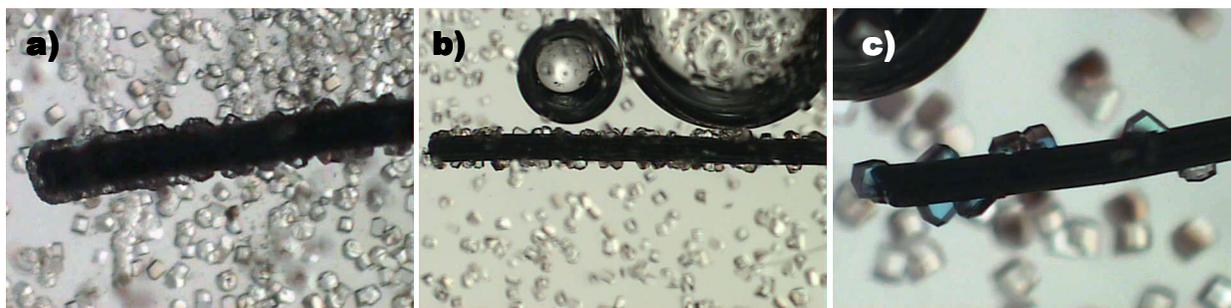


Figura 21. Cátodo recubierto con cristales de lisozima. a) Usando una celda con ángulo de 45°. b) Usando una celda con ángulo de 60°. c) Usando una celda con ángulo de 90°. [Lisozima]= 30mg/mL, [NaCl]= 40mg/mL en amortiguador de acetatos a pH 4.5 a 17°C.

Al cambiar la polaridad de los electrodos siendo ahora el cátodo el electrodo más largo, la cristalización no está favorecida, es más lenta y comienza por las orillas de la celda del lado del cátodo y de ahí se propaga hacia el resto de la celda. En la zona del ánodo la formación de cristales es prácticamente nula.



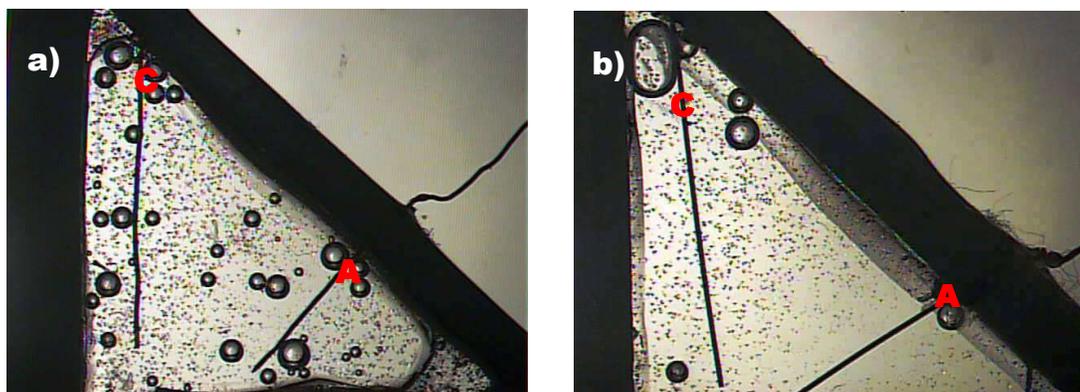


Figura 22. Cristalización en disolución después de 12 horas. a) Celda de crecimiento con ángulo de 45° entre los electrodos. b) Celda de crecimiento con ángulo de 60° entre los electrodos. $i = 2\mu\text{A}$, $[\text{Lisozima}] = 30\text{mg/mL}$, $[\text{NaCl}] = 40\text{mg/mL}$ en amortiguador de acetatos a pH 4.5 a 17°C .

Otro comportamiento en esta disposición es que se produce una mayor formación de burbujas en las celdas con corriente eléctrica aplicada a las observadas anteriormente cuando el cátodo es el electrodo más pequeño.

La siguiente tabla muestra un resumen de lo observado.

Tabla 9. Comparación de resultados sin corriente eléctrica aplicada y con corriente eléctrica aplicada para la cristalización de lisozima en disolución. (Ver anexo III)

	Cristalización		
	Con corriente eléctrica aplicada de $2\mu\text{A}$		Sin corriente eléctrica aplicada
Nucleación	Parcialmente controlada		Masiva
Tamaño de los cristales	Ángulo	Ánodo	150-200 μm
	90°	120-150 μm	
	60°	70-100 μm	
	45°	100-150 μm	
Tiempo de cristalización	12 horas		12 horas
Inicio de la nucleación	1-2 horas de iniciado el experimento		2-3 horas de iniciado el experimento

VII.1.2. Taumatina

Los resultados obtenidos con la taumatina muestran que al igual que la lisozima ésta tiende a migrar hacia el cátodo, donde se encuentra la mayor cantidad de cristales. Con respecto a la nucleación, ésta se dio a las 12 horas de haber empezado el experimento en la celda con corriente eléctrica aplicada, mientras que la celda control mostró cristales hasta las 24 horas de haberse empezado el experimento. El aplicar una corriente eléctrica constante de nuevo ayudo a tener un mejor control en la nucleación, obteniéndose menos cristales pero de mayor tamaño y de mejor calidad, ya que





prácticamente no hay cristales unidos unos a otros. Los ángulos con los que se consiguió los cristales de mayor tamaño fue el de 90° y el de 60° , obteniéndose cristales de hasta $200\mu\text{m}$. En todas las celdas con corriente eléctrica aplicada, la mayor formación de burbujas se da sobre el cátodo después de 7 días de iniciado el experimento.

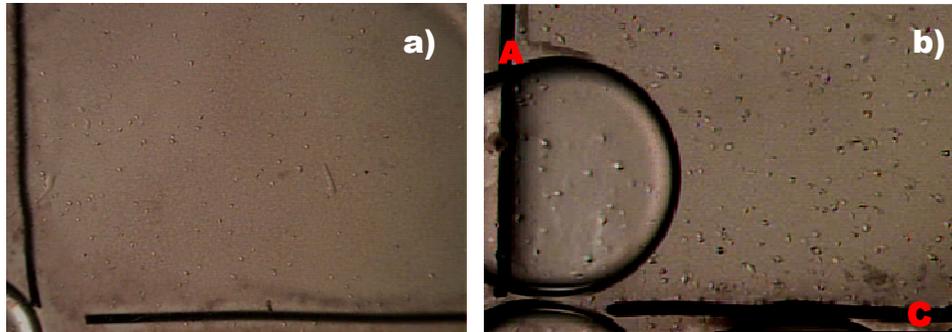


Figura 23. Cristalización en disolución después de 7 días. a) $i=0$. b) $i=2\mu\text{A}$. Celdas de crecimiento con ángulo de 90° entre los electrodos. $[\text{Taumatina}] = 35\text{mg/mL}$, $[\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}] = 50\text{mg/mL}$ en amortiguador de fosfatos a pH 7 a 18°C .

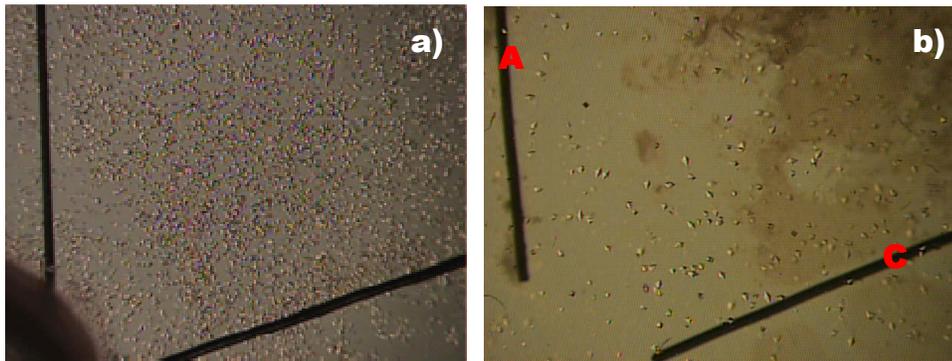


Figura 24. Cristalización en disolución después de 7 días. a) $i=0$. b) $i=2\mu\text{A}$. Celdas de crecimiento con ángulo de 60° entre los electrodos. $[\text{Taumatina}] = 35\text{mg/mL}$, $[\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}] = 50\text{mg/mL}$ en amortiguador de fosfatos a pH 7 a 18°C .

También se comprobó que para obtener cristales en menor tiempo es necesario que el electrodo de menor tamaño sea el cátodo, ya que cuando éste es el electrodo de mayor longitud la cristalización fue prácticamente nula.

Una de las diferencias observadas con respecto a lo obtenido con la lisozima es que cuando se aplica corriente eléctrica ninguno de los electrodos se recubre con cristales, pero si se observa la formación de una película dorada que envuelve en su totalidad al ánodo.



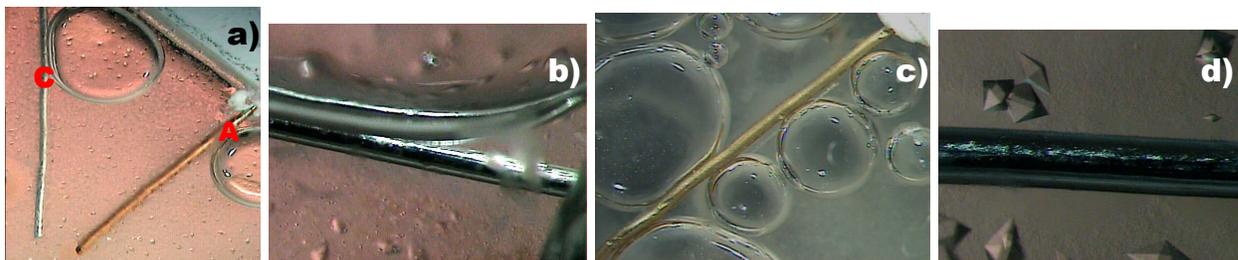


Figura 25. Fotografías tomadas con iluminación externa de luz fría halógena. a) Celda de crecimiento con ángulo de 45° entre los electrodos después de 7 días ($i=2\mu\text{A}$). b) Acercamiento del cátodo después de 10 días ($i=2\mu\text{A}$). c) Acercamiento del ánodo después de 10 días ($i=2\mu\text{A}$). d) Acercamiento del electrodo de la celda control después de 10 días ($i=0$). [Taumatina]= 35mg/mL , [$\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$]= 50mg/mL en amortiguador de fosfatos a pH 7 a 18°C .

Para conocer la naturaleza de esta capa formada sobre el electrodo, se montaron dos experimentos mas, uno en el que se colocó dentro de la celda disolución de agente precipitante en el amortiguador de fosfatos y otro en el que la celda contenía solamente disolución de proteína en el mismo amortiguador. Se realizó nuevamente el procedimiento descrito en procedimiento experimental con cada celda. Después de 7 días se analizó cada una, observándose que en la celda que sólo contenía disolución de agente precipitante no presentaba formación de película en ninguno de los electrodos. En cambio, la celda que contenía la disolución de proteína presentó la misma película dorada sobre el ánodo observada en los experimentos en disolución batch.

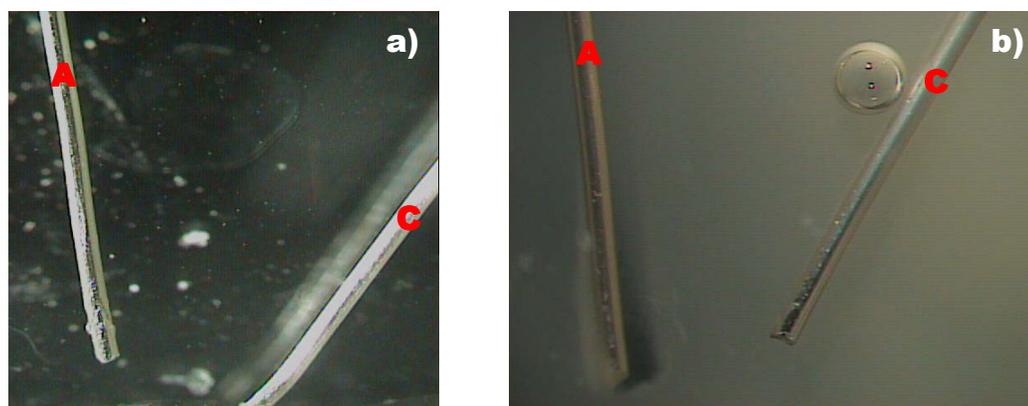


Figura 26. Fotografías tomadas con iluminación externa de luz fría halógena después de 7 días. a) Celda de crecimiento con disolución de agente precipitante. b) Celda de crecimiento con disolución de proteína. $i=2\mu\text{A}$, [Taumatina]= 35mg/mL , [$\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$]= 50mg/mL en amortiguador de fosfatos a pH 7 a 18°C .

De acuerdo a lo observado, el depósito formado en lo experimentos en celda batch es de naturaleza proteínica, por lo que para confirmar esta afirmación, se procedió a desmontar dos de los electrodos recubiertos con esta película dorada obtenidos





previamente de los experimentos realizados en celda batch. Estos electrodos se lavaron con agua Milli-Q y se colocaron sobre una base de plástico junto con un alambre de platino totalmente limpio, donde sobre cada uno se colocó una gota de indicador IZIT?® y se dejó reposar por 1 hora. Concluida la hora se analizó cada uno, el alambre de platino limpio permaneció intacto, mientras que el electrodo con el recubrimiento dorado se tiñó de color azul, demostrando así que éste es en efecto de naturaleza proteínica. No se realizaron más análisis por no estar contemplado dentro de los objetivos de esta tesis.

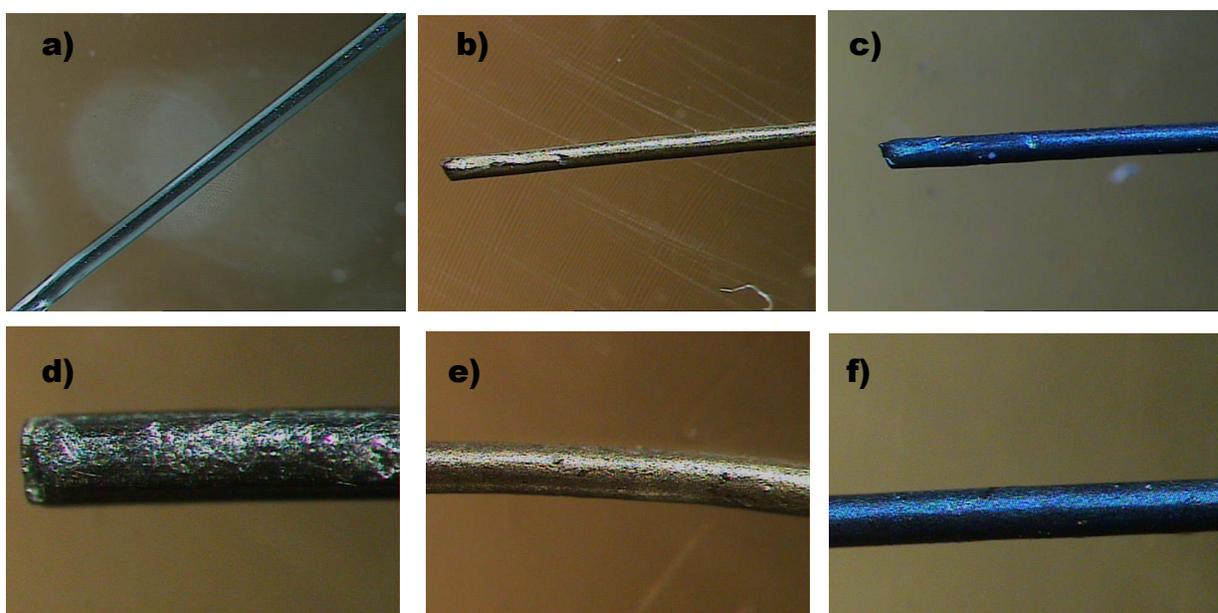


Figura 27. Fotografías tomadas con iluminación externa de luz fría halógena. a) Alambre de platino limpio. b) Electrodo recubierto con la película dorada sin teñir. c) Electrodo con la película dorada teñido. d) Acercamiento del alambre de platino limpio. e) Acercamiento del electrodo recubierto con la película dorada sin teñir. f) Acercamiento del electrodo con la película dorada teñido.

A continuación se muestra un resumen de los resultados obtenidos

Tabla 10. Comparación de resultados sin corriente eléctrica aplicada y con corriente eléctrica aplicada para la cristalización de taumatina en disolución. (Ver anexo III)

	Cristalización		
	Con corriente eléctrica aplicada de 2 μ A		Sin corriente eléctrica aplicada
Nucleación	Parcialmente controlada		Masiva
Tamaño de los cristales	Ángulo	Ánodo	100 μ m
	90°	100 μ m	
	60°	100 μ m	
	45°	100 μ m	
Tiempo de cristalización	7 días		7 días
Inicio de la nucleación	A las 12 horas de iniciado el experimento		A las 24 horas de iniciado el experimento





VII.1.3. Concanavalina A

Por último se intentó cristalizar la metaloproteína concanavalina A, la que a comparación de las dos proteínas estudiadas anteriormente es más compleja y contiene en su estructura dos iones metálicos: calcio y manganeso.

Según lo reportado en algunos artículos²⁷ la proteína tardaría en cristalizar al menos 3 semanas, pero el experimento se suspendió a los 7 días debido a la formación de un recubrimiento de color morado sobre el electrodo positivo (Ánodo).

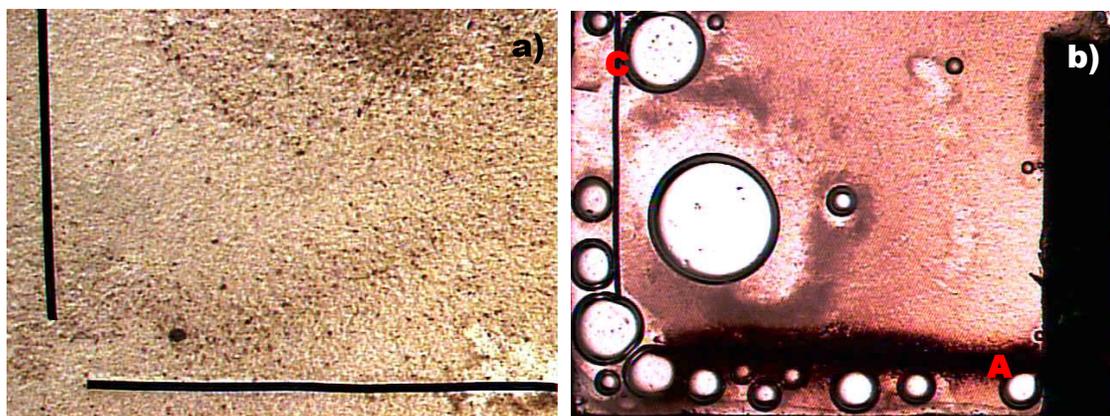


Figura 28. Cristalización de concanavalina A en disolución después de 7 días. a) $i=0$. b) $i=2\mu\text{A}$. Celdas de crecimiento con ángulo de 90° entre los electrodos. [Con A]= 70mg/mL, $[\text{MnCl}_2]= 0.02\text{M}$, $[\text{CaCl}_2]=0.02\text{M}$, $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]= 1\text{M}$ en amortiguador 0.02M Tris-HCl.

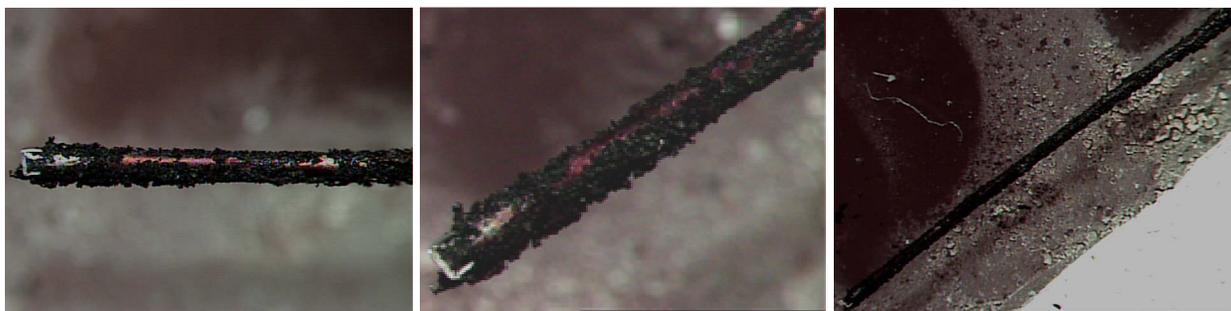


Figura 29. Recubrimiento inorgánico formado sobre el ánodo después de la imposición de corriente eléctrica de $2\mu\text{A}$ por 7 días. [Con A]= 70mg/mL, $[\text{MnCl}_2]= 0.02\text{M}$, $[\text{CaCl}_2]=0.02\text{M}$, $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]= 1\text{M}$ en amortiguador 0.02M Tris-HCl.

Este comportamiento observado sobre el ánodo, donde las reacciones viables son de oxidación, se atribuyó a que de los reactivos utilizados, el Mn^{2+} es fácilmente oxidable, por lo que era factible que se hubiera oxidado a Mn^{3+} , Mn^{4+} o Mn^{7+} . Para comprobar





esta teoría, el electrodo en cuestión se retiró de la celda y se mandó a analizar mediante resonancia paramagnética electrónica (RPE), técnica con la que es posible caracterizar los iones metálicos de transición y su estado de oxidación. Para el manganeso los estados que muestran señales en RPE son el 2+, 3+ y 4+. El estado 2+ es el estado de oxidación que aparece normalmente en materiales biológicos, como es el caso de la concaivalina A (**Figura 30**).

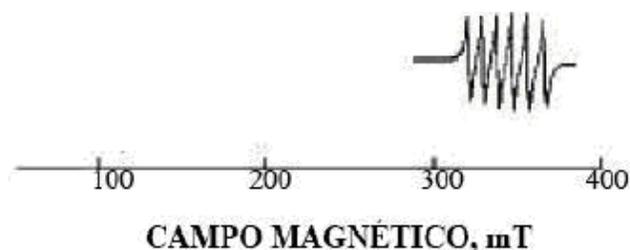


Figura 30. Señal de Mn^{2+} en concaivalina A. Espectro de RPE tomado del libro Cuarta Escuela de Resonancia Paramagnética Electrónica.³⁰

En el espectro obtenido experimentalmente del electrodo mandado a analizar por RPE no se observó ninguna señal (**Ver Figura 31**), indicando por el color morado que presenta que el manganeso probablemente se encuentra en el estado de oxidación 7+.

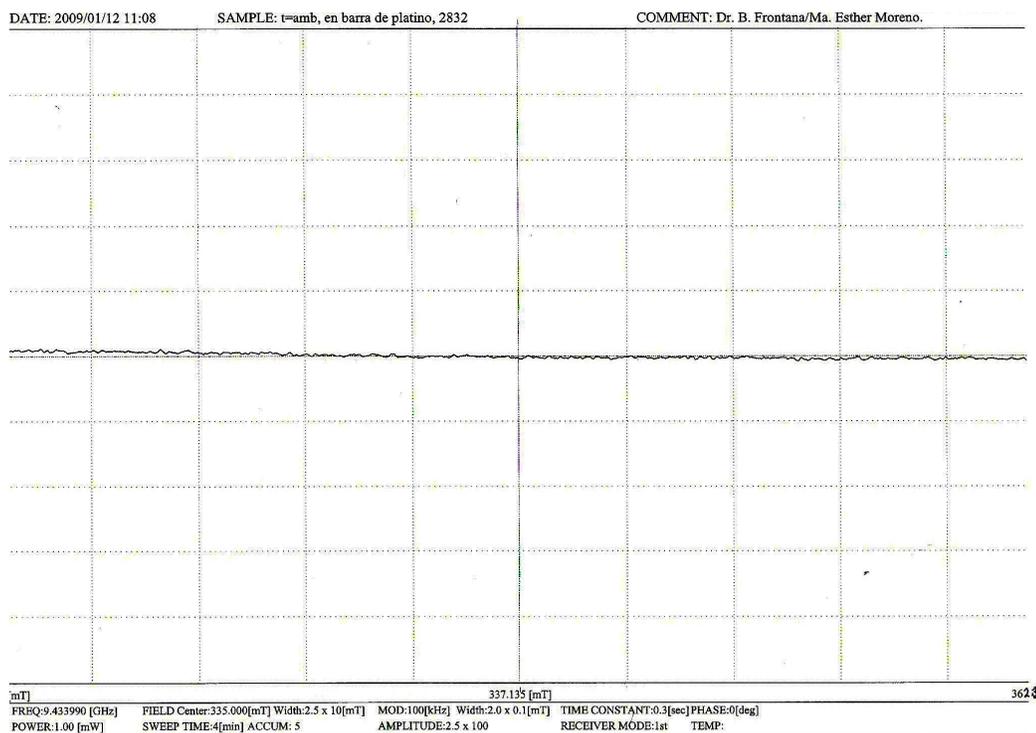


Figura 31. Espectro de RPE obtenido experimentalmente de la muestra en el electrodo de platino.





Con respecto a la celda control esta se guardó por dos meses, con el fin de comprobar si se obtenían cristales. Transcurrido este tiempo se analizó la celda nuevamente en busca de cristales y se observó que si se había logrado la obtención de estos (**Figura 32**).

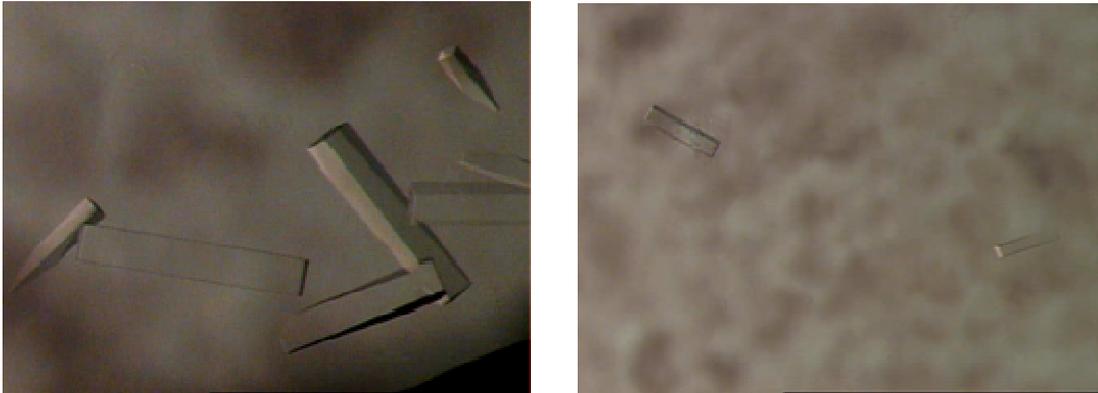


Figura 32. Cristales de Con A obtenidos después de dos meses. [Con A]= 70mg/mL, [MnCl₂]= 0.02M, [CaCl₂]=0.02M, [(NH₄)₂SO₄]= 1M en amortiguador 0.02M Tris-HCl.

Para comprobar que se trataba de cristales de Con A se utilizó el indicador de cristales de proteínas IZIT?®, del cual su función es diferenciar los cristales de proteínas de cristales de sales. Éste actúa penetrando los canales de solvente de los cristales macromoleculares, tiñéndolos de azul, mientras que los cristales que no son de proteína permanecen sin teñir ya que no pueden absorber el colorante. Observándose que los cristales se tiñeron de color azul (**Figura 33**), demostrando así que en efecto estos cristales eran de Con A.



Figura 33. Cristales de Con A teñidos con indicador de cristales de proteínas IZIT?





VII.2. Experimentos en gel de agarosa

VII.2.1. Lisozima

Con respecto a los experimentos realizados en gel, se presentó el mismo comportamiento en el cual la cristalización se favorece cerca del cátodo, mientras que en el ánodo la obtención de cristales es casi nula y los pocos cristales observados son de menor tamaño en comparación con los encontrados en el cátodo y en la celda control.

Tabla 11. Cristalización en gel después de 24 horas. [Lisozima]= 30mg/mL, [NaCl]= 40mg/mL, [Agarosa]= 0.066% p/v en amortiguador de acetatos a pH 4.5 a 17°C.

Ángulo	Celdas control (i=0)	Celdas con corriente eléctrica aplicada (1μA)
90°		
60°		
45°		



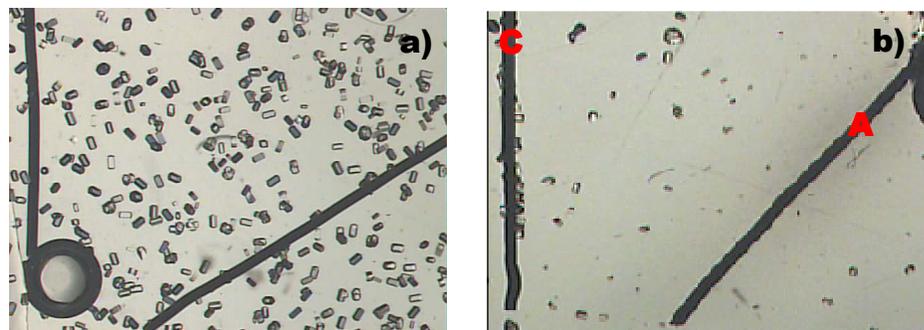


Figura 34. Cristalización en gel después de 24 horas. a) $i=0$. b) $i=1\mu A$. Celdas de crecimiento con ángulo de 60° entre los electrodos. [Lisozima]= 30mg/mL, [NaCl]= 40mg/mL, [Agarosa]= 0.066% p/v en amortiguador de acetatos a pH 4.5 a $17^\circ C$.

Los cristales obtenidos en gel son considerablemente más grandes que los crecidos en disolución, llegando a medir hasta $650\mu m$, mientras que en disolución el tamaño máximo fue de $250\mu m$. Aunque el tiempo necesario para obtenerlos, es mayor (24 horas contra 12 horas en disolución.)

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 12. Comparación de resultados sin corriente eléctrica aplicada y con corriente eléctrica aplicada para la cristalización de lisozima en gel. (Ver anexo III)

Nucleación	Cristalización			Sin corriente eléctrica aplicada Controlada
	Con corriente eléctrica aplicada de $1\mu A$			
Tamaño de los cristales	Ángulo	Ánodo	Cátodo	100- 400 μm
	90°	300 μm	500- 650 μm	
	60°	200-250 μm	300-400 μm	
	45°	200-250 μm	300-400 μm	
Tiempo de cristalización	24 horas			24 horas

Por último se muestra una tabla donde se comparan los resultados obtenidos tanto en disolución como en gel para la cristalización de lisozima con corriente eléctrica y sin corriente eléctrica.

Tabla 13. Comparación de resultados sin corriente eléctrica aplicada y con corriente eléctrica aplicada para la cristalización de lisozima en gel y en disolución. (Ver anexo III)

	Cristalización							
	Gel		Disolución					
Nucleación	Con corriente eléctrica aplicada de $1\mu A$		Sin corriente eléctrica aplicada	Con corriente eléctrica aplicada de $2\mu A$	Sin corriente eléctrica aplicada			
	Controlada		Controlada	Parcialmente controlada		Masiva		
Tamaño de los cristales	Ángulo	Ánodo	Cátodo	100- 400 μm	Ángulo	Ánodo	Cátodo	150- 200 μm
	90°	300 μm	500- 650 μm		90°	120- 150 μm	200- 250 μm	
	60°	200-250 μm	300-400 μm		60°	70- 100 μm	150-200 μm	
	45°	200-250 μm	300-400 μm	45°	100- 150 μm	100- 250 μm		
Tiempo de cristalización	24 horas		24 horas	12 horas		12 horas		





VIII. DISCUSIÓN





VIII. Discusión

Los fenómenos presentados al aplicar corriente eléctrica a las celdas, donde se observó la preferencia por la cristalización cerca del cátodo, adsorción cristalina sobre los electrodos, reducción en el tiempo de cristalización y la obtención de cristales de mejor calidad. Se pueden explicar con base en el fenómeno de electro-migración generado debido a la imposición de la corriente eléctrica directa dentro de la celda electroquímica. Como se mencionó previamente, las proteínas pueden comportarse como macro iones debido a que presentan una carga neta al pH de cristalización. Al imponer una corriente eléctrica se logra acelerar el movimiento de las proteínas hacia los centros de nucleación, acelerando el proceso de cristalización (debido a un incremento en la cinética de crecimiento cristalino) y favoreciendo la cristalización hacia uno de los electrodos así como el crecimiento cristalino sobre uno de los electrodos.

Tomando el caso de la lisozima, una proteína con pI de 11, al pH de trabajo tiene una carga neta positiva, lo que hace que se comporte como si fuera un catión y que migre hacia el cátodo (el cual es el electrodo negativo), donde se logró obtener los cristales de mayor tamaño tanto cuando se comparan con los del control como cuando se comparan con los del ánodo. Otra observación importante fue que este electrodo tiende a recubrirse con cristales y que este recubrimiento es más eficiente cuando los electrodos forman un ángulo (ya sea 45° ó 60°), lo que hace posible la elaboración de electrodos modificados, en este caso un electrodo de platino recubierto con cristales de lisozima. Este comportamiento es debido probablemente a la afinidad química del platino y los puentes disulfuro de la molécula de lisozima.³¹

El ángulo entre los electrodos y la diferencia en tamaño de éstos, logra maximizar el efecto del campo eléctrico interno generado, que no es uniforme en toda la celda y es por eso que se observan zonas donde se favorece más la cristalización. Donde los electrodos están más cerca la fuerza del campo eléctrico es mayor y no favorece la cristalización, posiblemente debido a un incremento en la velocidad de migración iónica. Este aumento genera un desorden molecular, provocando que la velocidad con que las moléculas de proteína van hacia las caras del cristal sea mayor a la velocidad con que





éstas se incorporan en la posición y orientación correcta en la superficie del cristal, provocando así movimientos en el disolvente.^{19,38,42,43,44} Los que inducen desorientaciones en la nucleación (dislocaciones) y favorecen la sedimentación^{39,40}, impidiendo la formación de cristales de alta calidad. Mientras que al alejarnos de esa zona hacia donde los electrodos se encuentran más separados (hacia las bases) la fuerza del campo eléctrico va disminuyendo y favorece la cristalización. Este comportamiento es análogo al observado en la celda Hull empleada en estudios de galvanoplastia.^{35, 36, 37}

Debido a esta diferencia en tamaño de los electrodos, se hicieron experimentos en donde se invirtió la polaridad de estos, observándose que la cristalización solo se favorece cuando el electrodo de mayor longitud es el ánodo o cuando ambos electrodos son del mismo tamaño (celda 90°). Esto es debido a que el electrodo de menor tamaño está sometido a una mayor densidad de corriente, ya que ésta depende tanto del área del electrodo como de la corriente eléctrica aplicada. Por lo que cuando el cátodo es el electrodo de menor longitud, el aumento en densidad de corriente favorece una mayor concentración de cargas positivas sobre este electrodo y es por eso que se tiene mayor cantidad de cristales de lisozima en esa zona ya que en las condiciones de trabajo está cargada positivamente.

Esto se comprobó al usar la proteína taumatina, una proteína con pI de 12 y que en las condiciones de trabajo al igual que la lisozima posee carga neta positiva. Observándose nuevamente que la migración está favorecida hacia el electrodo de polaridad contraria más pequeño. Además la aceleración de la nucleación fue más notoria, lográndose obtener cristales en la celda con corriente eléctrica a tan solo 12 horas de haber empezado el experimento. Asimismo la nucleación está más controlada; se obtienen menos cristales pero de mejor calidad.

Un comportamiento diferente entre estas dos proteínas fue el haber observado un recubrimiento sobre el electrodo de misma polaridad. Este recubrimiento resultó ser de naturaleza proteínica, ya que de haber sido inorgánica no se hubiera teñido. Lo que llama la atención es que haya sido en el electrodo con la misma carga que posee la





proteína. Si bien existen algunos artículos donde se describe que la proteína puede migrar hacia el electrodo de misma polaridad ^{9,32}, gracias a que la movilidad del contraión favorece el proceso de cristalización (ej. Cl⁻ para el caso de la lisozima). Este no fue un comportamiento esperado en nuestros experimentos, además que también se observó cuando la disolución de proteína sin agente precipitante se expuso a corriente eléctrica interna, por lo que no se le puede atribuir al agente precipitante. Otra alternativa es que se tratara de impurezas, otras proteínas o material biológico presentes, ya que no se realizó una purificación previa de la proteína adquirida comercialmente y los fabricantes especifican que puede contener trazas de otras proteínas dulces. Lo que sí se puede afirmar es que el recubrimiento es de naturaleza proteínica.

Con base en lo observado con ambas proteínas, la disposición de 90° es la más indicada si lo que se desea es obtener cristales en un tiempo menor y controlar la nucleación. Pero si lo que se desea es obtener electrodos modificados el uso de un ángulo de 45° ó 60° es lo más indicado.

Con respecto a la calidad cristalina, los mejores cristales se obtuvieron en gel. Esto fue debido a que el gel minimizó el efecto de convección por gravedad; favoreciéndose el transporte de masa difusivo y consiguiéndose un movimiento ordenado de las moléculas hacia los centros de nucleación. Conforme a lo observado, este efecto de convección también se logró minimizar al imponer una corriente eléctrica, generándose un campo eléctrico interno, ya que la cantidad de cristales obtenida fue menor pero eran de mayor tamaño, además de que se obtuvieron en menor tiempo, lo que indica que esta electromigración fue controlada, equivalente a un flujo laminar y que hace posible la obtención de cristales en menor tiempo, sin afectar la calidad del cristal.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los valores de corriente eléctrica usados (1μA y 2μA) son los adecuados para mantener el sistema en una zona donde sólo se tiene corriente capacitiva (**Figura 35**), la cual está asociada con la migración de iones. Así se logran controlar las reacciones electroquímicas que pudieran ocurrir (reacciones de





oxidación o reducción asociadas a corrientes faradaicas), ya que existen reacciones que se pueden generar debido a que no hay un control de potencial.

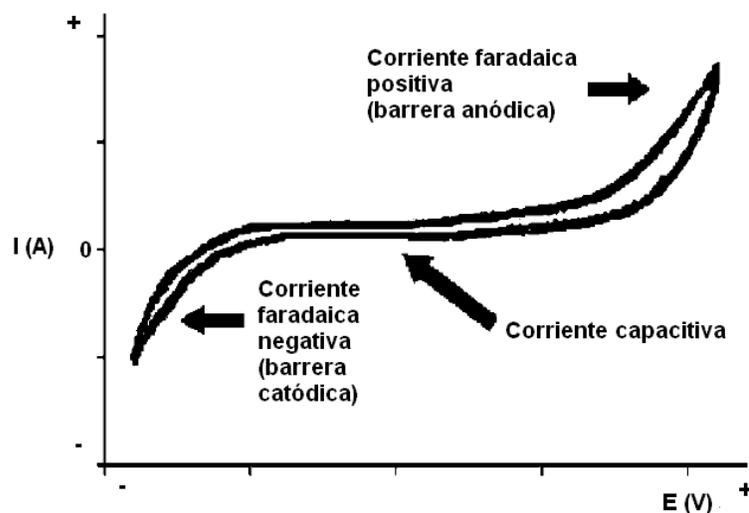
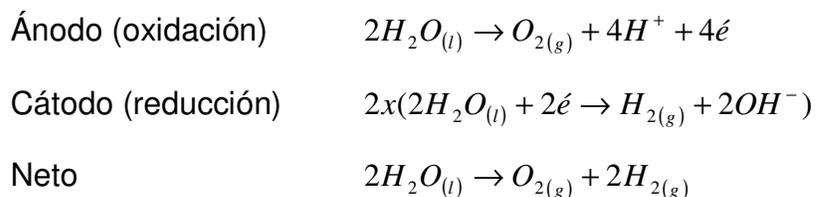


Figura 35. Voltamperograma cíclico mostrando la corriente faradaica y regiones de corriente capacitiva. Tomado del artículo On Echem assisted protein cryst.²⁸

Estas reacciones se caracterizan por la formación de burbujas en la cercanía de los electrodos, comportamiento que se observa después de que el sistema es expuesto a la corriente eléctrica por varias horas. Las reacciones electroquímicas propuestas que se dan en la celda son:



Estas corresponden a la electrólisis del agua y generan burbujas, las cuales pueden llegar a afectar la cristalización, interrumpiendo el flujo de corriente (disminuyendo el efecto del campo eléctrico) o generando movimientos convectivos en el disolvente^{9,41}. Ello es más notorio cuando el electrodo de mayor longitud es el cátodo, electrodo en el cual siempre se observa el mayor número de burbujas formadas, lo más probable es que se deba a la reducción del agua y la producción de hidrogeno. Además la reacción anódica produce protones cambiando la acidez del medio y por lo tanto las condiciones





de cristalización, comportamiento que puede evitarse al trabajar con corrientes pequeñas como las usadas en esta tesis.

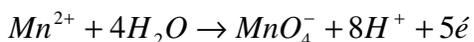
Hablando de las reacciones parásitas que pueden darse dentro de la celda, una de las limitaciones que se encontró en este método de cristalización asistida con corriente eléctrica interna, es que no es viable para proteínas que necesiten de un cofactor metálico con bajo potencial redox para su cristalización, ya que el metal en cuestión puede oxidarse o reducirse, haciendo que la proteína pierda actividad y que su cristalización no sea posible.

Para la metaloproteína estudiada (Con A), se encontró que el metal genera reacciones parásitas que afectan considerablemente la cristalización. Aquí se presentó el problema que el Mn^{2+} es fácilmente oxidable y que lo más probable es que se haya oxidado hasta un estado de oxidación 7+.

De ser así la reacción propuesta es: $Mn^{2+} + 4H_2O \rightarrow MnO_4^- + 8H^+ + 5e^-$

Generándose así el anión permanganato, el cual como es bien sabido es un oxidante muy fuerte que puede dañar fácilmente el material biológico.

Por lo tanto retomando los resultados obtenidos con la lisozima y la taumatina, en los que se observó que éstas tienden a migrar hacia el electrodo de polaridad contraria. La concanavalina A, una proteína con pI de 5, y que al pH de trabajo presenta carga neta negativa, tendería a migrar hacia el ánodo (electrodo positivo). En el cual se dio la reacción de oxidación:



Generándose el ión permanganato, el cual al ser un oxidante muy fuerte no permitiría la formación de cristales ya que antes de que esto lograra suceder, la proteína sería oxidada.





IX. CONCLUSIONES





IX. Conclusiones

- Se demostró que la cristalización de proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico interno, es un proceso general a proteínas cargadas positivamente en las condiciones de trabajo. Observándose que ésta siempre se favorece en las cercanías del electrodo de diferente polaridad.
- La corriente eléctrica no alteró la calidad cristalina, sino al contrario la favorece, lográndose obtener cristales de mayor tamaño y de mejor calidad. Además se obtienen cristales en menor tiempo y el fenómeno de nucleación es más controlado.
- Al aplicar corriente constante a celdas en donde los electrodos se encuentran formando diferentes ángulos (45° , 60° , 90°), se observó un claro efecto en la cristalización, haciendo que ésta se favorezca cerca del cátodo, provocando así que la cristalización siga un patrón de crecimiento, en el cual los cristales obtenidos van incrementando su tamaño mientras más cerca están de estas zonas (cátodo y sitios cercanos).
- La disposición de 90° es la más indicada para reducir tiempos de cristalización, obtener cristales de mayor tamaño, controlar mejor la nucleación y también las reacciones parásitas posibles (electrólisis del agua).
- Las disposiciones de 45° y 60° resultaron las más efectivas para obtener electrodos recubiertos con cristales de proteínas, haciendo que en un futuro este tipo de celdas sean usadas para obtener electrodos modificados para la fabricación de biosensores.





- Para que la cristalización sea óptima, es necesario que el cátodo sea el electrodo de menor longitud o ambos electrodos sean del mismo largo.
- Los experimentos en gel mostraron mejores resultados que los observados en disolución, obteniéndose cristales de más de 500 μ m cuando se aplica corriente eléctrica, además de que la formación de burbujas también se ve disminuida, con el único inconveniente de que se requiere mayor tiempo para obtener cristales.
- La celda construida cumplió los requisitos de ser práctica y económica (**ver anexo IV**), por lo que la opción de patentarla y usarla comercialmente es bastante viable. Si en un futuro se deseara que fuera de menor costo, podría estudiarse otro tipo de materiales a modo de electrodos que pueden sustituir al platino. Con respecto al requisito de ser de uso general, habría que realizar experimentos con otro tipo de macromoléculas y ver si es útil en la cristalización de las mismas, pero al menos para proteínas funciona adecuadamente.
- Una de las limitaciones que se encontró en este método de cristalización asistida con corriente eléctrica interna, es que no es apto para proteínas que necesiten de un cofactor metálico o sales metálicas para su cristalización, ya que el metal en cuestión puede oxidarse o reducirse, haciendo que la proteína pierda actividad y que su cristalización no sea posible.





X. PERSPECTIVAS





X. Perspectivas

- Diseñar un modelo matemático que describa adecuadamente el proceso de cristalización usando un campo eléctrico interno para poder dar conocimiento de más detalles de este proceso.
- Generalizar el método de cristalización electroquímicamente asistida para otro tipo de proteínas y moléculas.
- Estudiar a mayor profundidad la naturaleza de los depósitos de proteínas formados sobre los electrodos para su posible uso como biosensores.





XI. REFERENCIAS





XI. Referencias

- ¹ RCSB *Protein Data Bank*, <http://www.pdb.org> Fecha de visita: 10- 12- 2008.
- ² Sazaki G., Yoshida E., Komatsu H., Nakada T., Miyashita S., Watanabe K., *J Crystal Growth* 173 (1997) 231-234.
- ³ Ataka M., Katoh E., Wakayama N.I., *J Crystal Growth* 173 (1997) 592-596.
- ⁴ Nanev C. N., Perkova A., *J Crystal Growth* 232 (2001) 285-293.
- ⁵ Taleb M., Didierjean C., Jelsch C., Mangeot J. P., Aubry A., *J Crystal Growth* 232 (2001) 250-255.
- ⁶ Taleb M., Didierjean C., Jelsch C., Mangeot J. P., Capelle B., Aubry A., *J Crystal Growth* 200 (1999) 575-582.
- ⁷ Juárez-Martínez G., Steinmann P., Roszak A.W., Isaacs N.W., and Cooper J.M, *Anal Chem* 74 (2002) 3505-3510.
- ⁸ Kadri A., Lorber B., Jenner G., Giegé R., *J Crystal Growth* (2002) 245-321.
- ⁹ Mirkin N., Frontana-Uribe B. A., Rodríguez-Romero A., Hernández-Santoyo A., Moreno A., *Acta Crystallogr D* 59 (2003) 1533-1538.
- ¹⁰ Nieto-Mendoza E., Frontana-Uribe B. A., Moreno A., Sazaki G., *J Crystal Growth*, 275 (2005) 1437-1446.
- ¹¹ Bard A. J., Faulkner L. R., *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*. 2nd Ed. John Wiley and Sons, USA, 2001, pp. 1-2, 9-10, 23, 28-29, 423-432.
- ¹² A. McPherson, *Crystallization of Biological Molecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, UK, 1999.
- ¹³ Nieto-Mendoza E., *Tesis de Maestría en Ciencias Químicas*, Posgrado en Ciencias Químicas-UNAM, 2005, pp. 2-3, 10-12, 21-23, 30-31, 14-19.
- ¹⁴ Grant M. L., Saville D. A., *J Phys Chem* 98 (1994) 10358-10367.
- ¹⁵ Saikumar M.V., Glatz C.E., Larson M.A., *J Crystal Growth* 187 (1998) 277-288.
- ¹⁶ Lehninger Albert L., *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular*, 2^a edición, ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1994, pp. 59, 83-85.
- ¹⁷ Voet Donald, Judith G. Voet, *Bioquímica*, ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1990, pp. 115-117.
- ¹⁸ Lehninger Albert L., *Principios de Bioquímica*, 2^a edición, ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1993, pp. 134- 137, 161, 179-180.
- ¹⁹ Ducruix A., Giegé R., *Crystallization of Nucleic Acids and proteins: A practical approach*, IRL Press at Oxford University, 1992, pp. 5, 7-10, 78, 82, 90-91, 213-214.
- ²⁰ Oxford Journals, *Chemical Senses, Structure–Sweetness Relationship in Thaumatin: Importance of Lysine Residues*, <http://chemse.oxfordjournals.org/cgi/content/full/26/2/167#SEC1> Fecha de visita: 15-12-08
- ²¹ Tzu- Ping Ko, Day J., Greenwood A., McPherson A., *Acta Crys D*50 (1994) 813- 825.





- 22 Florante A. Quioco, Reeke G. N., Brecker J. W., Lipscomb W. N., Edelman G. M., *Proc Nat Acad Sci* (1971) vol. 68, No. 8, pp. 1853- 1857.
- 23 McPherson A., *Crystallization of Biological Molecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, UK, 1999.
- 24 Ochiai Ei-Ichiro, *Química Bioinorgánica: Una introducción*, editorial Reverté, 1984, pp. 394- 395
- 25 Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3CNA> Fecha de visita 16-12-2008
- 26 Moreno A., Soriano M., *Cristalogénesis biológica en medios capilares*, *Ciencia y Desarrollo*, 136, 1997, 19-27.
- 27 Kyriaki P., Bogos A., Stavros J.H., *J Crystal Biology* 117 (1996) 16-23.
- 28 Frontana-Uribe, Moreno A., *Cryst Growth Des* 8 (12) (2008) 4194–4199.
- 29 Pérez Y., Eid D., Acosta F., Marín-García L., Jakoncic J., Stojanoff V., Frontana-Uribe A., Moreno A., *Cryst Growth Des* 8 (7) (2008) 2493-2496.
- 30 García I., Cuarta Escuela de Resonancia Paramagnética Electrónica, Universidad de Alicante, 2004.
- 31 Moreno A., Sasaki G., *J Crystal Growth*, 264 (2004) 438-444.
- 32 Hammadi Z., Astier J.-P., Morin R., Veesler S., *Cryst Growth Des* 7 (2007) 1472-1475.
- 33 De Vos A.M., Hatada M., Van Der Wel H., Krabbendam H., Peerdeman A.F., Sung-Hou K., *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (1985) 1406-1409.
- 34 Panagiotis N.K., Tucker P.A., *J Struct Biol* 117 (1996) 16-23.
- 35 Gabe D.R., *J Met Finish*, (suppl.1). 100 (2002) 579.
- 36 Gabe D.R., *J Met Finish*, 97 (1999) 591.
- 37 Mohler J.B., *J Met Finish*, 93 (1995) 539.
- 38 García-Ruiz JM., Counterdiffusion Methods for Macromolecular Crystallization, *Methods enzymol* 368 (2003), 130-154.
- 39 Lorber B., Sauter C., Robert M.C., Capelle B. Giegé R., *Acta Cryst D*55 (1999) 1491-1494.
- 40 Lorber B., Giegé R., Koszelak S., Day J., Greenwood A., McPherson A., Joseph D.NG., *Acta Cryst D*53 (1997) 724-733.
- 41 Sauter C., Lorber B., Giegé R., *Proteins* 48 (2002) 146-150.
- 42 Lin H., Rosenberger F., Alexander J.I.D., Nadarajah A., *J Cryst Growth* 151 (1995) 153-162.
- 43 Laboratorio de estudios cristalográficos http://www.lec.csic.es/mundo_cientifico/texto.htm Fecha de visita 10-04-09
- 44 Laboratorio de estudios cristalográficos http://www.lec.csic.es/Odissea/odissea_estesp.htm Fecha de visita 10-04-09





XII. ANEXOS





XII.1. ANEXO I

Esquema de la celda de crecimiento con medidas

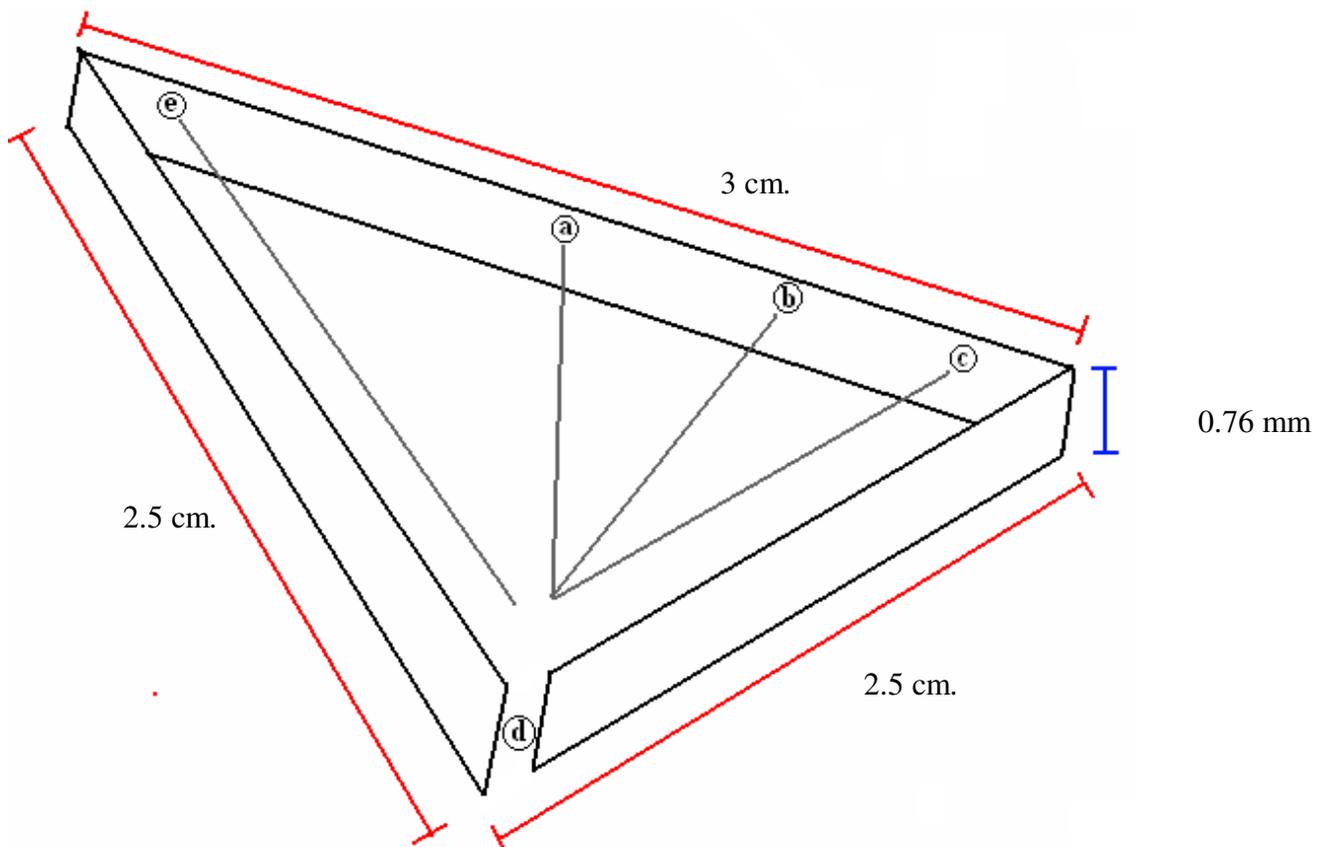


Figura 36. a) Electrodo de 1.5 cm de largo formando ángulo de 45° entre los electrodos. b) Electrodo de 1.5 cm de largo formando ángulo de 60° entre los electrodos. c) Electrodo de 2 cm de largo formando ángulo de 90° entre los electrodos. d) Orificio para llenar la celda. e) Electrodo fijo de platino de 2 cm de largo. Volumen total 0.2mL.





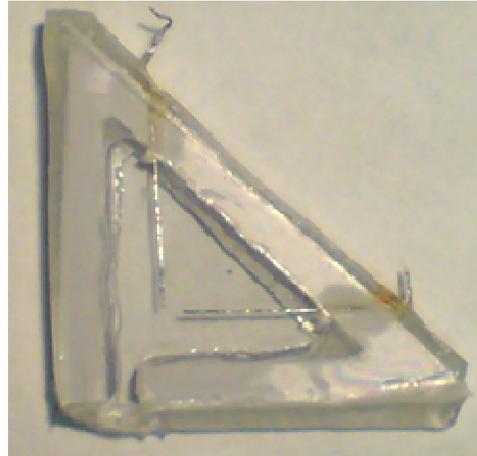
XII.2. ANEXO II

Fotografías de las celdas

Ángulo

Celdas

90°



60°



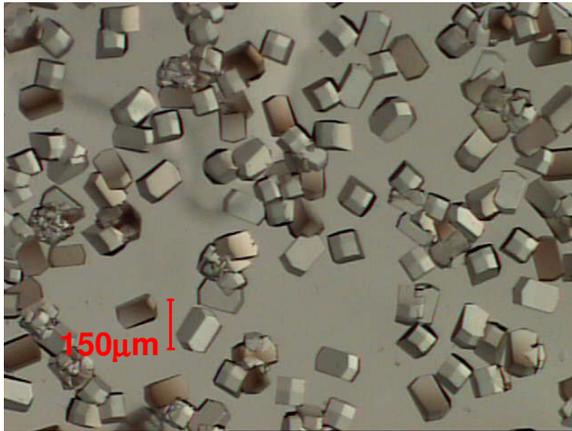
45°



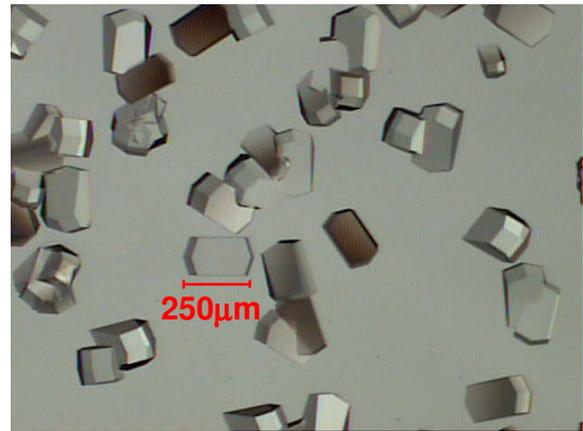


XII.3. ANEXO III

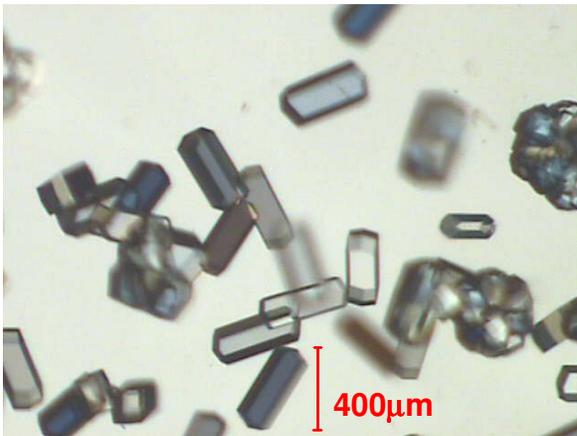
Fotografías de los cristales de las proteínas estudiadas



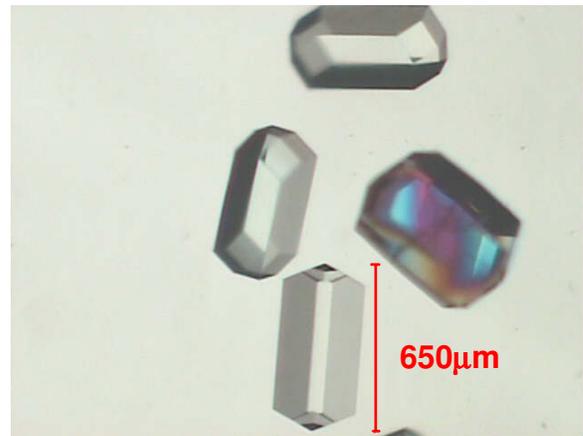
Cristales de lisozima en disolución sin corriente eléctrica aplicada. Imagen tomada a una magnificación total de 66x



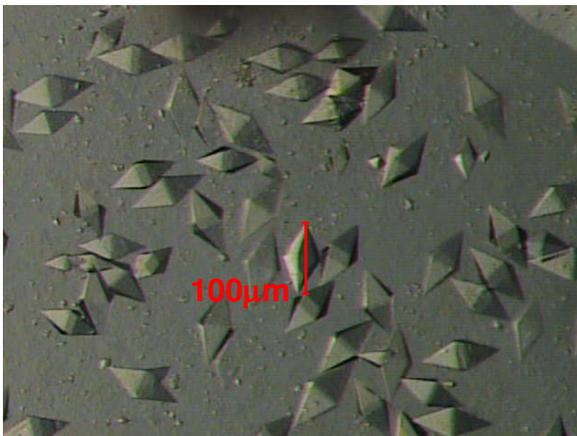
Cristales de lisozima en disolución con corriente eléctrica aplicada de 2μA. Imagen tomada a una magnificación total de 66x



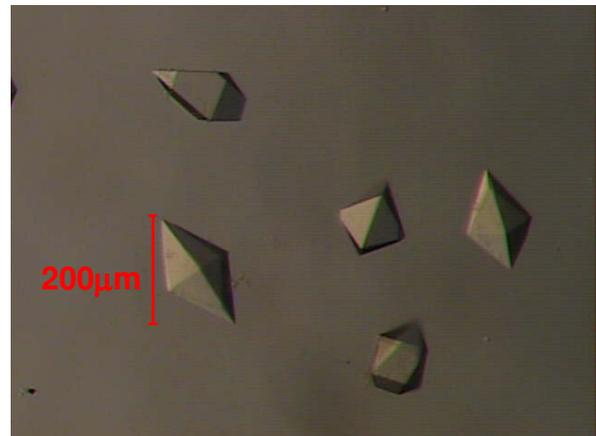
Cristales de lisozima en gel de agarosa sin corriente eléctrica aplicada. Imagen tomada a una magnificación total de 66x



Cristales de lisozima en gel de agarosa con corriente eléctrica aplicada de 1μA. Imagen tomada a una magnificación total de 66x

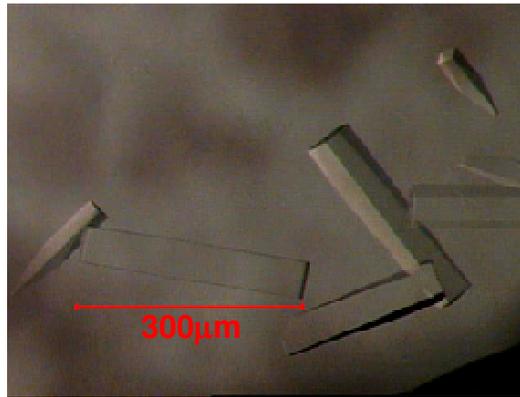


Cristales de taumatina en disolución sin corriente eléctrica aplicada. Imagen tomada a una magnificación total de 165x



Cristales de taumatina en disolución con corriente eléctrica aplicada de 2μA. Imagen tomada a una magnificación total de 165x





Cristales de concanavalina A en disolución sin corriente eléctrica aplicada. Imagen tomada a una magnificación total de 165x

**XII.4. ANEXO IV****Costo de la celda de trabajo**

Materiales	Cantidad	Costo
Portaobjetos	2 tapas de 2.5x2.5x3.5cm	\$ 0.444
Sello estireno	1 sello de 2.5x2.5x3.5cm	\$ 0.009
Electrodos de platino	2 electrodos de 2cm	\$ 89.148
	Total	\$ 89.601

