



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“CRECIMIENTO POLICRISTALINO DE LISOZIMA SOBRE
UN ELECTRODO DE Pt, APLICANDO UN CAMPO
ELECTRICO INTERNO PARA OBTENER UN BIOSENSOR
QUE DETECTA PEPTIDOGLUCANOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

IRISSOL HERNÁNDEZ PAVÓN



MEXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dr. José Alejandro Baeza Reyes
Vocal: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Secretario: Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe
1^{er} Suplente: Dr. José Federico Del Rio Portilla
2^{do} Suplente: Dr. Julio Cesar Aguilar Cordero

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Electrosíntesis y Electroquímica Orgánica
Instituto de Química, UNAM

Asesor: Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe

Sustentante: Irissol Hernández Pavón

A mi madre, Rosalva Pavón.

*Sé que te acuerdas de un amor limpio,
de días soleados de noches bellas.
Sé que te acuerdas aún de tus hijos
cuando me miran tus ojos fijos.
Y te aplaudo que te olvides de tantas cosas,
pues la vida a ti te dió más espinas que rosas.
Y te admiro que de lo malo siempre te olvides,
me imagino, porque a los cielos por eso aún pides.
A la vida le agradezco y le haría un reclamo...
si olvidaras un día madre cuanto te amo.*

JS

A Rosalva, Félix, Emmanuel, Pavel y Ángel†

*Por su amor incansable que siempre llena de paz y alegría mi corazón
Por mostrarme que siempre hay una razón para seguir adelante
Por enseñarme que no sólo hay un camino para llegar a la felicidad
Por recordarme que siempre hay algo nuevo que aprender*

A Alejandro Baeza y Bernardo Frontana

*Por ser una luz en mi vida
Por sus acertados consejos
Por sus conocimientos de vida*

A Miriam, Rogelio, Mayeli y Francisco, mis amigos incondicionales

*Por sus sonrisas que iluminaron mi día
Por los retos impuestos que me han hecho madurar
Por su apoyo incondicional*

Y a todos aquellos que han compartido algún momento de su vida a mi lado

Mil gracias

Se agradece a DGAPA-UNAM por el financiamiento de la beca otorgada bajo el proyecto PAPIIT-UNAM IN212207-3.

“CRECIMIENTO DE MONOCRISTALES DE PROTEÍNAS DE CALIDAD CRISTALOGRÁFICA EN UNA CELDA CON CAMPO ELÉCTRICO INTERNO DE INTENSIDAD VARIABLE Y USO DE LA CELDA EN LA PREPARACIÓN DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON DEPÓSITOS CRISTALINOS DE PROTEÍNAS”

Índice de contenido

RESUMEN

I. Introducción

II. Antecedentes

II.1 Lisozima

II.1.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

II.1.2 ACTIVIDAD

II.2 Lisozima - Sustratos

II.3 Cristalización

II.3.1 CINÉTICA GENERAL DE LA CRISTALIZACIÓN

II.3.2 FACTORES QUE AFECTAN LA CRISTALIZACIÓN

II.3.3 MÉTODOS DE CRISTALIZACIÓN

II.3.4 CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

II.4 Electroquímica

II.4.1 LAS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

II.4.2 POTENCIOMETRÍA

II.4.3 CELDAS ELECTROQUÍMICAS

II.4.4 LA REACCIÓN ELECTROQUÍMICA

II.4.5 DOBLE CAPA ELÉCTRICA

II.4.6 TRANSPORTE DE MASA

II.5 Biosensores

II.5.1 ELECTROQUÍMICA DE LOS BIOSENSORES

II.5.2 RESPUESTA ANALÍTICA DE LOS BIOSENSORES

II.6 Diseño de los biosensores

II.6.1 INMOVILIZACIÓN DE ELEMENTOS BIOLÓGICOS

II.6.2 MEMBRANAS SELECTIVAS A IONES

II.6.2.1 NAFIÓN

III. Planteamiento del problema

IV. Hipótesis

V. Objetivos

V. Parte experimental

V.1 Instrumentación

V.2 Materiales y metodologías

V.2.1 CONSTRUCCIÓN DE CELDAS ELECTROQUÍMICAS

V.2.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE TRABAJO

V.2.3 CRISTALIZACIÓN A CORRIENTE CONTROLADA

V.2.4 RECUBRIMIENTO DEL ELECTRODO CON NAFIÓN.

V.2.5 ATRAPAMIENTO EN UNA MATRIZ DE GEL DE AGAROSA

V.2.6 ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR

VI Resultados y discusión

VI.1 Cristalización a corriente controlada; discriminación entre celda Tipo A y Tipo B. ...

VI.2 Búsqueda de las condiciones óptimas para recubrir el electrodo de platino con depósito policristalino de lisozima

VI.3 Cinética de disolución cristalina

VI.4 Utilización de nafion[®] como membrana

VI.5 Estudio de estabilidad del electrodo Pt⁰ | Lisozima en una matriz de gel de agarosa

VI.6 Hasta ahora, ¿biosensor o no?

VII. Conclusiones

VIII. Referencias bibliográficas

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un biosensor potenciométrico que detecta peptidoglucanos. Este biosensor se construyó utilizando como elemento sensor a la lisozima.

Mediante la cristalización asistida con un campo eléctrico se logró recubrir completamente un electrodo de platino (transductor) con depósito policristalino de lisozima. Para ello se utilizaron las siguientes condiciones experimentales: [Lisozima]= 40 mg/mL en disolución amortiguadora de acetatos 200 mM, pH = 4.5, $I = 2 \mu\text{A}$, $T = 11 - 13 \text{ }^\circ\text{C}$ y $t = 24$ horas.

Para inmovilizar los cristales de lisozima en el alambre de platino se utilizaron 2 métodos: una membrana de Nafión[®] y una matriz de gel de agarosa que contenía el analito: la NN-triacetilquitotriosa. Ambos métodos mostraron que el biosensor es selectivo al analito.

I. Introducción

En años recientes, se ha incrementado el uso de los biosensores para monitorear procesos biológicos y sintéticos. Algunas aplicaciones típicas incluyen el control y monitoreo del medio ambiente, mediciones químicas en agricultura, en la industria de alimentos, drogas y, particularmente en biomedicina ha sido posible determinar la concentración de gases y metabolitos en sangre y otros fluidos corporales, para evaluar el estado metabólico del paciente.¹

El principio de operación de un biosensor es detectar información relativa a un cambio fisiológico o bioquímico, la cual es transmitida y convertida por un transductor para obtener una señal eléctrica u óptica detectable. La aplicación práctica de cualquier biosensor requiere de un análisis completo del sistema considerando las siguientes características:² 1) la detección o parámetro a medir, 2) el principio de trabajo del transductor, 3) el modelo físico y/o químico/bioquímico, 4) la aplicación y, 5) la tecnología y los materiales empleados en su fabricación.

La función de un biosensor depende de la especificidad de la materia biológicamente activa, y la selección de éste material biológico depende del analito que quiere detectarse. Algunos parámetros utilizados para evaluar las propiedades funcionales y la calidad del biosensor son la sensibilidad, la selectividad y el tiempo de respuesta.

Como consecuencia del desarrollo de los biosensores, el campo de investigación en materiales y técnicas de fabricación es cada vez más activo. A pesar de estos avances, hoy en día aún existen limitantes en las aplicaciones de los biosensores siendo las más importantes la bioafinidad y estabilidad.

¹ **Ho. M. Y. K. and Rechnitz G. A.**, Highly stable Biosensor using an artificial enzyme, *Analytical Chemistry* (1987), 59, 537-539.

² **Göpel W. and Schierbaum K. D.**, *Definitions and typical examples in: sensors – A comprehensive survey. Chemical and Biochemical Sensors*, editorial VCH, New York, 1991, Vol. 2, 567-575.

II. Antecedentes

II.1 Lisozima

La lisozima es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces β -1,4 glucosídicos entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y la N-acetilglucosamina (NAG), que son los constituyentes de la pared celular de las bacterias. Se conocen alrededor de 100 secuencias de lisozima que se encuentran distribuidas en animales, plantas y virus.¹ Algunos fluidos del cuerpo humano como las lágrimas, saliva, orina y leche contienen, respectivamente, 2.6, 0.13, trazas y 0.3 mg/mL de lisozima.²

La lisozima es muy efectiva para combatir las infecciones bacterianas siendo gentil con el sistema inmune del huésped, es por ello que actualmente se emplea en medicinas y como aditivo de alta seguridad para alimentos.

II.1.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

La lisozima de huevo blanco de gallina (HEWL por sus iniciales en inglés Hen Egg White Lysozyme) es una proteína pequeña de masa molecular de 14307 Da (129 residuos de aminoácidos¹) y con un punto isoeléctrico de 11.5.³ Su estructura terciaria (Figura 1) esta conformada por un dominio α y uno β con una gran hendidura sobre la superficie que ha sido identificada como el centro

¹La estructura primaria de la lisozima está constituida por los siguientes 129 residuos de aminoácidos:

1 kvygrcelaa amkrldny rgyslgnwvc aakfesnfnt hatnrntdgs tdygilqins rwwcndgrtp gsknlcnipc sallssdita svncakkias ggngmnawva wrnrckgtdv hawirgcr1

activo, el cual divide a la molécula en 2 dominios: el primero constituido por los residuos 1 – 35 y 85 – 129 que forman 4 α -hélices y una pequeña hélice α_{10} cercana al carboxilo terminal; el otro dominio (residuos 39 – 84) está formado por una triple hebra de lámina β antiparalela, una hélice α_{10} y un lazo que lo une con el otro dominio.⁴ Además se forman 4 enlaces disulfuro entre los residuos 6 – 127, 30 – 115, 64 – 80 y 76 – 94.

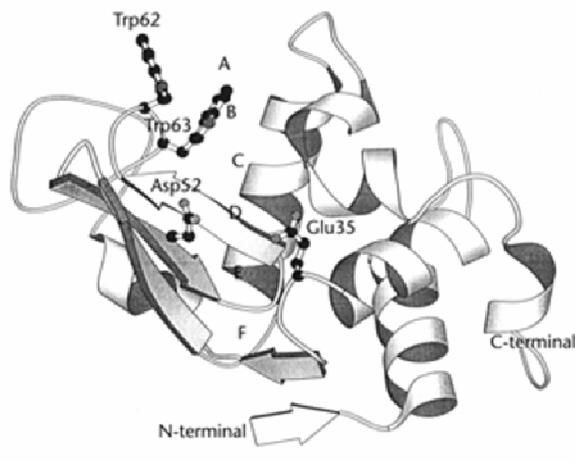


Figura 1. Diagrama esquemático de la estructura cuaternaria de la lisozima de huevo blanco de gallina. Los residuos Glu 35 y Asp 52 son los grupos catalíticos. Las letras A – F indican los subsitios de unión de la hendidura del sitio activo⁶

Los cuatro enlaces disulfuro presentes en la estructura de la lisozima hacen que la molécula sea compacta y resistente al calor y a altos valores de presión. La pérdida de actividad enzimática ocurre después de algunos tratamientos⁷ a 100 °C por 3 minutos a pH = 4.5, a 100 °C por 30 minutos a pH = 5.3 o a pH = 7.9 por 30 minutos a 70 °C. El tratamiento a 600 MPa y 40°C por 30 minutos y pH = 3.7 causa la desnaturalización. Además de los tratamientos antes mencionados, la lisozima se desnaturaliza por acción del ditiotreitolo o mutagénesis sitio dirigida.

II.1.2 ACTIVIDAD

Las interacciones proteína-carbohidrato juegan un papel muy importante en los sistemas biológicos y algunas de estas se observan de forma muy general en algunas bases moleculares; como son: a) interacciones entre un anillo aromático y un residuo de carbohidrato, b) unión covalente de hidrógeno y c) participación de moléculas de agua.⁵

La lisozima cataliza la hidrólisis de los enlaces β -1,4 glucosídicos de la quitina, un homopolímero de N-acetil D-glucosamina, o la pared celular de las bacterias Gram positivas que consiste de polímeros alternados de ácido N acetilmurámico y N-acetil, D-glucosamina.

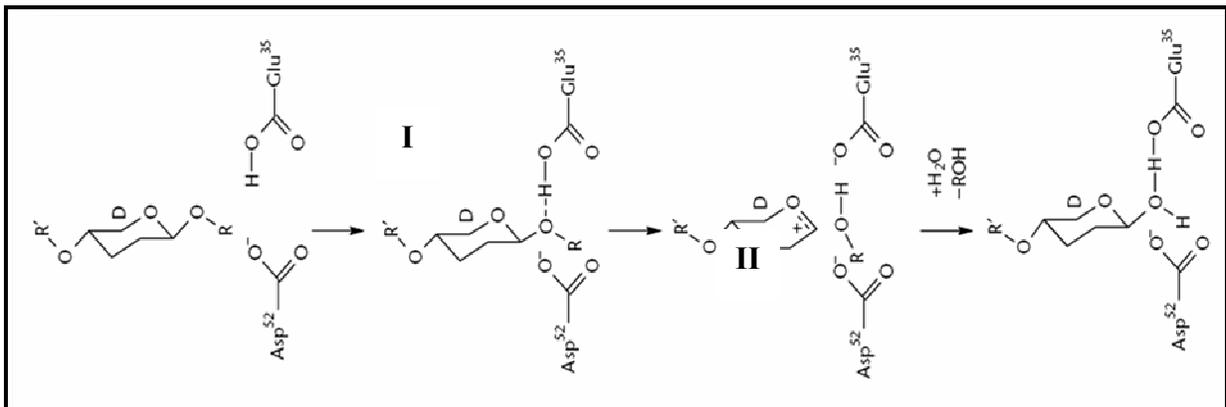


Figura 2. Mecanismo catalítico de la lisozima de huevo blanco de gallina, la letra D, indica uno de los 6 subsitios.

El mecanismo catalítico (Figura 2) se dedujo del modelo de formación del complejo enzima-sustrato, en el que el polisacárido se une a la hendidura del sitio activo de la enzima, el cual está constituido por 6 subsitios (A – F ó -4 a +2), que trae consigo la distorsión del anillo del azúcar en el subsitio D, pasando de una silla normal a una semisilla para lograr un mejor contacto con la enzima; ésta

distorsión sirve para estabilizar el estado de transición de la reacción. Se sugiere que el Glu 35 dona su protón al oxígeno ligado a los anillos de azúcar D y E (I figura 2), y el enlace entre el oxígeno y el C1 del azúcar D se rompe, formándose un ión oxocarbonio (II Figura 2) que es estabilizado por el Asp 52 mediante interacciones electrostáticas; además se propone que este residuo actúa como escudo de la cara α^2 del ión oxocarbonio para que la molécula de agua haga el ataque nucleofílico por la parte desprotegida (cara β), reteniendo así la estereoquímica del C1 en el producto.⁶

II.2 Lisozima - Sustratos

Los sustratos naturales de la lisozima son los peptidoglucanos de la pared celular de las bacterias y la quitina (Figura 3); ésta última es el biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y es sintetizado por un número enorme de organismos vivos, como algas, hongos, bacterias, artrópodos, crustáceos y algunos anélidos.

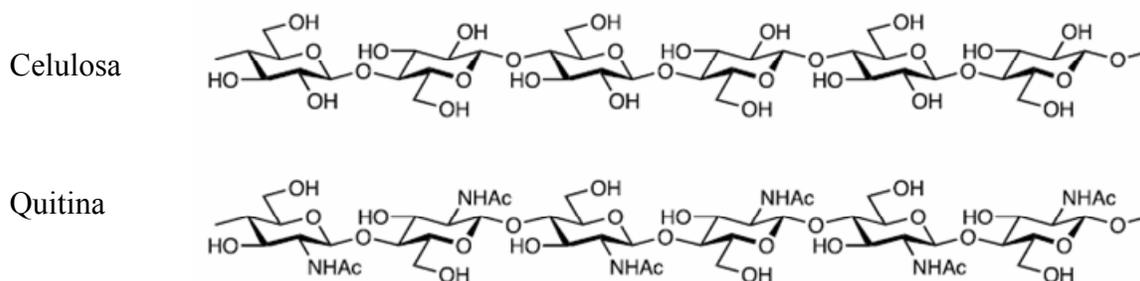


Figura 3. Estructura química de la celulosa y de la quitina, poli(β - (1 \rightarrow 4)- N-acetil -D-glucosamina, las cuales muestran similitudes estructurales.

² En los conformeros se pueden apreciar 4 disposiciones espaciales de los enlaces entre los carbonos y los sustituyentes: verticales (axiales), orientados hacia fuera del anillo a lo largo del ecuador (ecuatoriales), aquellos axiales y ecuatoriales orientados hacia abajo son α y finalmente los axiales y ecuatoriales orientados hacia arriba son β .

La forma más abundante y fácilmente accesible es la α -quitina, que se extrae de los hongos y levaduras, mientras que la β -quitina se encuentra asociada con proteínas, lo que complica más su aislamiento. Las cadenas de polímero en la α -quitina están alineadas de forma antiparalela (Figura 4), presentando un máximo de enlaces de hidrógeno intermoleculares; por el contrario en el alomorfo β , las cadenas son paralelas, haciendo que las interacciones intermoleculares sean débiles.⁷

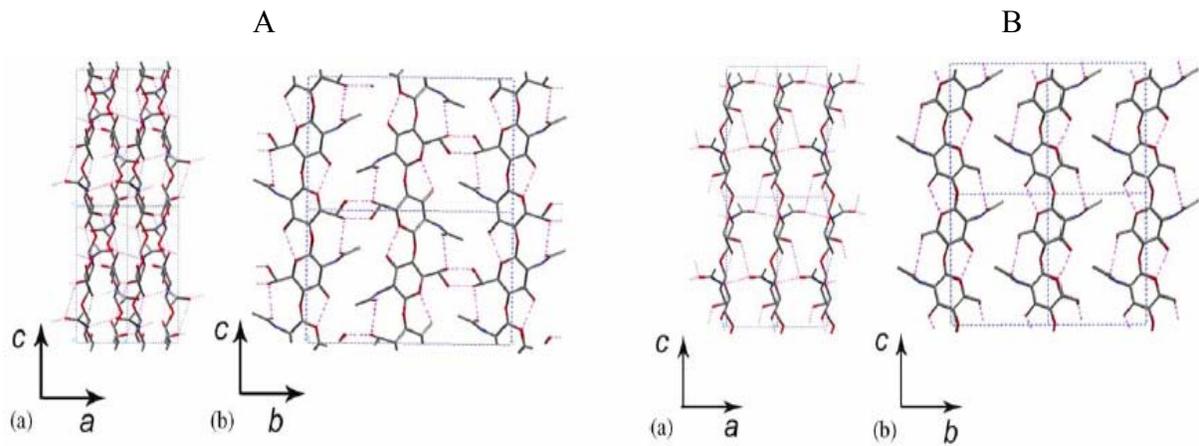


Figura 4. Proyecciones sobre los ejes ca y cb , de las estructuras de la (A) α -quitina y de (B) la β -quitina, mostrándose que cuando las cadenas se alinean en forma antiparalela (A) el número de enlaces de hidrógeno es mayor en comparación de cuando se encuentran paralelas (B).

Cuando la quitina se degrada parcialmente se obtienen series de oligosacáridos. Éstos, como los derivados del quitosano, son reconocidos por su bioactividad, que incluye actividad antitumoral, bactericida, fungicida, regulación en el crecimiento de plantas; además se utilizan para probar la actividad catalítica de la lisozima.⁸

Diversos estudios han demostrado que el grupo N-acetil de la glucosamina proveniente de la pared celular de las bacterias se une al subsitio C de la lisozima

cuando se forma el complejo enzima-sustrato, siendo esta unión requerida para completar la hidrólisis.

Además, estudios sobre la digestión de la tri-N-acetilquitotriosa y p-nitrofenil-di-N-acetilquitobiosa con lisozima indican que la hidrólisis de estos sustratos es mediante la formación del complejo enzima-sustrato, la cual no involucra residuos en el subsitio C. Estos resultados sugieren la importancia de los grupos N-acetil en cada subsitio de la lisozima, pues dependiendo la naturaleza del sustrato el subsitio responsable de la formación del complejo enzima-sustrato es diferente. La importancia de los grupos N-acetil de los residuos del azúcar para unirse al subsitio C en la hidrólisis de la lisozima de los oligosacáridos de la quitina es concordante con la conclusión de la digestión de los peptidoglucanos. Sin embargo, se puede decir que en la ruptura de un oligosacárido por la lisozima no es un requerimiento que el residuo de la azúcar contenga el grupo acetamido en el subsitio C. Resultados muestran que el grupo N-acetil en el subsitio D es necesario para la hidrólisis de la quitina ⁹

II.3 Cristalización

La cristalización es un proceso fisicoquímico en el que se realiza un cambio de fase, pasando el sistema de un estado de desequilibrio (disolución) al estado de equilibrio; en este proceso el sistema incrementa el orden ya que pasa de un sistema relativamente desordenado a un sistema mucho más ordenado: el cristal.

De acuerdo con las leyes de la termodinámica para que el proceso sea espontáneo debe ocurrir un descenso en la energía interna para que compense el incremento del orden, ya que todo sistema tiende a un mínimo de energía y un máximo de desorden. Se sabe que en muchos sistemas el cambio de fase no empieza en el momento que es termodinámicamente posible (cuando el sistema esté sobresaturado) sino en condiciones que frecuentemente sobrepasan el equilibrio.¹⁰ Las disoluciones acuosas de casi todas las sales solubles son

estables a concentraciones que superan significativamente la concentración de equilibrio. Esta estabilidad aparente se debe a que el comienzo del cambio de fase viene condicionado por el agrupamiento en centros discretos de las partículas estructurales (átomos, iones o moléculas), es decir por la **nucleación** (punto B de la Figura 5). La nucleación es la formación de cúmulos constituyentes del sólido separados en el interior del líquido, sin embargo no todos los cúmulos formados crecen y aumentan su volumen, por ello la rapidez del cambio de fase depende del número de cúmulos capaces de crecer por unidad de volumen del sistema en el que ocurre la nucleación y por unidad de tiempo; ésta magnitud es la velocidad de nucleación.

La nucleación en un sistema sobresaturado ocurre en las siguientes etapas:

1. Inicialmente, la velocidad de formación de los cúmulos es variable.
2. Después de un tiempo se alcanza un estado cuasi-estable en la distribución del tamaño de los cúmulos. Esto significa que el número de cúmulos en cada una de las categorías del tamaño no cambia, y que aquellos por encima del tamaño crítico³ se forman a una velocidad constante y no muy alta. La sobresaturación del sistema no cambia prácticamente durante todo el tiempo que dura esta etapa.
3. Cuando en el sistema se ha formado un número suficiente de cúmulos por encima del tamaño crítico, se produce un descenso gradual significativo de la sobresaturación.

Después de que se han formado los núcleos (cúmulos de tamaño mayor al crítico) y puesto que el sistema está en condiciones de sobresaturación, se adicionan a ellos otras moléculas aumentando su volumen, llevándose a cabo el **crecimiento de los cristales** en donde ocurren dos procesos cinéticos:

1. Transporte de materia, que consiste en la difusión y/o convección de las moléculas de la disolución hacia el núcleo.
2. Reacción superficial, que es la incorporación de las moléculas al cristal.

³ El tamaño crítico de un cúmulo es una función inversa de la sobresaturación existente en el sistema y es del orden de nanómetros.

Como consecuencia de este crecimiento, con el tiempo aparecen cristales en el sistema (punto C de la Figura 5).

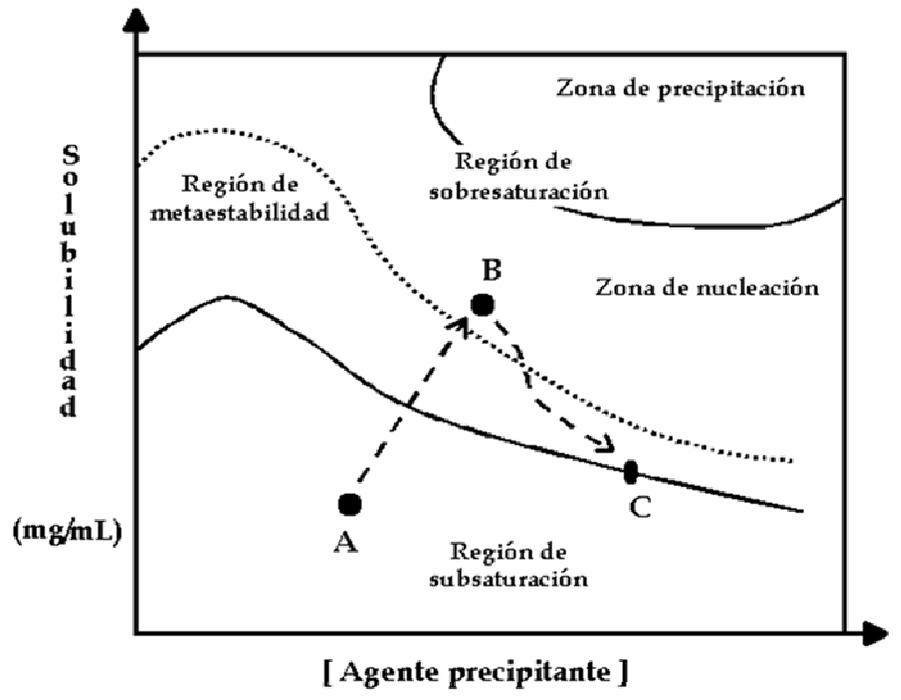


Figura 5. Gráfico de Ostwald-Miers. Muestra el proceso de cristalización de una macromolécula biológica, iniciando con el punto A en una concentración de subsaturación, para llegar al punto B en donde hay una sobresaturación, siendo aquí donde se produce la nucleación. Finalmente se tiende al equilibrio en donde se obtienen los cristales, punto C.¹¹

El tiempo que transcurre desde el establecimiento de la sobresaturación y el origen observable de la nueva fase se conoce como periodo de inducción y depende sobre todo de la temperatura del sistema y de la magnitud de la sobresaturación, es decir para una sobresaturación mayor a un determinado valor crítico, las partículas de la nueva fase aparecen rápidamente, mientras que para una sobresaturación menor, el tiempo necesario para el origen de las partículas de la nueva fase es largo. Este periodo de inducción de la cristalización puede dividirse en tres periodos: a) tiempo necesario para el establecimiento de una

distribución estacionaria del tamaño de los cúmulos en la disolución sobresaturada, b) tiempo necesario para el origen del núcleo y c) tiempo necesario para que el núcleo crezca hasta un tamaño detectable.

En la región de metaestabilidad, la disolución se comporta como estable puesto que la sobresaturación es baja y por ende sólo después de un largo tiempo se forma una cantidad apreciable de nuevos cristales. En la zona de nucleación, la formación de cristales es rápida y en grandes cantidades.

Si el proceso de cristalización se llevó a cabo adecuadamente se obtienen cristales de buena calidad, aptos para caracterizar su estructura tridimensional por difracción de rayos X. Un cristal de buena calidad, además de ser de buen tamaño, debe tener sus moléculas igualmente orientadas respecto al rayo incidente. Esto quiere decir que la estructura interna del cristal debe tener el menor número de defectos o impurezas, para que las moléculas sean capaces de difractar los rayos X y proporcionar patrones de difracción con alta resolución que puedan caracterizarse y así obtener la estructura tridimensional de la macromolécula.

II.3.1 CINÉTICA GENERAL DE LA CRISTALIZACIÓN

La sobresaturación inicial determina en gran medida el desarrollo de la cristalización y el carácter de la fase sólida originada. Dependiendo del grado de sobresaturación inicial el sistema puede encontrarse en 4 posibles estados:

- a) Metaestable
- b) Nucleación heterogénea
- c) Nucleación homogénea
- d) Agregación rápida.

Si el sistema se encuentra en la zona metaestable, la cristalización no se produce espontáneamente, sin embargo si en el sistema hay cristales, estos crecen hasta que se agote la sobresaturación.

Por otro lado cuando el sistema se encuentra en el área de nucleación heterogénea se produce una cristalización espontánea y los cúmulos formados continúan creciendo hasta que se agota completamente la sobresaturación. En el área de nucleación homogénea el número de cristales originados crece bruscamente con un aumento moderado de la sobresaturación, esto significa que el crecimiento de nuevos cristales es más rápido que el crecimiento de los que inicialmente se formaron, por ello la dimensión media de los cristales disminuirá rápidamente al aumentar la sobresaturación.

Si nos situamos en un valor superior de sobresaturación en el área de nucleación homogénea se produce una rápida agregación de las partículas originadas (se trata de agregados y no de cristales verdaderos), por esta razón la dimensión media de las partículas resultantes crece al aumentar la sobresaturación inicial, a pesar de que la dimensión de los cristales que componen el agregado continua bajando.

La sobresaturación inicial influye también en la calidad de la celda cristalina, es decir a sobresaturación baja (en la zona metaestable y parte de nucleación heterogénea) se originan cristales con la celda bien desarrollada; cuando la sobresaturación es mayor (zona de nucleación heterogénea) se originan cristales con su celda dilatada o dendritas, mientras que en el área de nucleación homogénea se originan pequeños cristales simétricos en los que las caras cristalinas no están desarrolladas. Finalmente a sobresaturaciones muy altas se forman mayoritariamente agregados esféricos aparentemente amorfos.

II.3.2 FACTORES QUE AFECTAN LA CRISTALIZACIÓN

Entre los muchos factores que afectan el proceso de cristalización, el más importante es quizás la presencia de aditivos, que en concentraciones insignificantes cambian la velocidad de la nucleación y de crecimiento, el tamaño y la morfología de los cristales formados, así como las propiedades físicas del producto. Los aditivos pueden actuar mediante mecanismos diferentes, algunos se adsorben selectivamente en determinadas superficies cristalinas y bloquean los lugares activos de crecimiento, otros cambian la solubilidad de la sustancia, las propiedades de la disolución o las capas de adsorción en la superficie del cristal en crecimiento y en otros casos pueden haber interacciones químicas entre la proteína que cristaliza y el aditivo.

Los aditivos se pueden clasificar a grandes rasgos en los siguientes grupos:

- **Ácidos o bases libres.** Modifican el pH de la disolución y con ello la solubilidad de la proteína, debido a que se modifican las interacciones de este con la proteína. Las proteínas tienen un mínimo de solubilidad cuando el pH del medio se aproxima a su punto isoeléctrico.
- **Sales.** Modifican la solubilidad de dos formas: la primera consiste en aumentar la fuerza iónica para obtener un decremento exponencial en la solubilidad (salting-out) y en la segunda se disminuye la fuerza iónica para aumentar la solubilidad (salting-in).
- **Aditivos orgánicos:** entre ellos disolventes y colorantes orgánicos, que pueden precipitar a la proteína, ya que desplazan moléculas de agua. Además disminuyen la constante dieléctrica del medio; éstos aditivos son efectivos en cantidades de 10^{-4} hasta 10^{-6} moles por mol de proteína.

II.3.3 MÉTODOS DE CRISTALIZACIÓN

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

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

Los métodos de difusión en fase vapor son los conocidos como métodos clásicos, en dichos métodos la sobresaturación se alcanza por secado o concentración de una gota mediante un agente precipitante. Dependiendo de cómo es colocada la gota para que cristalice la proteína, se clasifican en: método de la gota colgante, método de la gota sedente y método de la gota en sandwich. Los tres métodos clásicos de cristalización siguen el mismo principio, pues mediante la extracción del agua, la gota irá incrementando la concentración de la proteína y los cristales de la misma aparecerán dentro de la gota de cristalización.

Finalmente el método más sencillo para cristalizar una proteína consiste en mezclar todos los componentes de la cristalización (la proteína, el agente precipitante y el disolvente) en condiciones de metaestabilidad, para posteriormente dejarlos reposar y obtener los cristales. Este método de cristalización se conoce como el método "batch". Sin embargo, para obtener cristales de proteína con alta calidad es necesario desarrollar nuevos métodos de crecimiento, que permitan eficientar el tiempo y el tamaño del cristal, sin disminuir la calidad del mismo. Actualmente se han realizado estudios de algunos parámetros fisicoquímicos que controlan la cristalización de proteínas. Entre ellos se encuentran estudios del campo magnético,² el electroenfoco⁴ y la aplicación de un campo eléctrico externo.⁵

Al aplicar una corriente eléctrica directamente a una disolución se genera un campo eléctrico interno,⁴ cuyo efecto en la cristalización de proteínas ha sido estudiado recientemente. Los primeros estudios de este campo fueron realizados en una celda donde los electrodos se encontraban paralelos, encontrándose que la distancia óptima entre los electrodos para la cristalización es de 5 mm. En este estudio se observa la disminución del tiempo de cristalización y la direccionalidad de ésta hacia el cátodo (electrodo negativo).⁶ Cuando se combina el efecto de un campo eléctrico interno y uno magnético se logra aumentar la orientación y la homogeneidad en el tamaño del cristal.⁷ Finalmente se aplicó un campo eléctrico interno al método de cristalización por acupuntura en gel, donde además de controlar la nucleación de los cristales hacia el ánodo, se logró disminuir considerablemente el tiempo de cristalización (cristales de lisozima obtenidos en 24 h en vez de 48 h, y de taumatina en 5 días en vez de 12 días).⁸

II.3.4 CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

La cristalización de proteínas es de gran importancia práctica en biología, bioquímica y biotecnología como un método de purificación, convirtiéndose además en una herramienta importante de elucidación de su estructura atómica mediante el análisis de difracción de rayos X.

En la última década, se ha estudiado la cristalización de la lisozima bajo la influencia de algunos parámetros externos, encontrándose que al trabajar a bajas presiones hidrostáticas con altos valores de pH se favorece el tamaño y el número de los cristales tetragonales de la lisozima.¹² Otro estudio reveló que la presencia de un campo magnético de 1.25T en la cristalización produce que el eje [001]⁵ de los cristales se alinee de forma paralela con la dirección del campo.¹³

⁴ Se han reportado otro tipo de experimentos, en los cuales, el campo eléctrico se aplica fuera de la celda de cristalización. En este tipo de experimentos al campo generado se le conoce como campo eléctrico externo.

⁵ El eje [001] del cristal tetragonal de lisozima es el de mayor simetría, lo que significa que cada α -hélice de la celda unitaria es repetida 4 veces, mientras que en la proyección en los ejes [010] y [100] sólo se repite 2

Por otro lado cuando se varía simultáneamente la intensidad de los campos magnético y gravitacional hay cambios drásticos en la morfología de los cristales, habiendo una transición de tetragonales a ortorrómbicos.¹⁴ Y para finalizar con esta lista de ejemplos al combinar un campo eléctrico interno y un magnético simultáneamente en la cristalización de lisozima, el tiempo de nucleación disminuye y los cristales obtenidos presentan una homogeneidad en su tamaño y orientación paralela al campo magnético.¹⁵

Las interacciones agua-proteína son de crucial importancia en la cristalización; por ello muchos estudios se han enfocado a monitorear los cambios que ocurren en las proteínas debidos a la hidratación/deshidratación. Para la lisozima se ha encontrado que la agregación de altos niveles de moléculas de agua en el cristal no modifica su estructura terciaria, pero las interacciones proteína-proteína a bajos contenidos de agua puede afectar fuertemente su estructura terciaria y secundaria. La hidratación de la lisozima ocurre en cuatro pasos: penetración lenta de moléculas de agua al interior de la interfase proteína-proteína; transición gradual que ocurre en cada molécula de proteína y que es independiente de las otras moléculas; formación de monocapas de agua y acumulación de agua libre. Experimentos de absorción calorimétrica muestran que existen 420 moléculas de agua por cada molécula de lisozima.¹⁶

Para determinar las condiciones de cristalización de una proteína es necesario considerar entre otros factores la carga superficial neta y el tamaño de las proteínas¹⁷

La **carga superficial neta** transportada por los grupos polares depende del pH de la disolución. Para la lisozima a pH = 4.5 hay de 10 a 12 cargas positivas,¹⁸ como consecuencia las repulsiones son dominantes entre estas macromoléculas. Por el contrario a pH = 9 las fuerzas dominantes son atractivas, lo que impide que haya orden en el arreglo del cristal produciendo amorfos que precipitan. Para reducir la atracción neta y retener una pequeña contribución repulsiva se tiende a trabajar con pH \neq pI de la proteína y utilizar agentes precipitantes (NaCl,

veces. Éste eje es el que tiene mayor contribución por las α -hélices de la celda unitaria, haciendo que su anisotropía diamagnética sea mayor, por ello se exhibe una orientación paralela con el campo magnético.

(NH_4) $_2$ SO $_4$, etc.), puesto que habrá interacciones entre los contraiones y las cargas superficiales de la proteína. Luego entonces para buscar ventajas en las condiciones de cristalización es necesario modificar las fuerzas repulsiva/atractivas de los residuos polares.

Otro factor importante en la cristalización de las proteínas es su **gran tamaño** en comparación a las sales inorgánicas. A valores de concentración altos, típicos de las condiciones de cristalización, el promedio de separación de las moléculas de proteína en la disolución es comparable a su espacio en el cristal

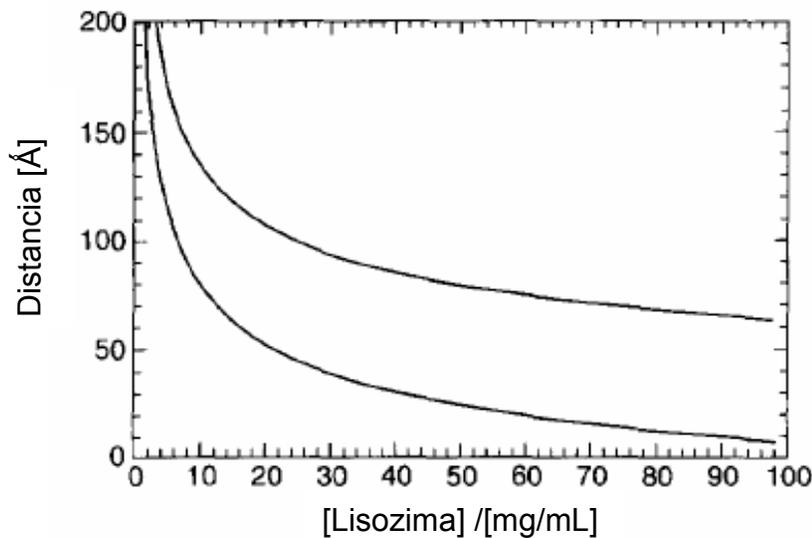


Figura 6. Separación de las moléculas de lisozima en disolución como función de su concentración.¹⁹

En la figura 6 se muestra que, para la lisozima, el diámetro del monómero hidratado es de 55 Å.²⁰ Colocándonos a la concentración comúnmente utilizada en cristalización 50 mg/mL el promedio de separación entre las superficies de las proteínas es alrededor de 25 Å; por ello para inducir la cristalización se utiliza un electrolito (agente precipitante) para reducir la fuerzas repulsivas lo que conlleva a la reducción de distancias.

II.4 Electroquímica

La electroquímica es la rama de la química que se encarga de estudiar los fenómenos eléctricos y químicos así como la relación que existe entre ellos. Dentro de la electroquímica está la electroquímica analítica, que estudia los procesos de reacción que ocurren en la interfase conductor-disolución, generados espontáneamente o por medio de una perturbación externa para obtener información del sistema.

Los procesos de reacción son los eventos que ocurren antes, durante y después de imponer la perturbación de tipo eléctrico, siendo la reacción electroquímica el principal de éstos. De acuerdo al tipo de perturbación que se imponga será el tipo respuesta que se manifestará.

II.4.1 LAS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Las técnicas electroquímicas pueden dividirse de acuerdo a la manera en que se realizan las mediciones y éstas son:

- Potenciométricas. La técnica es estática ($I = 0$) y obtiene como dato una diferencia de potencial entre dos electrodos.
- Galvanostáticos. Se aplica corriente a la celda obteniendo cambios en la diferencia de potencial.
- Potenciostáticas. Se provoca una perturbación y ésta provoca reacciones redox habiendo transferencia de electrones, generando como respuesta un aumento en la intensidad de corriente que depende de la velocidad de transferencia de electrones en la interfase metal-disolución.

En las últimas dos, las condiciones no están en equilibrio, más bien son dinámicas y por lo tanto dependen del tiempo.

II. 4.2 POTENCIOMETRÍA

Es un tipo de medición con la que se obtiene información acerca de la composición de una disolución mediante la medición del voltaje del potencial que se genera entre los electrodos. Los dispositivos que se utilizan para ello tienen la característica de asegurar que no se extraiga de la celda ninguna cantidad significativa de corriente. El voltaje se puede medir con un potenciómetro o con un multímetro (seguidor de voltaje), en ambos casos se extrae de la celda una corriente del orden de 10^{-9} A, que equivale a 10^{-14} moles de materia oxidada o reducida durante el tiempo en el que se hace la lectura.²¹

En las mediciones potenciométricas se utilizan dos electrodos: el **electrodo de referencia** que tiene potencial constante, de forma tal que cualquier cambio de potencial de la celda se deberá a la contribución del **electrodo de trabajo**. La medición del potencial de la celda se determina bajo condiciones reversibles en forma termodinámica y esto implica que se debe dejar pasar el tiempo suficiente para que la celda se equilibre y que sólo pueda extraer una corriente insignificante en el transcurso de la determinación.

El potencial de una celda se expresa de la siguiente forma:

$$E = (E_{\text{trabajo}} - E_{\text{referencia}}) + E_{\text{unión}} \quad \dots(1)$$

El potencial del electrodo de trabajo es sensible a las condiciones químicas de la disolución, el potencial del electrodo de referencia, como se mencionó anteriormente, es fijo e independiente de la disolución de la celda, finalmente el potencial de unión, es aquel de la interfase entre el electrolito dentro del compartimiento del electrodo de referencia y el analito. Así a 24 °C el potencial del electrodo de calomel saturado (ECS) es de 0,244 V y para el electrodo de Ag/AgCl es 0,199 V. Los potenciales de unión son particularmente pequeños porque dependen de la composición de las soluciones que intervienen, de manera que en presencia de un electrolito soporte (KCl ó NaNO₃) no habrá cambios

notables en el potencial conforme cambie la concentración de las especies electroquímicas activas que se encuentran mucho más diluidas.

II.4.3 CELDAS ELECTROQUÍMICAS

Una celda electroquímica es el dispositivo que consta de dos conductores eléctricos llamados electrodos, sumergidos en una disolución adecuada de electrolito con el fin de que circule una corriente eléctrica y así llevarse a cabo la reacción electroquímica. Si la reacción electroquímica ocurre de manera espontánea en los electrodos cuando estos se conectan externamente por un conductor se trata de una *celda galvánica*, por el contrario en la *celda electrolítica* se emplea la energía eléctrica externa para llevar a cabo reacciones químicas, es decir, se impone un voltaje más grande que el potencial reversible de la celda para que se lleve a cabo la reacción electroquímica.

La celda electrolítica más sencilla que permite controlar el potencial consta de dos electrodos introducidos en una disolución electrolítica (Figura 7a). El proceso electroquímico en estudio tiene lugar en el electrodo de trabajo, que puede ser el ánodo o el cátodo dependiendo del valor de potencial aplicado; éste electrodo está acoplado a un electrodo auxiliar que actúa a su vez como electrodo de referencia. Éste último se caracteriza por mantener un potencial constante, no sufrir cambios químicos entre cada experimento, ser estable con respecto al tiempo y temperatura, además de que su potencial no experimenta fuertes cambios cuando eventualmente una pequeña corriente eléctrica pasa por él. Sin embargo, a altas densidades de corriente aparece una sobretensión que no permite el empleo del electrodo auxiliar como electrodo de referencia, ya que la electrólisis que ocurre en él cambia su composición. Por esta razón y con objeto de que las medidas no sean alteradas por otros fenómenos se hace necesario el uso de un electrodo auxiliar (contraelectrodo), el cual tiene polaridad opuesta al electrodo de trabajo y además cierra el circuito eléctrico de la celda.

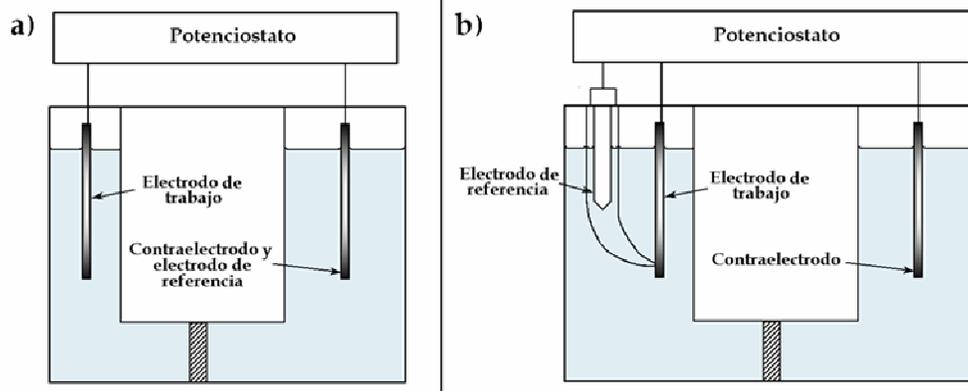


Figura 7. Celda electroquímica potencioestática, **a)** con un arreglo de dos electrodos y **b)** con un arreglo de tres electrodos.

En las celdas de tres electrodos (Figura 7b), éstos se conectan de tal manera que el electrodo de referencia se encuentra en un circuito de alta impedancia por lo que no deja pasar una cantidad apreciable de corriente, asegurando así la integridad y estabilidad del potencial medido.

II.4.4 LA REACCIÓN ELECTROQUÍMICA

La reacción electroquímica es el intercambio de electrones de un par redox a otro, por medio de conductores eléctricos. Estas reacciones ocurren en la interfase metal-disolución, habiendo un flujo electrónico unidireccional del ánodo al cátodo a medida que transcurre el tiempo, por ello las concentraciones de las especies participantes varían. De aquí que son reacciones fuera del equilibrio.

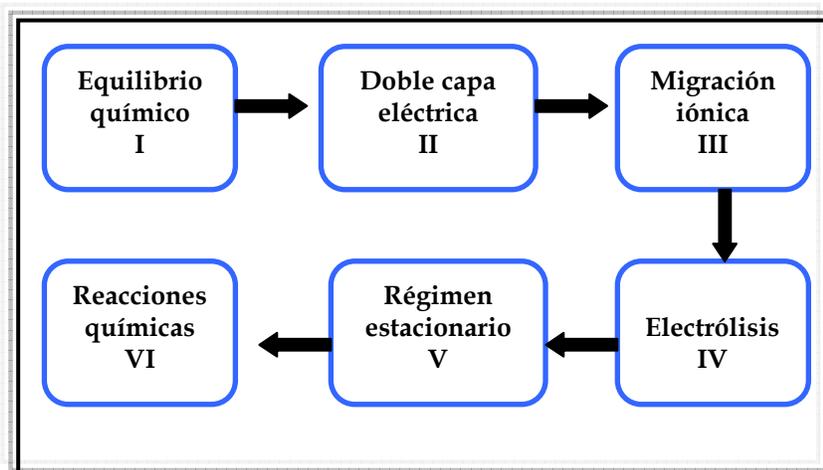


Figura 8. Etapas que describen el desarrollo de una reacción electroquímica.

Inicialmente la disolución está en equilibrio químico y la concentración del analito es la misma en toda la fase, al momento de introducir los electrodos y perturbar el sistema $I = 0$ no hay flujo espontáneo de electrones en las interfases. Al imponer un $E_i > E_{\text{equilibrio}}$, se crea un ΔE entre los electrodo de trabajo y auxiliar generando la migración de los iones en las interfases; si el E aumenta después de un tiempo determinado el $E_i \gg E_{\text{equilibrio}}$ y por ello hay suficiente energía en las interfases, lo que facilita la transferencia electrónica entre los iones y los electrodos (electrólisis), manifestándose en un aumento en la corriente. Éste aumento de corriente depende de la velocidad de difusión de las especies electroactivas (régimen de difusión pura), o si es el caso, de la convección generada por la agitación o goteo de mercurio. Finalmente se llevan a cabo las reacciones químicas de alguna de las especies que participan en la reacción electroquímica con alguna otra especie que forme parte del medio de reacción.

II.4.5 DOBLE CAPA ELÉCTRICA

Es en la doble capa eléctrica donde ocurre la transferencia de carga de los procesos electroquímicos, de ahí la importancia de su estudio. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos, éstos se polarizan acumulándose carga en su superficie, adicionalmente con la influencia del campo eléctrico, los iones de carga opuesta a la del electrodo polarizado son atraídos hacia éste formando una primera capa, conocida con el nombre de plano interno del Helmholtz (IHP), mientras que los iones de carga opuesta son repelidos formando el segundo plano de Helmholtz (OHP).

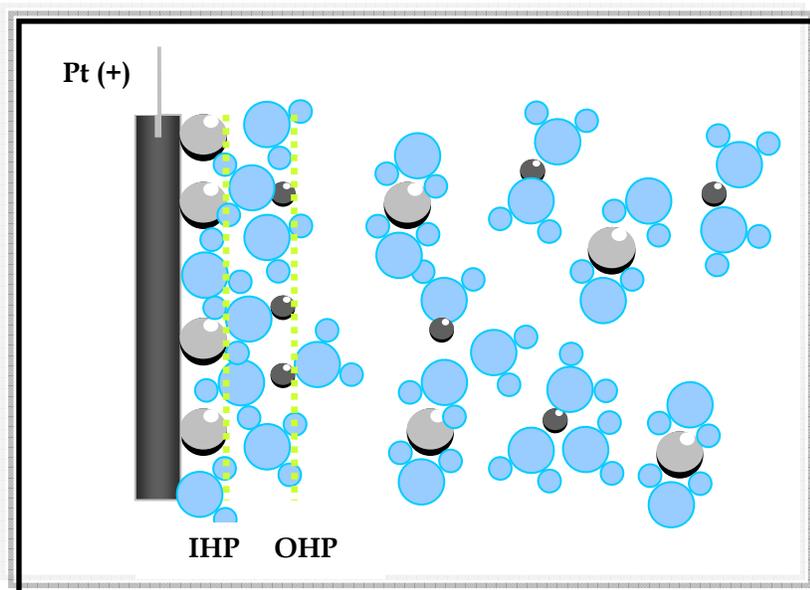


Figura 9. Representación esquemática de la doble capa eléctrica formada en la superficie de un electrodo como resultado de un potencial aplicado.

El conjunto de los dos planos se llama doble capa eléctrica, y supone la rigidez de los iones en la doble capa. El modelo de Bockris, Devanathan y Muller, involucra los dipolos del disolvente y los iones adsorbidos.

El fenómeno de la doble capa eléctrica puede explicar los resultados de algunos trabajos recientes de cristalización de proteínas bajo influencia de un

campo eléctrico externo, que muestran que cristales de lisozima, proteína con carga neta positiva al pH de trabajo se orientan hacia el cátodo.²² Esto se explica porque los procesos de adsorción se llevan a cabo en el plano externo de Helmholtz.

II.4.6 TRANSPORTE DE MASA

Todos los fenómenos electroquímicos involucran un fenómeno de transporte de masa dependiendo las condiciones en las que se realicen. Los modelos que los describen son los siguientes: la **difusión** es el movimiento espontáneo del analito debido a un gradiente de concentración, es decir la materia fluye de la región más concentrada a la de menor concentración, éste fenómeno es el que se manifiesta en la capa de la disolución más próxima al electrodo (capa de difusión). La **convección** implica el movimiento mecánico de la disolución como consecuencia de la agitación, vibración o medios térmicos. Por último en la **migración** el movimiento de los iones en la disolución es producido por un campo eléctrico establecido entre dos electrodos (ánodo y cátodo) al imponer una diferencia de potencial. En el caso particular de este estudio, este último resulta particularmente importante ya que al imponer una corriente donde no hay reacciones faradaicas, la única explicación de los fenómenos observados en la cristalización son la migración de las proteínas.

II.5 Biosensores

En general, un sensor es un dispositivo que detecta o mide una propiedad física y reconoce, indica o responde a la misma; se pueden clasificar en tres tipos (a) los sensores físicos que miden propiedades físicas como la distancia, masa, temperatura, presión, etc., (b) los sensores químicos los cuales están constituidos por sustancias orgánicas o inorgánicas y (c) los biosensores que utilizan como elemento sensor sustancias biológicas o bioquímicas tales como las enzimas, anticuerpos, células, hormonas, tejidos, microorganismos o ácidos nucleicos.

Como se muestra en la figura 10, todos estos dispositivos están conectados a un transductor, elemento interno sensible a la interacción analito- elemento sensor, que convierte los cambios observados a una señal medible.

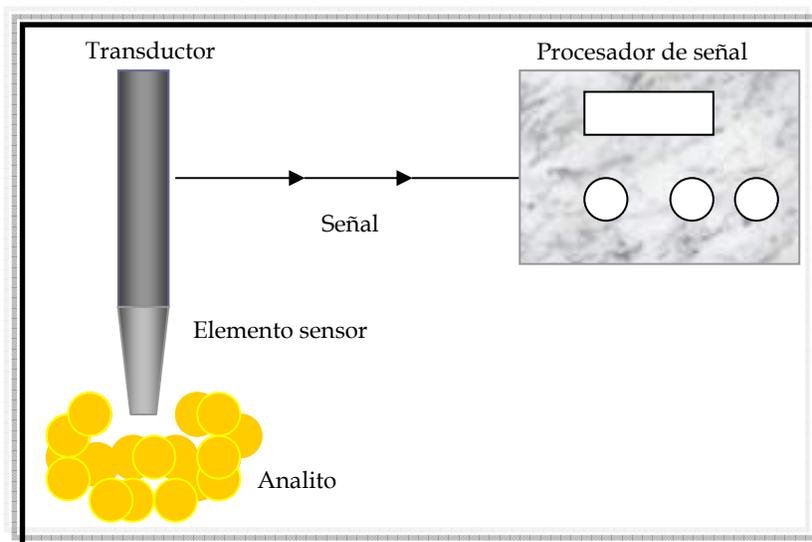


Figura. 10 Esquema de un biosensor mostrando las partes que lo integran

Un ejemplo claro de un biosensor natural es el sentido del olfato. La nariz es un receptor específico de moléculas extremadamente sensible; es decir puede distinguir entre una gran cantidad de compuestos químicos y además dar una idea general de *cantidad* hasta límites de detección muy bajos.²³

La función del biosensor depende del elemento sensor que se utilice; algunos de los atributos que reflejan un buen sistema de “**biosensaje**” son su estabilidad, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, capacidad para funcionar en soluciones ópticamente opacas, tiempo de análisis real y simplicidad de operación.²⁴

En la actualidad se ha desarrollado una amplia gama de biosensores tales como los biosensores microbianos, los cuales utilizan como elemento sensor células microbianas inmovilizadas. Éstos presentan grandes ventajas puesto que los microorganismos tienen una gran capacidad para adaptarse a condiciones adversas y desarrollar la habilidad para degradar nuevas moléculas con el tiempo.²⁵

Los biosensores enzimáticos utilizan enzimas purificadas como elemento sensor debido a su alta actividad específica. Además el límite de detección y la sensibilidad se pueden mejorar, modificando la constante de Michaelis (K_M) de la enzima.²⁶ Algunos de los retos que se presentan al trabajar con las enzimas es que éstas son caras además de ser inestables bajo un amplio intervalo de condiciones experimentales.

II.5.1 ELECTROQUÍMICA DE LOS BIOSENSORES

Los biosensores potenciométricos miden un cambio en el potencial de la interfase analito-elemento sensor con respecto al electrodo de referencia y el sistema de medida que requieren es un potenciómetro a corriente nula. En contraste, aquellos en los que se impone un potencial externo se conocen como biosensores amperométricos y necesitan un transductor extra para cerrar el circuito de corriente. El sistema de medida que utilizan es un amperímetro como sistema de medición y una fuente de poder para poder llevar a cabo la electrólisis.

El potencial de respuesta del biosensor potenciométrico se relaciona directamente con la actividad del analito e indirectamente con su concentración

molar, de ahí que la relación entre el potencial medido y la concentración del analito en ausencia de interferencias⁶, está derivada de la ecuación de Nernst

$$E = K + S \log[a_{ión}] \quad \dots(2)$$

donde E es la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y referencia, S es la pendiente que se determina experimentalmente, K es el potencial inicial de la medición y $a_{ión}$ es la actividad de la especie principal que depende de la concentración del analito y del coeficiente de actividad γ de la misma.

$$a_i = \gamma[ión] \quad \dots(3)$$

Considerando ahora que en la disolución además del analito de carga $z_{ión}$ existen otros iones que también contribuyen al potencial, entonces la ecuación 2 se modifica de la siguiente forma:

$$E = K + \frac{0.0592}{Z_{ión}} \log \left[a_{ión} + k_{Pot}^{ión,B} (a_B)^{Z_{ión}/Z_B} + k_{Pot}^{ión,C} (a_C)^{Z_{ión}/Z_C} + \dots \right] \quad \dots(4)$$

Las k_{pot} son los coeficientes de selectividad potenciométrica, que dependen de la concentración de la especie que interfiere. Pueden tomar valores pequeños cuando la concentración del analito sea dominante en comparación con las interferencias, y por el contrario cuando la el analito no sea el dominante, entonces los coeficientes de selectividad serán grandes. Un valor grande de k_{pot} indica que las especies correspondientes podrán interferir con la medición del ión primario y sería preferible su ausencia para tener una medición más exacta de potencial.

⁶ Las interferencias son el resto de los iones diferentes a la especie principal o analito que están presentes en la disolución y que contribuyen al potencial.

II.5.2 RESPUESTA ANALÍTICA DE LOS BIOSENSORES

En el diseño de un biosensor es de fundamental importancia el empleo de las curvas de calibración, pues es de aquí donde obtenemos el valor de la pendiente S y la constante K , además se puede conocer el intervalo de concentraciones para el cual se obtiene una respuesta lineal.

En la figura 11 se observan dos segmentos lineales, uno en el que el electrodo responde al analito, caracterizado por una pendiente de $0,0592/z_{ión}$ y un segmento horizontal en que el electrodo responde a la actividad de un ión interferente B (a_B).

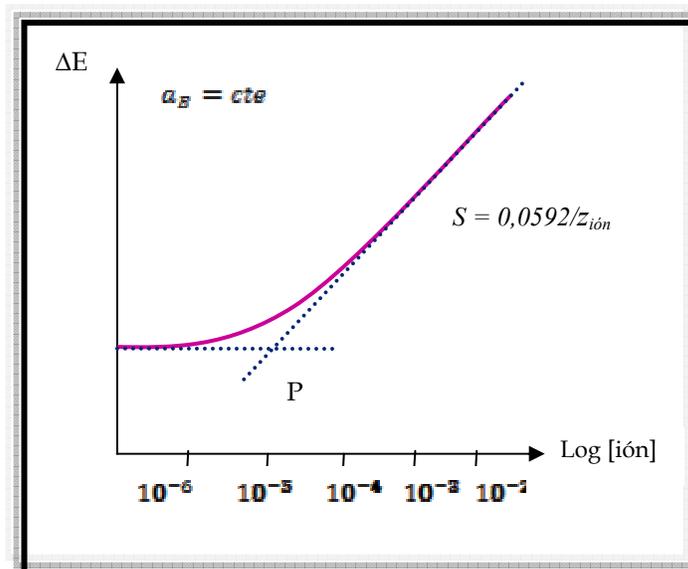


Figura 11. Gráfico que muestra el comportamiento del potencial de un electrodo selectivo en función de la concentración del analito, siendo el punto P el límite de detección.

De este gráfico, y utilizando la siguiente ecuación, es posible también determinar los coeficientes de selectividad potenciométricos (K_{pot}), puesto que al punto P se conoce la concentración tanto del analito como del ión interferente B, así como sus cargas eléctricas.

$$a_{ión} = k_{Pot}^{ión,B} (a_B)^{Z_{ión}/Z_B} \quad \dots(5)$$

Puesto que la ecuación 5 requiere de los valores de actividad, se debe recurrir a la ecuación 3, para calcular el valor de las actividades. Es importante señalar que el límite de detección es el punto P, puesto que la ecuación de Nernst ya no tiene sentido para concentraciones menores, por lo tanto el intervalo de linealidad está entre 10^{-5} y 10^{-1} M dependiendo del analito.

Un criterio de estabilidad para los biosensores es que el potencial de la celda no varíe más de ± 0.1 mV en 60 s.

II.6 Diseño de los biosensores

En años recientes el uso de los biosensores se ha incrementado para monitorear procesos biológicos y sintéticos, dando gran apertura al desarrollo de nuevas tecnologías de materiales y construcción para estos dispositivos. En el diseño de los biosensores se involucra la selección de los materiales (tamaño y forma). Además, los métodos de construcción dependen ampliamente del principio de operación del transductor, de los parámetros que serán detectados y de las condiciones experimentales.

Los materiales utilizados en el diseño de los biosensores se pueden agrupar de acuerdo a la función que realizarán como sigue: 1) materiales para el electrodo y soporte de la enzima, 2) materiales para la inmovilización de la enzima, 3) materiales para la fabricación de membranas y 4) elemento biológico (enzima).²⁷

El platino, oro, plata y carbón son los materiales más empleados como **electrodos y soporte del sustrato** debido a sus propiedades eléctricas y mecánicas. Estos materiales son químicamente inertes y proveen de un amplio intervalo de potenciales para el ánodo con bajas resistividades eléctricas.

Los materiales usados tradicionalmente para la **inmovilización de los elementos biológicos** son agentes multifuncionales, los cuales forman enlaces

entre la enzima y el transductor. Alternativamente los polímeros no conductores como la poliacrilamida y el polifenol se pueden utilizar para atrapar moléculas. Por otra parte los polímeros conductores orgánicos participan en la formación de un medio apropiado para la inmovilización, además la interacción con el electrodo metálico es muy fuerte, haciendo que conductividad eléctrica entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo sea más eficiente.

Los biosensores se cubren con **membranas** delgadas que tienen diversas funciones que incluyen el control de la difusión, la reducción de interferencias y la protección mecánica de la enzima. Algunos ejemplos de éstas membranas son el cloruro de polivinilo, nafión, polietileno, polimetacrilato y el poliuretano. Cuando los biosensores se utilizan en medios biológicos existen numerosos factores que afectan su desempeño, siendo el más importante la interacción de la superficie del sensor con el sustrato, pues la velocidad de transferencia electrónica del sitio activo a la superficie de la enzima, así como la de formación del complejo enzima-sustrato, dependen del arreglo espacial de la misma.²⁸ Los materiales como los hidrogeles favorecen la biocompatibilidad, pues las moléculas de agua se asocian con el polímero, dificultando que el sitio activo de la proteína se bloquee al adsorberse la proteína. Los factores involucrados en la mejora de la biocompatibilidad son la repulsión estérica, las atracciones de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas.²⁹

II.6.1 INMOVILIZACIÓN DE ELEMENTOS BIOLÓGICOS

La inmovilización, además de lograr la conexión entre el biomaterial y el soporte, brinda estabilidad al biosensor durante su utilización. Por ejemplo, los tiempos de vida típicos para el mismo biosensor pero con distinto método de inmovilización son:

Adsorción	1 día
Microencapsulación	1 semana
Atrapamiento físico	3-4 semanas
Unión covalente	4-14 meses

El requerimiento básico de un biosensor es que el material biológico debe conducir los cambios fisicoquímicos rápidamente al transductor, y para lograr exitosamente este requisito el componente biológico se une directamente al transductor mediante métodos de inmovilización como: la adsorción, la microencapsulación, el atrapamiento, la formación de enlaces cruzados, la unión covalente, entre otros, los cuales se representan esquemáticamente en la figura 12.

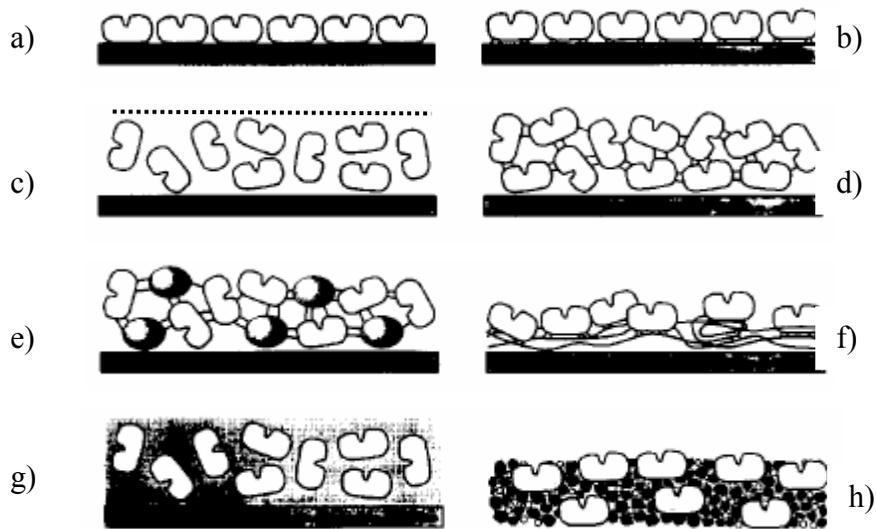


Figura 12. Interfases comunes en biosensores. Ejemplos de inmovilización de biomateriales sobre las superficies de los transductores. a) adsorción directa, b) unión covalente del sustrato; c) atrapamiento detrás de una membrana; d) enlace cruzado de moléculas biológicas; e) enlace cruzado utilizando adicionalmente moléculas largas; f) unión covalente con cadenas de polímeros; g) atrapamiento en gel y h) atrapamiento en un composite.³⁰

- **Adsorción.** Puede ser clasificada en 2 categorías dependiendo el mecanismo de unión: la *fisiadsorción* y la *quimiadsorción*. Las interacciones en la fisiadsorción son débiles y ocurren vía interacciones de van der Waals; ocasionalmente se incluye la formación de enlaces de hidrógeno. Por otro lado en la quimiadsorción hay formación de enlaces covalentes. El modelo de la isoterma de Langmuir es el más empleado para describir el proceso de adsorción.
- **Atrapamiento.** La enzima o material biológico queda atrapado en una matriz de gel. Los polímeros usados comúnmente son la poliacrilamida, nylon[®], agarosa y polipirrol. Algunos problemas que se presentan al trabajar con este método son: a) que la difusión del analito se inhibe parcialmente por la matriz de gel, consecuentemente el tiempo de respuesta es mayor, y b) la enzima pierde actividad catalítica a través de los poros del gel, puesto que su estructura cuaternaria sufre modificaciones conformacionales.
- **Enlace cruzado.** Se utiliza un agente bifuncional para unir el biomaterial al soporte sólido. Sin embargo en este proceso la enzima sufre daños estructurales, que llevan a la disminución en su actividad. Además la difusión del analito es limitada y se observa muy poca rigidez. El glutaraldehído y el 1,5-dinitro2,4-difluorobenceno son los materiales más empleados para estos fines.
- **Unión covalente.** Se utilizan moléculas con grupos funcionales nucleofílicos como NH₂, OH y SH para unir covalentemente la enzima al soporte (transductor o membrana). La ventaja particular de este método es que la enzima no se libera durante el uso.

- **Microencapsulación.** Una membrana inerte se utiliza para encerrar el biomaterial sobre el transductor. La ventaja que se presenta al microencapsular es que la membrana encierra la enzima evitando así su degradación instantánea y manteniendo su alta especificidad, ya que las membranas son estables a cambios de pH, fuerza iónica, temperatura y concentración del analito. Además limita la contaminación. Las membranas utilizadas más comúnmente son de acetato de celulosa, policarbonato (Nuclepore[®]), colágeno, politetrafluoroetileno (Teflón), nafión[®] y poliuretanos.

II.6.2 MEMBRANAS SELECTIVAS A IONES

Una membrana es un separador entre dos fluidos de diferente composición química que es selectivo en el transporte de especies (disolvente, soluto o iones) entre ellos.³¹ La característica principal que hace la diferencia entre las membranas es el proceso de transporte que ocurre en ella, de ahí que el proceso de separación se rige por la selectividad y por la velocidad del transporte. Por ello las membranas se agrupan como sigue:³²

- Membranas para microfiltración, ultrafiltración y osmosis reversa, en donde el transporte de masa se rige por una diferencia de presión.
- Membranas para diálisis, en donde hay difusión de especies a través de la membrana entre las dos soluciones, debido a una diferencia de concentración de las mismas.
- Membranas para electrólisis, electrodiálisis y dispositivos electroquímicos, en donde los iones migran a través de ella debido a una diferencia de potencial.

Las características de los procesos que rigen la naturaleza de las diferentes membranas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Las principales características y aplicaciones de membranas.

Proceso	Fuerza impulsora	Características de la membrana	Aplicaciones
Microfiltración	Diferencia de presión	Polímero con tamaño de poro uniforme 0.1-5 μm	Purificación de fármacos
Ultrafiltración	Diferencia de presión	Polímero con tamaño de poro uniforme 0.01-0.1 μm	Remoción de agua o trazas de aceite de emulsiones
Osmosis reversa	Diferencia de presión	Polímeros no porosos	Purificación de agua de soluciones salinas
Diálisis	Gradiente de concentración	Polímeros no porosos	Biotecnología
Electrodialisis/ Electrólisis	Diferencia de potencial aplicado 0.2-2 V	Polímero con grupos iónicos	Electrosíntesis y sensores.

En particular para este estudio utilizaremos membranas permeables a iones las cuales están designadas para dejar pasar cationes o aniones a través de ellas. Su velocidad se describe en términos de flujo iónico con unidades de $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo la carga eléctrica que pasa a través de una celda electroquímica se expresa como corriente I , con unidades de amperes ($1\text{A} = \text{C s}^{-1}$); además el flujo eléctrico es la densidad de corriente ($j = I/A$ donde A es el área de la membrana). La ley de Faraday relaciona el flujo iónico y eléctrico, y para cada ión i la densidad de corriente asociada con la migración de éste ión, j_i se relaciona con su flujo como sigue:

$$Flujo = \frac{J_i}{Fz_i} \quad \dots(6)$$

Donde F es la constante de Faraday z_i es la carga del ión transportado. Esta ecuación puede ser reescrita como sigue:

$$Flujo = \frac{\Delta \bar{E}}{FR_A z_i} \quad \dots(7)$$

Donde $\Delta \bar{E}$ es la diferencia de potencial de la gota a través de la membrana y \bar{R}_A es el área de resistencia (ohm m²), que es una propiedad de fabricación.

Las membranas son manufacturadas principalmente de dos clases de polímero:

- Estireno/ copolímeros de divinil-benceno, los cuales contienen grupos iónicos sustituidos en el anillo aromático; por otra parte cuando son copolímeros de divinil-piridina es el átomo de N el que sirve para fijar los grupos iónicos.
- Copolímeros de alquenos perfluorados con cadenas laterales que contienen grupos iónicos terminales.

Algunas propiedades importantes de membranas para el desarrollo de tecnología electroquímica son:

- Alta selectividad: en condiciones normales de operación de una membrana, la migración es el modo dominante de transporte de masa para iones. La selectividad de la membrana para transportar un ión particular se define en términos de número de transporte \bar{t}_+ . El número de transporte es la fracción del total de carga transportada a través de la membrana por un ión particular. Luego entonces para una membrana totalmente selectiva a cationes en donde sólo podrán migrar los cationes, el número de transporte de un catión es $\bar{t}_+ = 1$. Los valores típicos de número de transporte para las membranas comerciales son de 0.8 a 0.99.

- Alta velocidad de transporte – alta conductividad eléctrica: la velocidad de transporte de los iones a través de la membrana se relaciona con la densidad de corriente (Ecuación 6), que depende de la diferencia de potencial, la conductividad y el espesor de la membrana (Ecuación 7).
- Alta estabilidad. En muchas aplicaciones se requiere que las membranas sean estables por periodos aproximados a 1 año, a temperaturas de operación entre 0 y 80 °C, que sean resistentes a agentes oxidantes y reductores y en disoluciones concentradas de ácidos o bases, además que la abrasión superficial sea mínima.
- Mínima solubilidad.

II.6.2.1 NAFIÓN

El Nafión[®] es un copolímero sulfonado de tetrafluoroetileno. Fue el primero de una clase de polímeros sintéticos con propiedades iónicas que son resultado de incorporar grupos perfluoroetilén éter con grupos sulfónicos terminales sobre una superficie de Teflón.

Resultados de experimentos de microscopía de fuerza atómica muestran que la superficie de la membrana de nafión está compuesta de un dominio hidrofóbico que es el que más contribuye a la cadena polimérica, siendo su tamaño de 10-20 nm, y un dominio hidrofílico en el que se lleva a cabo la conducción de protones.³³

El modelo de agrupamiento de mallas iónicas propuesto por Gierke³⁴ para interpretar datos experimentales del nafion ha sido ampliamente aceptado (figura 13). Este modelo muestra una región acuosa conformada por agrupamientos

esféricos de iones de 4 nm de diámetro, que están distribuidos uniformemente interconectados por canales de 1 nm de diámetro.

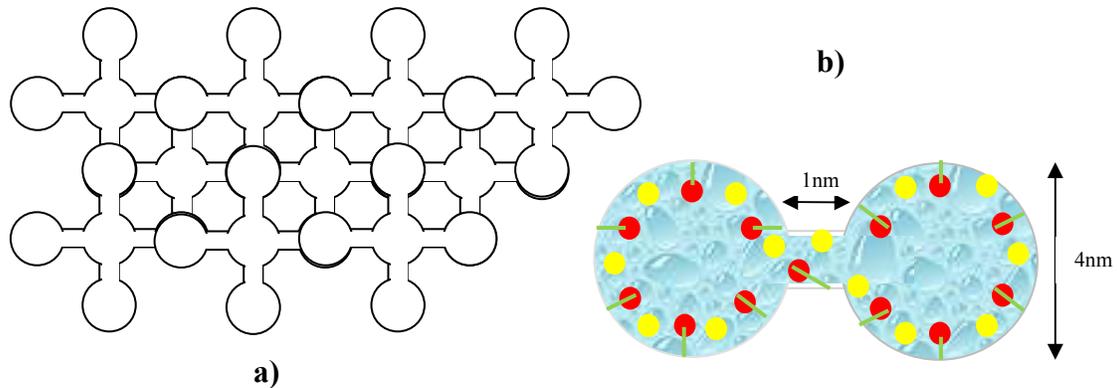


Figura 13. a) Esquema del modelo de agrupamiento de mallas iónicas de Gierke, b) representación del dominio hidrofílico, las circunferencias rojas representan los grupos sulfónicos $-\text{SO}_3^-$ y las amarillas los contraiones $-\text{Na}^+$, y finalmente las líneas verdes las cadenas laterales fluorocarbonadas.

Los agrupamientos iónicos son micelas invertidas con los grupos iónicos hacia dentro, los cuales rodean las moléculas de agua.

Análisis numéricos muestran que cada dominio tiene diferente actividad; es decir la conectividad establecida a través de los dominios en la membrana es diferente, por lo tanto no todas las regiones hidrofílicas conducen el mismo valor de corriente habiendo algunos dominios inactivos.

Son dos las presentaciones comerciales más comunes del nafion; NE-135 (película) y DE2020 (dispersión), ambas de DuPont. La película es una membrana de 1100 equivalentes en peso de polímero y de espesor de 88 μm y el DE2020 es una dispersión al 20% en peso en una mezcla agua/alcohol de 1000 equivalentes en peso del polímero.

La combinación de los monómeros de teflón con los grupos sulfónicos le proveen características muy particulares al nafion.

- Es permeable a cationes haciéndolo ideal para muchas aplicaciones.

- Posee alta resistencia a la degradación por agentes químicos, pues de acuerdo a DuPont sólo metales alcalinos (particularmente sodio) puede degradar al nafion a temperatura y presión ambiente.
- Su intervalo de operación se ajusta a temperaturas no mayores a 190 °C.
- Se comporta como ácido $pK_a \approx -6$.

² **Grossowicz N. and Ariel M.**, Methods for determination of lysozyme activity, *Methods of Biochemical Analysis*, (1983) **29**, 435-436.

³ **Masschalck B. and Michaelis C. W.**, Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria, *Critical Reviews in Microbiology*, (2003) **29**(3), 191-214.

⁴ **Smith L. J., Sutcliffe M. J. and Redfile C.**, Structure of hen lysozyme in solution, *Journal of Molecular Biology*, (1993) **229**, 930-944.

⁶ **Vocadlo J. D., Davies G., Laine R. and Withers G.**, Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via covalent intermediate, *Nature*, (2001) **412**, 835-838

⁷ **Kurita K.**, Chitin and chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans, *Marine Biotechnology*, (2006) **8** 203-226

⁸ **Rinaudo M.**, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, (2006) **31**, 603-632

-
- ⁹ **Amano K., Ito E.**, The Action of Lysozyme on Partially Deacetylated Chitin, *European Journal of Biochemistry*, (1978) **85**, 97-104
- ¹⁰ **Grases F., Costa A. and Söhnel O.**, *Cristalización en disolución*,. Conceptos básicos, Editorial Reverté, Barcelona España, 2000, 7-60
- ¹¹ **Moreno A., Bolaños V. and Mas J.**, *De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas*, Editorial. JGH Editores, S. A. de C.V., México D.F., (2000), 1-39
- ¹² **Kadri A., Damak M., Lorber B., Giegé R., and Jenner G.**, Pressure versus pH phase diagrams of two lysozymes crystallized in agarose gel, *High Pressure Research*, (2003) **23**, 485-491
- ¹³ **Astier J. P., Veessler S. and Boistelle R.**, Protein crystals orientation in a magnetic field, *Acta Crystallographica*, (1998) **D54**, 703-706
- ¹⁴ **Yin D., Wakayama N. I., Wada H. and Huang W.**, Significant effects of magnetic and gravitational fields on the morphology of protein crystals (orthorhombic lysozyme crystals grown using NiCl₂ as crystallization agent), *Journal of Physical Chemistry*, (2003) **B107** 14140-14144. -
- ¹⁵ **Sazaki G., Moreno A. and Nakajima K.**, Novel coupling effects of the magnetic and electric fields on protein crystallization, *Journal of Crystal Growth*, (2004) **262**, 499-502.
- ¹⁶ **Kocherbitov V., Arnebrant T. and Söderman O.**, Lysozyme – Water Interactions Studied by Sorption Calorimetry, *Journal of Physical Chemistry*, (2004) **108**, 19036-19042.
- ¹⁷ **Rosenberger F.**, Protein crystallization, *Journal of Crystal Growth*, (1996) **166**, 40-54.

-
- ¹⁸ **Tanford C. and Wagner M. L.**, Hydrogen ion equilibrium of lysozyme, *Journal of American Chemical Society*, (1954) **76**, 3331.
- ¹⁹ **Fredericks W. J., Hammonds M. C., Howard S. B. and Rosenberger F.**, Density, thermal expansivity, viscosity and refractive index of lysozyme solutions at crystal growth concentrations, *Journal of Crystal Growth* (1994) **141**, 183.
- ²⁰ **Dubin S. B., Clarck N. A. and Benedek G. B.**, Measurement of the rotational diffusion coefficient of lysozyme by depolarized light scattering: configuration of lysozyme in solution, *Journal of Chemical Physics.*, (1971) **54**, 5158.
- ²¹ **Vassos B. H. and Ewing G. W.**, *Electroquímica analítica*, Editorial Limusa, México (1987), 13-25 y 55-78.
- ²² **Nieto M. E., Frontana U. B., Sasaki G. and Moreno A.**, Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes: effect of the potential control, *Journal of Crystal Growth* (2005) **275**, 1437-1446.
- ²³ **Eggins Brian R.**, *Chemical sensors and biosensors*, John Wiley & sons, Northern Ireland, UK, (2003),. 1-27 y 69-124
- ²⁴ **D'Souza S.F.**, Surface immobilization of food relevant microbial cell through adhesion, *Food Biotechnology*, (1990) **4**, 373-382.
- ²⁵ **D'Souza S. F.**, Microbial biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, (2001) **16**, 337-353.
- ²⁶ **Lai K., Grimsley J. K., Kuhlmann B. D., Scxapozza L., Harvey S., DeFrank J., Kolakowsky J. and Wild J.**, Rational enzyme design: computer modelling and site-direct mutagenesis for the modification of catalytic specificity in

organophosphorus hydrolase, *International Journal for Chemistry*, (1996) **50**, 430-431.

²⁷ **Zhang S., Wright G. and Yang Y.**, Materials and techniques for electrochemical biosensors design and construction, *Biosensors and Bioelectronics*, (2000)**15**, 273-282.

²⁸ **Alvarez I. M., Kalisz M. H., Hecht H. J., Aumann K. D., Schomburg D. and Schmid R.**, The design of enzyme sensors based on the enzyme structure, *Biosensors and Bioelectronics*, (1995) **10**, 735-742.

²⁹ **Donald L. and Jeffrey A. H.**, Surface treatment of polymers for biocompatibility, *Annual Review of Materials Research*, (1996) **116**, 2225-2226.

³⁰ **Göpel W. and Heiduschka P.**, Interface analysis in biosensors design, *Biosensors and Bioelectronics*, (1995) **10**, 853-883.

³¹ **Davis A., Genders J. D. and Pletcher D** *A first course in Ion permeable membranes*, The electrochemical Consultancy, England (1997), 1-31.

³² **Gill A., Lillie G., Farance G. and Vadgama P.**, Biocompatible interfaces for biosensors, *Intern. Journal of Environmental Analytical Chemistry*, (2005) **85**, 699-725.

³³ **Takimoto N., Ohira A., Takeoka Y. and Rikukawa M.**, Surface morphology and proton conduction imaging of nafion membrane, *Chemistry Letters* (2008) **37**, 164-165.

³⁴ **Gierke T. D. and Hsu Y.**, In Perfluorinated ionomer membranes, ACS Symposium series **180**, ed. by A. Eisenberg, L. Yeager, *American Chemical Society*, Washington, DC. (1982), 283-284.

III. Planteamiento del problema

Considerando los resultados logrados por el grupo en la cristalización de proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico interno,^{1,2} en esta tesis se propone sistematizar la metodología empleada para que cristales de lisozima con actividad hidrolítica se adsorban sobre toda la superficie de un electrodo de platino, el cual podría actuar como biosensor. Esta hipótesis se basa en que el biosensor presentará una gran selectividad característica de la proteína y que además ésta se encuentra con un alto grado de pureza y ordenamiento en la red cristalina.

Se eligió desarrollar ésta posibilidad con la lisozima de huevo blanco de gallina puesto que:

- La lisozima presenta actividad catalítica, al hidrolizar específicamente enlaces glucosídicos, los cuales forman parte de la estructura de la pared celular de las bacterias Gram (+).
- La lisozima es una proteína pequeña que carece de cofactores y centros metálicos, lo que hace sea considerada una proteína modelo para el estudio de propiedades de otras proteínas más complejas en estructura³, por lo tanto las nuevas metodologías desarrolladas en este proyecto intentarán extrapolarse a otras proteínas.
- Resultados de estudios previos de cristalización de lisozima muestran que bajo ciertas condiciones experimentales ocasionalmente hay adsorción de algunos cristales sobre los electrodos de platino, por ello la búsqueda de las nuevas condiciones experimentales para lograr el recubrimiento total estará limitado a un pequeño intervalo de variaciones.

- La disponibilidad de la lisozima en el laboratorio de trabajo es buena, además de que se cuenta con el equipo necesario para llevar a cabo los experimentos pertinentes.

Una parte de este proyecto se enfocará en la búsqueda de materiales para el diseño del biosensor, intentando hacer la selección más viable de acuerdo a las condiciones experimentales utilizadas, recursos disponibles y tiempo de experimentación.

¹ **Nieto Mendoza E.** Tesis de maestría en ciencias químicas, *Investigación sobre el fenómeno de electromigración en la cristalización de proteínas, usando celdas de crecimiento de cristales con múltiples electrodos*, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, 2005.

² **Mirkin Brill N.** Tesis de doctorado en Ciencias Químicas, *Cristalización de proteínas en presencia de un campo eléctrico interno; diseño y estudios cristalográficos de sensores biológicos*, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, 2005

³ **Chayen N. and Saridakis E.**, Is lysozyme really the ideal model protein?, *Journal of Crystal Growth*, (2001) **232**, 262-264.

IV. Hipótesis

Al encontrar las condiciones experimentales óptimas de cristalización para la lisozima que permitan obtener un recubrimiento policristalino uniforme sobre el electrodo de platino, éste podrá utilizarse para diseñar un biosensor potenciométrico con gran selectividad, puesto que los cristales son estructuras ordenadas y de alta pureza y la lisozima posee gran especificidad.

V. Objetivos

Cristalización

- Diseñar y construir celdas electroquímicas que posean como características: pequeña capacidad volumétrica, fáciles de manipular y bajo costo de los materiales utilizados para su construcción.
- Encontrar las condiciones experimentales de cristalización para la lisozima que permitan obtener un recubrimiento total del electrodo de platino.
- Hacer reproducible el método de cristalización de la lisozima asistido con un campo eléctrico interno y utilizarlo como método de inmovilización en el diseño del biosensor.

Diseño del biosensor

- Esbozar la cinética de disolución del recubrimiento cristalino de lisozima.
- Utilizar el Nafión como membrana externa para recubrir la lisozima en el biosensor.
- Monitorear la respuesta analítica de un primer modelo de biosensor potenciométrico.

VI. Parte experimental

V.1 Instrumentación

- Los experimentos de corriente controlada se realizaron en un Galvanostato VIMAR modelo FCC-17, el cual puede imponer corrientes dentro de un intervalo de 0.0002 μA a 10 mA. (Figura 14-1) Se utilizaron la celda y los electrodos que serán descritos posteriormente, en la preparación de las celdas de cristalización.
- La temperatura se controló empleando una placa hueca de metal construida *ad hoc* acoplada a un recirculador de temperatura constante marca Cole Parmer modelo Polystat por el que circula agua (Figura 14-2).

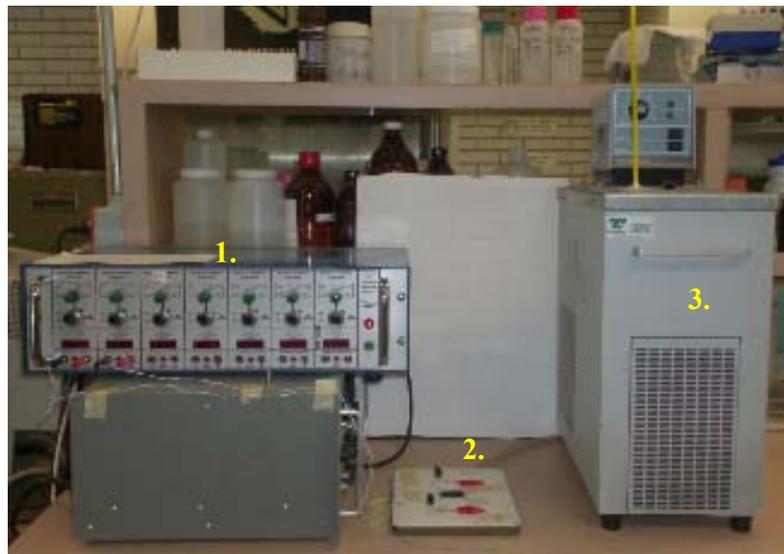


Figura 14. Montaje del equipo empleado en la imposición de corriente en las celdas de cristalización. Galvanostato VIMAR (1), los cables están conectados a los electrodos de la celda de cristalización hueca (2), a través de la cual pasa agua proveniente del recirculador Cole Parmer (3).

- Las fotografías se obtuvieron por medio de un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SV11 adaptado a una cámara digital, usando el programa Axion Vision de Zeiss Co.



Figura 15. Microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SV11 adaptado a una cámara digital.

- En la caracterización analítica del biosensor se utilizó un pHmetro Thermo Orion, modelo 420, trabajando en modo potenciométrico.

V.2 Materiales y metodologías

CRISTALIZACIÓN

V.2.1 CONSTRUCCIÓN DE CELDAS ELECTROQUÍMICAS

Basándonos en el modelo de celdas *ad hoc* propuesto por Moreno y Sazakiⁱ se diseñaron dos prototipos de celdas de cristalización con ciertas modificaciones (Figura 16). El prototipo A una celda rectangular de 2.5 mm X 13 mm y 1mm y, el prototipo B es una celda cuadrada de 25 mm por lado y 1 mm de espesor, ambas fueron construidas con portaobjetos de vidrio separados por una base cuadrada de 1 mm de grosor de poliestireno y selladas con resinas epóxicas. Los electrodos utilizados fueron trozos de alambre de platino (0.2 mm de diámetro Alfa AESAR) que se colocaron en una disposición de 180° a la mitad de los lados de dichos paralelogramos, al quedar entre la base de plástico y el vidrio.

La longitud de los electrodos dentro de la celda de cristalización es de 5 mm, lo que equivale a un área aproximada $6.4 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$.

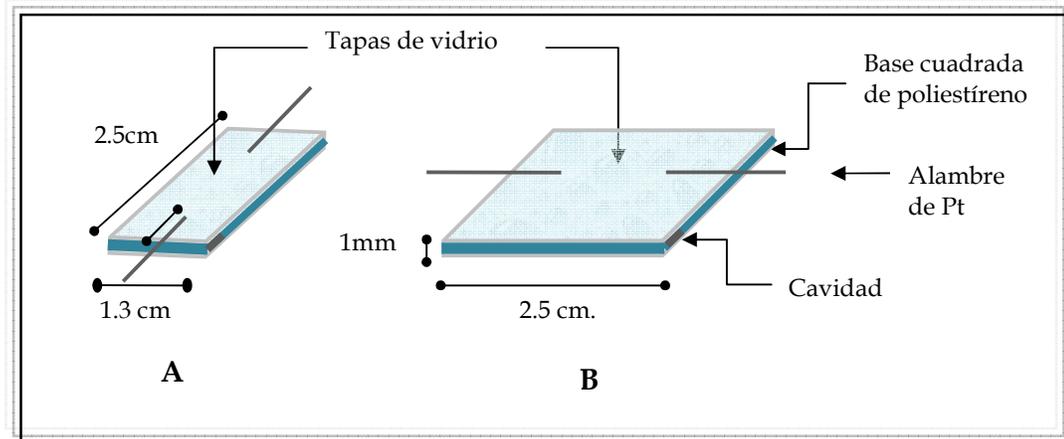


Figura 16. Prototipos de celdas de cristalización para la imposición de corriente. El A corresponde a una celda rectangular con capacidad de 150 μL ; el prototipo B es una celda cuadrada con capacidad de 500 μL .

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

V.2.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE TRABAJO

El método batch será empleado en este trabajo y consiste en mezclar todos los componentes de la cristalización (la proteína y el agente precipitante previamente disueltos en la disolución amortiguadora) en condiciones de metaestabilidad¹⁶, para posteriormente colocarlos sobre una placa metálica de temperatura conocida y obtener los cristales.

- **Disolvente:**

Disolución amortiguadora de acetatos (0.2 M) a pH 4.5: Para preparar 100 mL de esta disolución, se requiere disolver 2.72 g de acetato de sodio trihidratado ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$) (Sigma S-9513) en un volumen menor a 100 mL de agua destilada. Posteriormente mientras se mide el pH, se agrega gota a gota el ácido acético ($C_2H_4O_2$) (Sigma A-6283) hasta ajustar el pH deseado. Una vez obtenido este pH, se lleva al aforo de 100 mL con agua destilada. Finalmente se hace pasar la disolución a través de un filtro de celulosa (0.2 μ m).

- **Proteína:**

Lisozima 60 mg/mL: Para preparar medio mililitro de disolución, se pesan 30 mg de lisozima (Seikagaku Co. Código 100940 seis veces recristalizada por los laboratorios Seikagaku Corporation) y se disuelve en la disolución amortiguadora de acetatos a temperatura ambiente, agitando manualmente.

- **Agente precipitante:**

NaCl 80 mg/mL: Se prepara el mismo volumen que de proteína, pesándose 40 mg de NaCl (99.99% Aldrich), que se disuelven en la disolución amortiguadora de acetatos.

V.2.3 CRISTALIZACIÓN A CORRIENTE CONTROLADA

Partiendo de las condiciones experimentales de cristalización de la lisozima reportadas por algunos autores,^{15,4} se buscará encontrar aquellas que permitan obtener cristales adsorbidos en los electrodos de platino que conducen la corriente eléctrica a través de la celda de cristalización; para ello emplearemos

el procedimiento que se utilizó para explorar el efecto del campo eléctrico en la cristalización.^{2, 27, 40}

Las condiciones de cristalización de la lisozima reportadas son: [lisozima] = 30 mg/mL (3% w/v), [NaCl] = 40 mg/mL (4% w/v) en disolución amortiguadora de acetatos a pH 4.5.

Dependiendo del prototipo de celda utilizado en la cristalización, el volumen final de la mezcla batch es diferente (150 μ l para la celda A y 500 μ L para la B), sin embargo, independientemente de la celda utilizada, al mezclar volúmenes iguales de disolución de proteína y agente precipitante se obtienen concentraciones finales de 30 mg/mL de lisozima y 40 mg/mL de NaCl, que corresponden a las concentraciones reportadas.

Para el control de la temperatura, las celdas de cristalización se colocaron encima de una placa metálica hueca de temperatura controlada. En cada experimento de cristalización se prepararon 2 celdas iguales, una de éstas, la de trabajo, se conectaba al galvanostato y la otra, la control, no. Esto es con el fin de observar los efectos del campo eléctrico interno en el proceso de cristalización.

Mediante el galvanostato VIMAR (modelo FCC-17) se impusieron los distintos valores de corriente eléctrica que pasaron a través de la celda de cristalización por medio de los electrodos de platino.

Al finalizar cada experimento de cristalización, se observaron los cristales en el microscopio estereoscópico.

DISEÑO DEL BIOSENSOR

V.2.4 RECUBRIMIENTO DEL ELECTRODO CON NAFIÓN.

Una vez teniendo el alambre de platino recubierto con cristales de lisozima, se utilizó la dispersión de nafion (resina al 20% m/m en una mezcla de alcoholes alifáticos de cadena corta y agua) (Sigma 527122) para hacer un segundo recubrimiento que retardara la disolución de los cristales de lisozima al exponerse en disoluciones; para ello, se evaporó parcialmente el disolvente de la dispersión del nafion y una vez frío se aplicó sobre el recubrimiento con ayuda de un jeringa, posteriormente se dejó secar durante 20 minutos. Finalmente se observaba una fina película transparente que recubría los cristales adsorbidos en el electrodo de platino.

V.2.5 ATRAPAMIENTO EN UNA MATRIZ DE GEL DE AGAROSA

El gel de agarosa (Sigma A-4679) de concentración 0.066% w/v, se preparó disolviendo 6.6 mg de agarosa en 10 mL de disolución amortiguadora de acetatos a baño María y con agitación constante, posteriormente se vació 1 mL de éste a un vial vacío.

Al momento en que la temperatura del gel en el vial era aproximadamente de 25 °C su viscosidad era apropiada para introducir cuidadosamente el electrodo con recubrimiento policristalino, así entonces, después de algunos minutos la viscosidad disminuía y los cristales quedaban atrapados en la matriz de gel.

Para los ensayos en que se utilizó el sustrato de la lisozima, se prepararon por separado las disoluciones cuyas concentraciones son el doble de las deseadas, es decir se disolvieron 13.3 mg de agarosa en 10 mL de disolución amortiguadora de acetatos (disolviendo en baño María y con agitación), y 4 mg de N,N-triacetil-quitotriosa (Sigma 523682) en 1 mL de disolución

amortiguadora de acetatos. Posteriormente se toma 0.5 mL de cada disolución y se mezclan cuidadosamente, la disolución final se coloca en el vial y antes de que ésta gelatinice completamente se introduce el electrodo recubierto.

V.2.6 ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR

Los ensayos de estabilidad del biosensor se hicieron en agua destilada, en disolución amortiguadora de acetatos pH = 4.5 y en gel de agarosa. Las mediciones de diferencia de potencial como función del tiempo se hicieron en un pH metro en modo de potenciometría, utilizando un alambre de plata como electrodo de referencia. Este monitoreo se realizó dejando el alambre recubierto hasta que éste alcanzó estabilidad, es decir, el potencial se mantenía constante. El intervalo de tiempo de lectura de datos de potencial varió desde los 10 segundos hasta 5 minutos.

ⁱ **Moreno A. and Sazaki G.**, The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme, *Journal of Crystal Growth* (2004) **264**, 438–444.

VII Resultados y discusión

VI.1 Cristalización a corriente controlada; discriminación entre celda Tipo A y Tipo B.

Las condiciones experimentales iniciales que se emplearon se basaron en experimentos anteriores⁴⁷ que tenían el objetivo de observar las implicaciones de la variable eléctrica en la cristalización de la lisozima, específicamente en la nucleación.

Tabla 2. Condiciones experimentales de cristalización de la lisozima de huevo blanco de gallina, utilizadas para explorar la variable eléctrica en la nucleación de la proteína.²

Proteína	Lisozima	30 mg/mL
Agente precipitante	NaCl	40 mg/MI
Disolución amortiguadora de pH	HAcOH/NaAcO	200 mM pH = 4.5
Temperatura	18 ° C	
Intensidad de corriente	2 μ A	

En este estudio nos interesó más el depósito de lisozima sobre el electrodo de platino, así que inicialmente se procedió a probar los dos tipos de celda A y B en la cristalización de la lisozima con el fin de conocer las ventajas y desventajas que ofrecen cada una de ellas en el depósito de proteína.

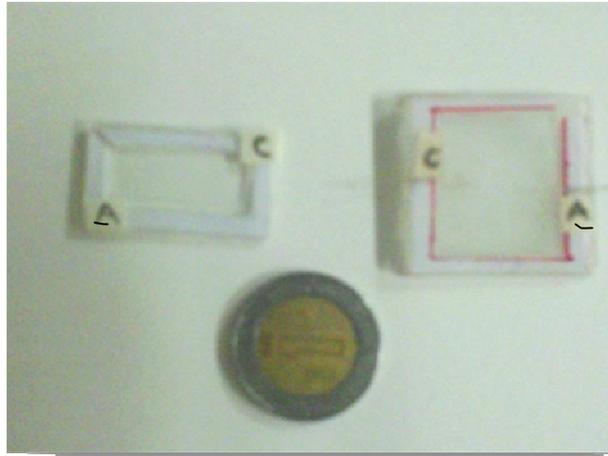


Figura 17. Celdas de cristalización construidas con materiales de bajo costo. Las letras C y A indican cátodo y ánodo respectivamente.

Los primeros resultados muestran algunas diferencias en cuanto a la calidad de los cristales crecidos en la celda A y B, como se muestra en la figura 18. La celda tipo B muestra cristales con tamaño cercano a los 200 μm mientras que la celda tipo A muestra cristales de tamaño mucho menor, mostrando en la mayoría de los experimentos zonas de precipitación.

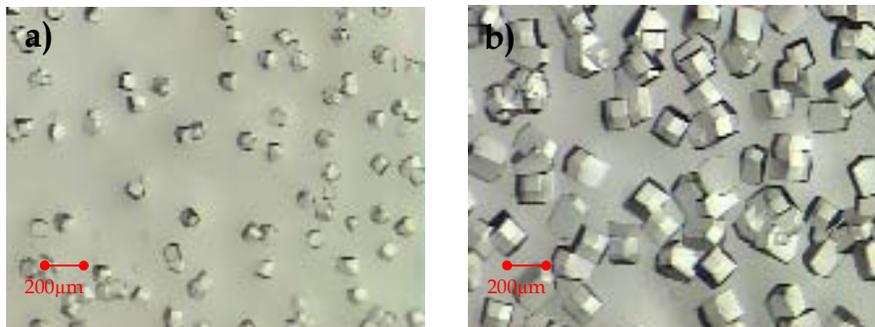


Figura 18. Comparación entre la cantidad y tamaño de los cristales de lisozima crecidos en 2 tipos de celdas. a) Celda tipo A y b) Celda tipo B.

En ninguno de los casos anteriores se mostró crecimiento de cristales sobre alguno de los electrodos, sin embargo se observó una preferencia de cristalización por la zona cercana al cátodo en ambos casos.

Durante la cristalización de la proteína asistida electroquímicamente se llevan a cabo reacciones electroquímicas que dan lugar a la formación de H₂ y O₂ en el cátodo y ánodo respectivamente. Debido que estos gases se alojan dentro de la celda electroquímica en zonas circundantes a los electrodos, esto desfavorece la formación de cristales en la superficie de los electrodos. Estas reacciones electroquímicas parásitas se describen en la figura 19.

Reacciones de reducción		E° (V)
$2 \text{H}_3\text{O}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow$	$\text{H}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	0
$\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow$	H_2O_2	0.68
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow$	$2\text{H}_2\text{O}$	1.77
Reacciones de oxidación		E° (V)
$2 \text{H}_2\text{O} - 4\text{e}^- \longrightarrow$	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+$	-1.22
$\text{Pt} + 2\text{H}_2\text{O} - 2\text{e}^- \longrightarrow$	$\text{Pt}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+$	-0.98
$2\text{Cl}^- - 2\text{e}^- \longrightarrow$	Cl_2	-1.35

Figura 19. Posibles reacciones electroquímicas que se llevan a cabo en la barrera anódica y catódica respectivamente.¹ La oxidación del platino ($\text{Pt} + 2\text{H}_2\text{O} - 2\text{e}^- \rightarrow \text{Pt}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+$) es una reacción termodinámicamente posible ($E^\circ = -0.98 \text{ V}$), pero que no ocurre debido a su cinética.⁴⁹

Este fenómeno es más marcado en la celda rectangular (tipo A) debido a su menor tamaño las burbujas de H₂ y O₂ ocupan la mayor parte de su capacidad y por lo tanto la formación de cristales no se lleva a cabo. Por lo antes expuesto la celda que se utilizó para el resto de los experimentos fue la celda cuadrada de 500 μL, tipo B.

Al imponer una corriente eléctrica directa dentro de una celda electroquímica se presenta el fenómeno de electromigración, que es el principal tipo de transporte de masa responsable de la formación de cristales con mayor velocidad que cuando se trabaja en difusión pura. Debido a que la electromigración afecta únicamente a sustancias en forma de iones y a

aquellas que su número de transporte no es pequeño, se procedió a modificar algunos parámetros experimentales tales como la concentración de los iones de lisozima, la concentración de los iones de agente precipitante y la intensidad de corriente eléctrica impuesta para observar si alguna de estas modificaciones lleva a un recubrimiento cristalino que hasta ahora no había sido observado.

VI.2 Búsqueda de las condiciones óptimas para recubrir el electrodo de platino con depósito policristalino de lisozima

Variación de la concentración de Lisozima

Se probaron tres concentraciones diferentes de proteína manteniéndose constantes el resto de las variables.

Tabla 3. Condiciones experimentales utilizadas para la cristalización de Lisozima.	
[Lisozima]	20, 30 y 40 mg/mL
[NaCl]	40 mg/mL
pH	4.5
I	2 μ A
Temperatura	18 °C
Tiempo de experimento	24 h.
Celda	B

Como se puede observar en la figura 20, a medida que aumentamos la concentración de proteína se observa un mayor número de cristales depositados en el cátodo de la celda. Sin embargo, al utilizar concentraciones mayores de 40 mg/mL de proteína se llega a la precipitación sin observarse algún cristal depositado en la superficie del electrodo

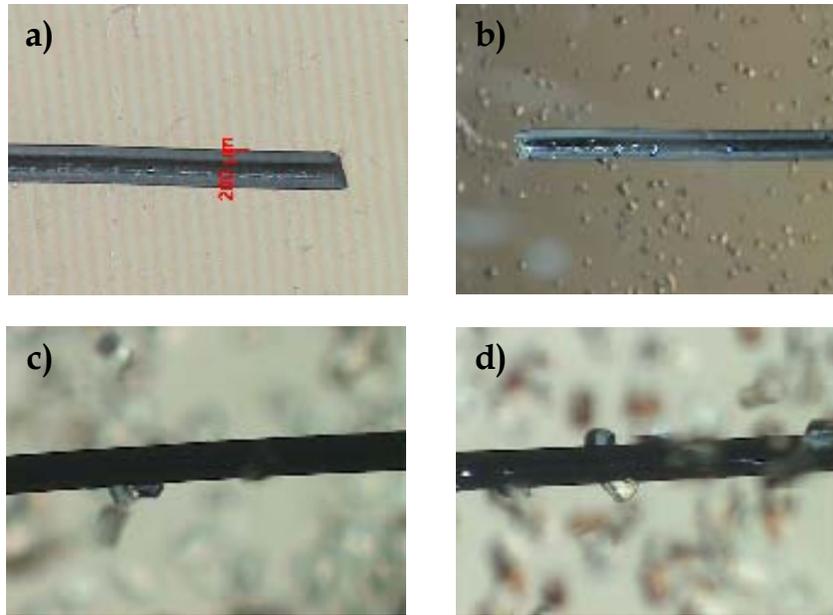


Figura 20. Fotografías tomadas con el microscopio utilizando el objetivo 2.5X. La imagen a) muestra el grosor del alambre de platino que se utilizó para fabricar todos los electrodos de las celdas electroquímicas, su diámetro es de 200 μm , las siguientes imágenes muestran el cátodo de 3 celdas electroquímicas con diferentes concentraciones de lisozima; b) 20 mg/mL de proteína, c) 30 mg/mL de lisozima y d) 40 mg/mL de proteína.

Una característica en la cristalización de la lisozima con imposición de campo eléctrico interno que se observó desde los primeros experimentos consiste en que los cristales crecen preferentemente en zonas cercanas al cátodo y sobre él, como se muestra en la figura 21.

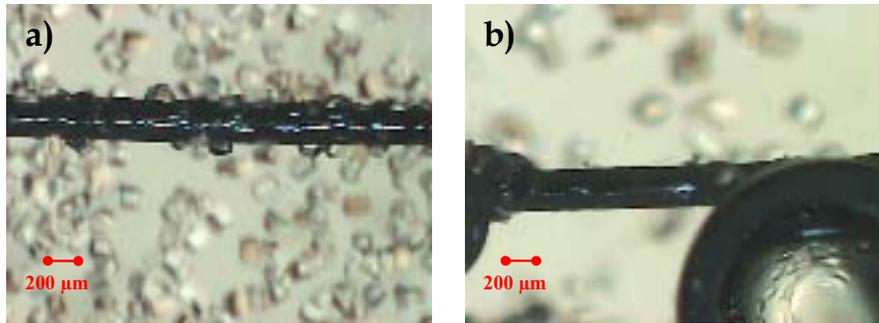


Figura 21. Electrodo de una misma celda después de 24h de cristalización, a) cátodo con depósitos cristalinos en su superficie, b) ánodo sin algún cristal de proteína sobre él.

Esta preferencia por la zona de cristalización se explica a partir del modelo de la doble capa eléctrica y a la electromigración favorecida por la imposición de corriente eléctrica dentro de la celda. Además de que al pH de trabajo 4.5 la lisozima, a pesar de ser una molécula grande, tiene una carga neta de 10+ y por lo tanto su movilidad iónica no es despreciable,² por lo que ésta migra hacia el cátodo. No obstante su desplazamiento es lento, comparado con los demás iones presentes de mayor movilidad, por lo que la lisozima se transportará hacia el cátodo de una manera no convectiva, favoreciendo la cristalización cerca del cátodo en un menor tiempo gracias a este flujo de proteínas constante pero controlado.

Variación de la concentración del agente precipitante: NaCl

Las condiciones experimentales empleadas en estos experimentos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones experimentales utilizadas para la cristalización de Lisozima.	
[Lisozima]	30 mg/mL
[NaCl]	30, 40, 45 y 50 mg/mL
pH	4.5
I	2 μ A
Temperatura	18 °C
Duración del experimento	24 h.
Celda	B

La siguiente figura muestra que cuando la concentración de NaCl es de 30 mg/mL no hay crecimiento de cristales sobre el electrodo, además el tamaño de aquellos que crecieron cerca del cátodo es mínimo. En comparación con los obtenidos en los experimentos con 40 y 45 mg/mL, por otro lado cuando la concentración fue de 50 mg/mL de NaCl se observó precipitación casi instantánea impidiendo la formación de cristales en alguna zona de la celda.

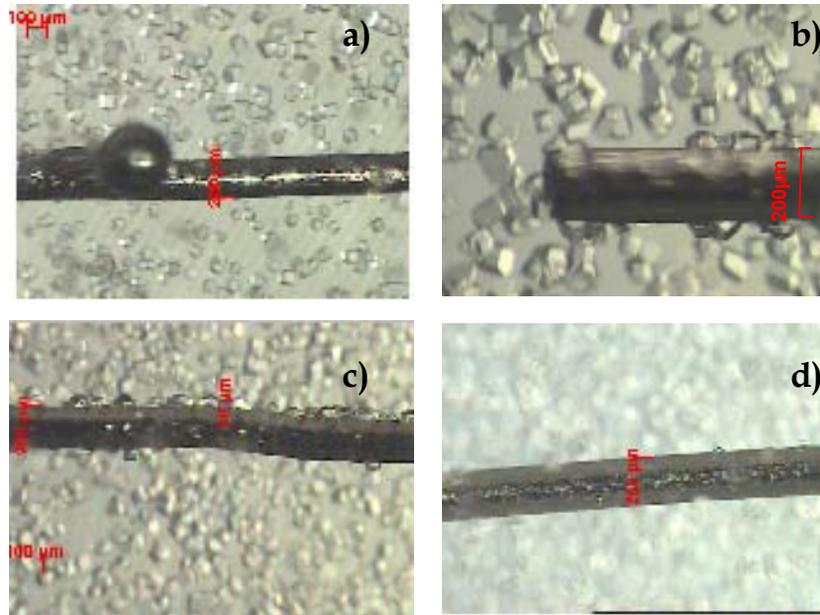


Figura 22. Fotografías de cátodos de 4 celdas diferentes. a) Cátodo con 30 mg/mL de NaCl. b) Cátodo al utilizar 40 mg/mL, en c) cátodo utilizando 40 mg/mL, finalmente d) cátodo a 50 mg/mL (en el fondo se observa que hubo precipitación de la disolución batch).

Los iones Cl^- y Na^+ juegan un rol importante en la cristalización de la lisozima, pues, además de ejercer un efecto en el balance de fuerzas repulsivas y atractivas en las moléculas de la lisozima, forman parte de la estructura del cristal. Así, dependiendo de la especificidad de la proteína, entre el 25 y 85% del volumen del cristal consiste de canales los cuales tienen la misma composición de la mezcla batch.³

Durante la cristalización con imposición de un campo eléctrico interno, la lisozima que se encuentra cargada positivamente se mueve hacia el cátodo acompañando el flujo de corriente, el cual es posible gracias al transporte de iones cargados. La mayor parte de la carga es transportada por los iones de alta movilidad (Cl^- , Na^+ , H^+ , AcO^-) presentes en el medio de cristalización.

Variación de la intensidad de corriente / Tiempo

En trabajos anteriores se concluyó que la imposición de un campo eléctrico interno en la celda de cristalización disminuye el tiempo de cristalización específicamente el de la nucleación.²² Por lo tanto, al modificar la intensidad de corriente el tiempo de cristalización sobre los electrodos cambió. La siguiente imagen (Figura 23) muestra experimentos con diferentes valores de I .

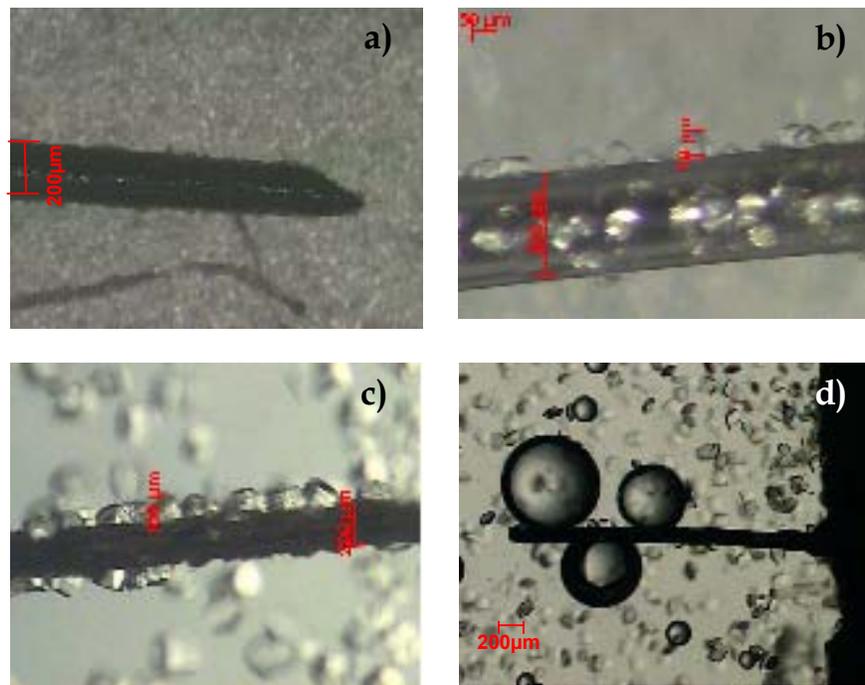


Figura 23. Efecto de la corriente eléctrica impuesta en la celda de cristalización (cátodo), todas las celdas utilizaron las siguientes condiciones: [lisozima]= 40 mg/mL, [NaCl]= 40 mg/mL en disolución amortiguadora de acetatos 200 mM, pH=4.5, T=18 °C, I: a) $I = 1 \mu\text{A}$ y $t = 48 \text{ h}$, b) $I = 1.5 \mu\text{A}$ y $t = 36 \text{ h}$, c) $I = 2 \mu\text{A}$ y $t = 24 \text{ h}$, d) $I = 2.5 \mu\text{A}$ y $t = 24 \text{ h}$.

La imagen anterior muestra que a medida que la corriente aumenta el tamaño de los cristales y el depósito que ocurre en el electrodo lo hacen también. En los casos donde se impusieron corrientes iguales o menores de $1 \mu\text{A}$ los cristales obtenidos después de 48 horas de cristalización son de tamaño inferior a $50 \mu\text{m}$, por otro lado al utilizar corrientes iguales o mayores a $2.5 \mu\text{A}$

la presencia de burbujas, provocadas por las reacciones de electrólisis del medio alrededor de los electrodos es temprana, ocasionando que no haya recubrimiento cristalino sobre ellos, además en la mayoría de los experimentos hubo precipitación de la disolución batch. Las mejores condiciones de corriente se obtuvieron cuando se utilizaron valores entre 1.5 y 2 μA ; aquí se observaron cátodos parcialmente cubiertos con cristales grandes de lisozima.

Variación de la temperatura

En la cristalización, las moléculas que inicialmente están en disolución tienden a un sistema con mayor orden, el cristal. Sin embargo para que este aumento de orden ocurra espontáneamente, la energía interna del sistema debe tender a un mínimo, por ello el último parámetro que se varió en la cristalización fue la temperatura. Para estos experimentos se utilizaron las siguientes condiciones experimentales: [lisozima]=40 mg/mL, [NaCl]=40 mg/mL en disolución amortiguadora de acetatos 200 mM, pH=4.5, $I=2 \mu\text{A}$ y $T=11, 13, 15$ y $18 \text{ }^\circ\text{C}$.

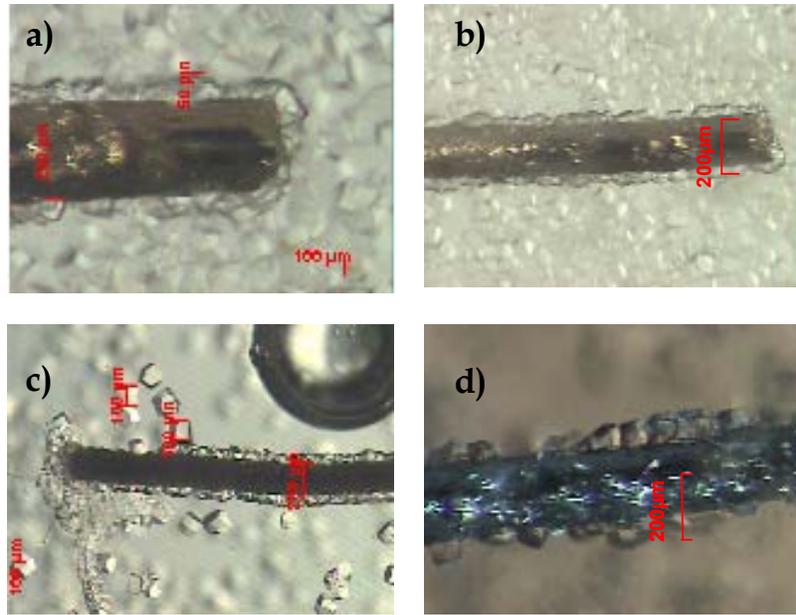


Figura 24. Imágenes de cátodos con recubrimiento cristalino, utilizando [lisozima]=40 mg/mL, [NaCl]=40 mg/mL en disolución amortiguadora de acetatos 200 mM, pH=4.5, $I = 2 \mu\text{A}$ y a) $T=11 \text{ }^\circ\text{C}$, b) $T=13 \text{ }^\circ\text{C}$, c) $T=15 \text{ }^\circ\text{C}$ y d) $T=18 \text{ }^\circ\text{C}$.

La imagen anterior muestra que a medida que disminuimos la temperatura, el recubrimiento cristalino del cátodo es mayor y más homogéneo. El tiempo que transcurre desde el establecimiento de la sobresaturación hasta el origen observable de los núcleos en la cristalización, depende principalmente del grado de saturación y de la temperatura.

Condiciones óptimas para el depósito policristalino de lisozima en electrodos de platino.

Después de optimizar nuestras variables encontramos que al utilizar las condiciones experimentales mostradas en la Tabla 5 los cátodos de las celdas electroquímicas tenían un recubrimiento policristalino uniforme de lisozima. De esta forma se logró hacer reproducible el método para obtener electrodos recubiertos con cristales de lisozima.

Tabla 5. Condiciones experimentales óptimas para obtener electrodos con recubrimiento policristalino de lisozima	
[Lisozima]	30 mg/mL
[NaCl]	40 mg/mL
pH	4.5
I	2 μ A
Temperatura	11 y 13 °C
Duración del experimento	24 h.

Experimentos reutilizando los electrodos de Pt

El crecimiento de los cristales es la fase de la cristalización en la que se adicionan moléculas a los núcleos formados previamente, considerando la afirmación anterior, éste experimento buscó disminuir el tiempo para obtener el recubrimiento policristalino del electrodo, al utilizar las celdas de experimentos anteriores, donde los alambres de platino tenían fragmentos de cristales de lisozima, los cuales servirían como núcleos en el nuevo experimento. El único tratamiento que se le daba a las celdas de cristalización después de finalizar un experimento consistió de un enjuague con agua desionizada. El resultado de éste fue la reducción de tiempo para obtener el electrodo con su recubrimiento policristalino de la misma calidad que se obtuvo en el experimento anterior. Con ello se ahorró el tiempo necesario que toman las moléculas para formar los núcleos.

Los experimentos se hicieron en la celda tipo B, bajo las condiciones de la tabla 5.

El cátodo totalmente cubierto con el depósito cristalino de la celda que cristalizó a 11 °C se obtuvo a las 12 horas de haber iniciado el experimento, mientras que aquél de la celda que se hizo a 13 °C se obtuvo a las 15 horas. El recubrimiento de ambos experimentos (Figura 25) es homogéneo y tiene un espesor de aproximadamente de 50 μ m.

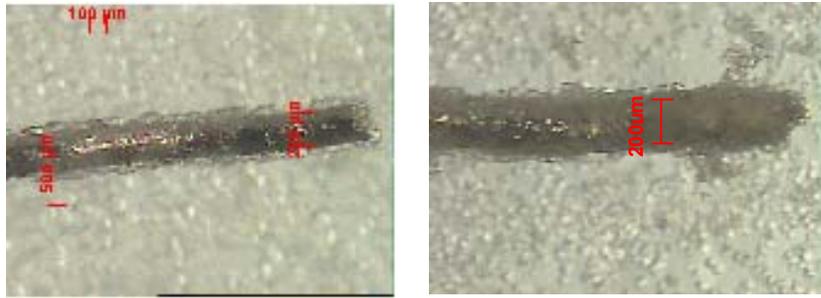


Figura 25. Cátodos con recubrimiento policristalino, la cristalización se hizo en celdas que habían sido utilizadas en experimentos anteriores. a) Cristalización a 11 °C después de 12 horas y b) a 13 °C después de 15 horas de experimento.

Finalmente el cátodo con el depósito cristalino es básicamente el biosensor, pues el depósito cristalino de lisozima será el encargado de sensar y traducir la señal a través del alambre de platino, el transductor. Sin embargo aún no es posible utilizarlo como tal, puesto que el elemento sensor es altamente soluble en agua. Por tal motivo fue necesario buscar la forma óptima de inmovilizar el elemento sensor al transductor para así evitar o retardar la disolución de los cristales.

VI.3 Cinética de disolución cristalina

El espesor del recubrimiento obtenido al finalizar la cristalización varió de 50 a 70 μm , observándose fragmentos de cristales tetragonales inmersos en el recubrimiento policristalino. Una vez obtenido el cátodo con su respectivo recubrimiento de lisozima, se realizó un estudio de solubilidad del recubrimiento cristalino en disolución amortiguadora de acetatos, a presión y temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$), con el objetivo de conocer el tiempo en el que el recubrimiento policristalino se disolvía completamente. Para ello se retiró el electrodo de la celda de cristalización con el mayor cuidado posible para evitar el desprendimiento de los cristales. Posteriormente, éste se sumergió en disolución amortiguadora y se midió el espesor del recubrimiento cada 5 ó 10 segundos según fuera necesario. La figura 26 muestra la disminución del espesor policristalino a medida que pasa el tiempo, disolviéndose por completo en menos de 2.5 minutos dependiendo del espesor inicial.

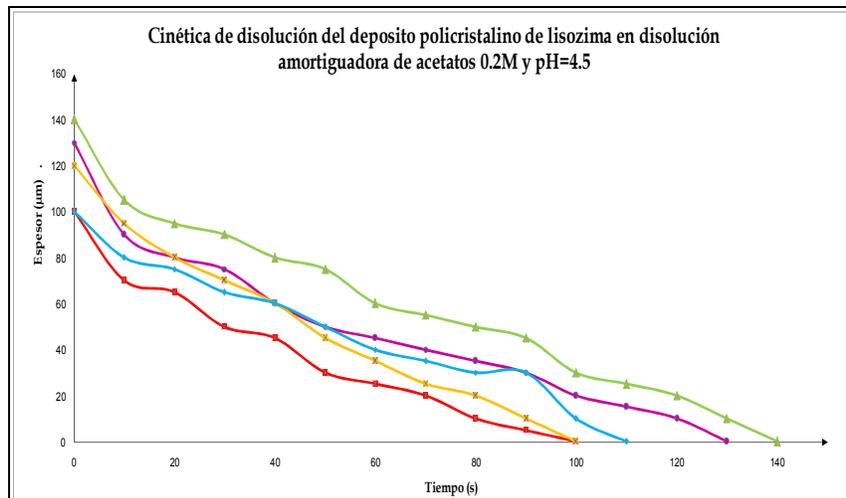


Figura 26 Variación del espesor del recubrimiento policristalino de lisozima del electrodo en función del tiempo al sumergirse en disolución amortiguadora de acetatos 200 mM de pH=4.5.

Se puede observar que la disminución del tamaño del recubrimiento en los primeros 10 segundos es mayor que la observada después de éstos.

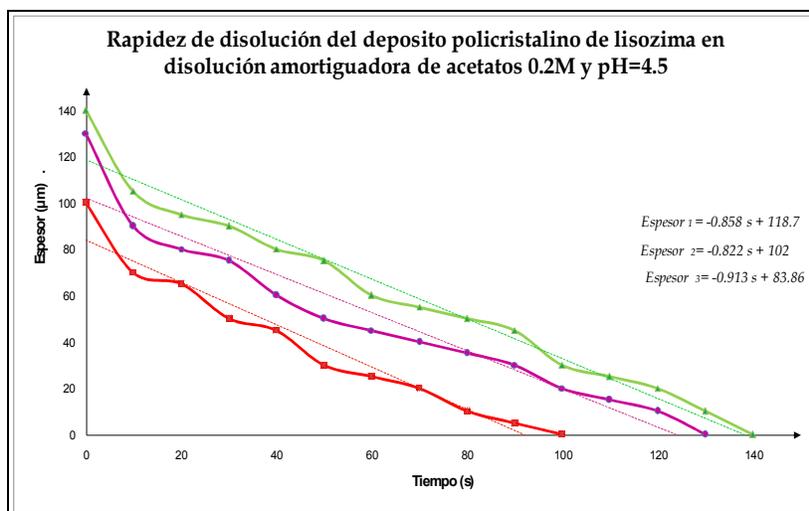


Figura 27. Curvas Temporales de la cinética de disolución del recubrimiento policristalino. El valor de la pendiente indica la rapidez a la que éste se disuelve.

La figura 27 muestra que la rapidez promedio de disolución del recubrimiento es $0.9 \mu\text{m/s}$.

Los resultados obtenidos con este estudio nos indican que no es posible utilizar al electrodo con el depósito policristalino directamente como biosensor en medios acuosos. Por tal razón fue necesario pasar a la siguiente etapa del proyecto; la búsqueda de una membrana que evitara o retardara la disolución del depósito cristalino.

VI.4 Utilización de nafion® como membrana

Exploración de las propiedades mecánicas y físicas de la membrana de Nafion®

El nafion es una membrana poco permeable a moléculas de agua, ya que su superficie está compuesta principalmente por grupos hidrofóbicos,⁴ los cuales se conectan a los grupos hidrofílicos que en su mayoría están en el interior de la superficie; estos últimos son los encargados de la conducción de cationes a través de la membrana. La figura 28 muestra un alambre de platino con una membrana de nafion como recubrimiento.

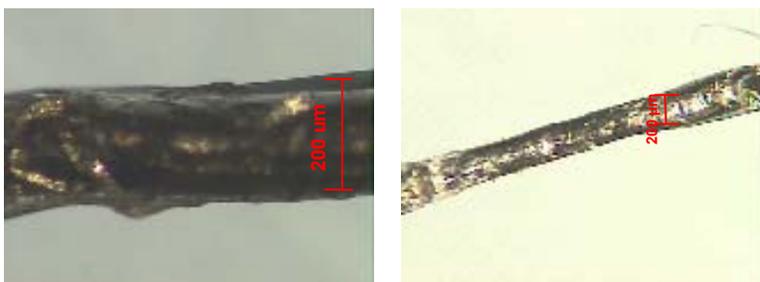


Figura 28 Electrodo de Pt° | Nafion: consta de un alambre de platino recubierto con una membrana de Nafion®.

Para obtener el electrodo Pt° | Nafion, se sumergió un alambre de platino de 200 μm de diámetro en una dispersión al 20% agua/alcohol con 1000 equivalentes en masa de nafion. Al cabo de 20 minutos de exponerlo a temperatura ambiente se obtuvo el electrodo con la película sólida de nafion.

Esta película es transparente e incolora, tiene un espesor de pocos micrómetros, su consistencia es similar al esmalte de uñas una vez seco. Esta membrana se adhiere fuertemente al metal del electrodo, facilitando su manipulación.

Las características mencionadas dieron pauta a utilizar al nafion como membrana protectora del biosensor, es decir obtener el biosensor Pt° | Lisozima | Nafion; para ello se sacaron los cátodos recubiertos con

depósito cristalino de las celdas de cristalización con el mayor cuidado posible para evitar el desprendimiento de éstos. Posteriormente con ayuda de una jeringa se le aplicó la dispersión de nafión y se dejó secar a temperatura ambiente. En la figura 29 se muestran dos electrodos Pt° | Lisozima | Nafión.

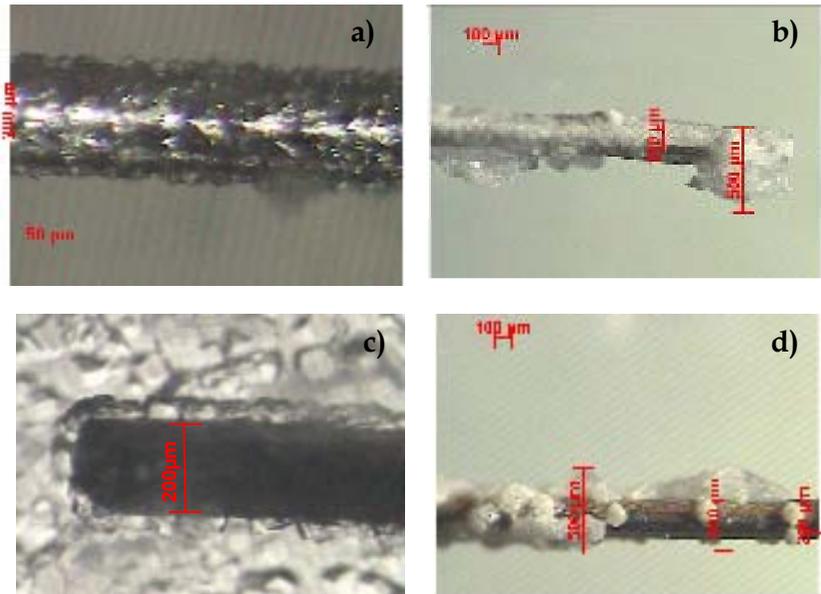


Figura 29. Las figuras a) y c) muestran los electrodos con el recubrimiento policristalino justo antes de retirarse de las celdas de cristalización, mientras que las figuras b) y d) muestran los electrodos después de aplicarles la membrana de Nafión®.

Como puede apreciarse el recubrimiento policristalino se disolvió parcialmente al aplicar el polímero. Este resultado no es positivo puesto que al realizar la determinación del analito con el biosensor en esas condiciones la sensibilidad se verá afectada, pudiendo distorsionarse la señal de la interacción proteína-analito.

Estudio de electroanalítico de estabilidad del biosensor.

El electrodo de platino (Pt°) y los electrodos obtenidos en la fase anterior ($Pt^\circ | \text{Nafión}$ y $Pt^\circ | \text{Lisozima} | \text{Nafión}$) se utilizaron como electrodos de trabajo en un estudio potenciométrico para conocer las diferencias en la señal de potencial. Para ello se utilizó un alambre de plata como electrodo de referencia y una disolución amortiguadora de acetatos 200 mM pH = 4.5. Las mediciones de potencial se realizaron en un pH-metro en modo potenciométrico por tiempos definidos.

La siguiente figura muestra las curvas de potencial en función del tiempo de los sistemas descritos anteriormente.

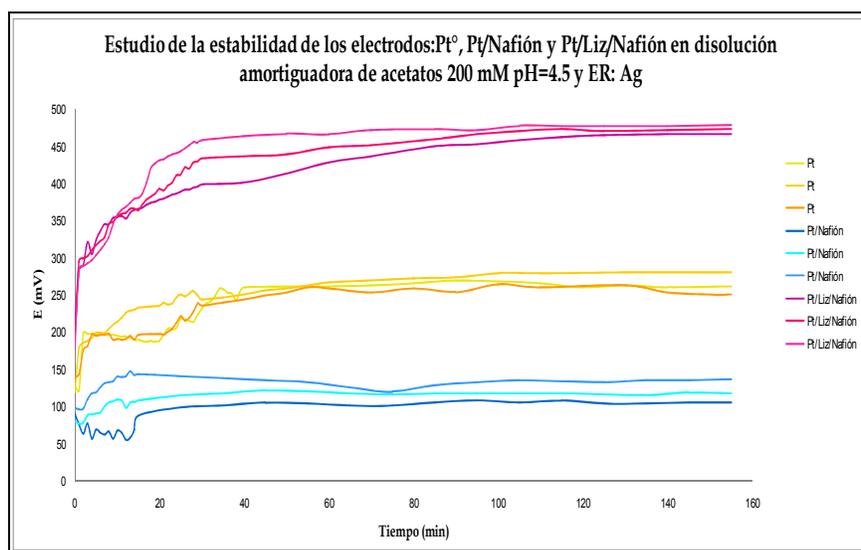


Figura 30. Curvas de potencial en función del tiempo de los electrodos de trabajo: Pt° , $Pt^\circ | \text{Nafión}$ y $Pt^\circ | \text{Lisozima} | \text{Nafión}$, utilizando como referencia Ag° en disolución amortiguadora de acetatos 200 mM y pH = 4.5.

Como puede apreciarse los tres tipos de curvas tienen una tendencia a estabilizarse, en general después de 30 minutos de estar en contacto con la disolución. Inicialmente se observan cambios de potencial un tanto bruscos, debidos al paso de los iones de la disolución a través de la membrana y, en el caso del electrodo de Pt° , a la alteración de la doble capa por los iones. Para el electrodo $Pt^\circ | \text{Nafión}$ se obtienen valores de potencial que están por debajo

de las curvas de los otros electrodos. Esto se debe a la repulsión entre los grupos hidrofóbicos de la superficie de la membrana y las moléculas de agua de la disolución; sin embargo después de 18 minutos se observa la invariabilidad de la curva. Para el electrodo de Pt°, la estabilidad se observa alrededor de 40 minutos, además los valores de potencial son superiores a los del electrodo Pt° | Nafión. El electrodo Pt° | Lisozima | Nafión, tiene los valores de potencial mayores, además presenta cambios muy bruscos de potencial en los primeros 5 minutos, alcanzando la estabilidad a los 30 minutos. El tiempo que requieren los electrodos que contienen la membrana de nafión (Pt° | Nafión y Pt° | Lisozima | Nafión) para estabilizarse es igual, sin embargo hay una diferencia entre los valores del potencial, que son mayores para el biosensor.

Una vez obtenidas las señales de los distintos electrodos en la disolución amortiguadora de acetatos 200 mM, pH= 4.5 (disolución blanco) se realizó un estudio cualitativo de estabilidad para cada electrodo en disolución con analito: NN-triacetil-quitotriosa. La finalidad de este estudio fue conocer si existían diferencias entre la señal generada por la disolución blanco y aquella resultante de la disolución problema.

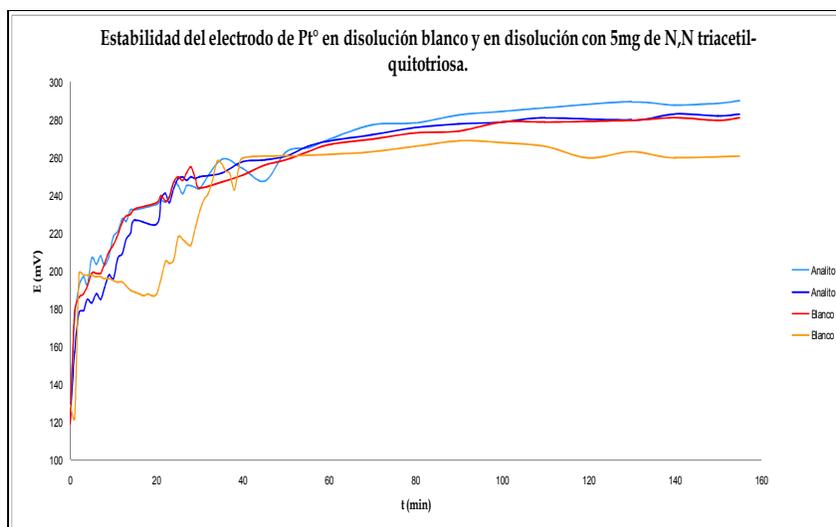


Figura 31. Estudio de la estabilidad del electrodo de Pt° en disolución amortiguadora de acetatos 200 mM, y en disolución amortiguadora de acetatos con 5 mg de N,N triacetil-quitotriosa.

En la figura 31 se aprecia que las señales del electrodo generadas en ambas disoluciones tienen la misma tendencia y los valores de potencial no difieren, lo que nos indica que la señal presentada en ambos casos se debe exclusivamente a los iones de la disolución amortiguadora de acetatos.

Este estudio se realizó utilizando el electrodo Pt°|Nafión y un alambre de Ag° como electrodo de referencia.

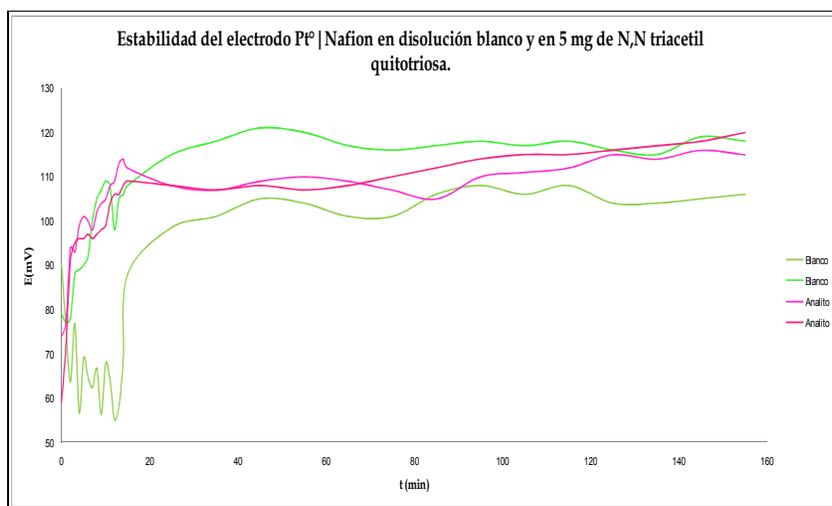


Figura 32. Estudio cualitativo para evaluar la estabilidad del electrodo Pt°|Nafión en disolución amortiguadora y en disolución amortiguadora de acetatos con 5 mg de N,N triacetil-quitotriosa.

Se observa que la tendencia de las curvas es similar: ambas inician en valores de potenciales menores a los que después se alcanzan cuando el potencial se estabiliza. Estas curvas son muestra de que el electrodo Pt°|Nafión no modifica su señal en presencia del analito.

Finalmente se realizó el estudio de estabilidad del electrodo Pt°|Lisozima|Nafión. Para ello se utilizó la misma masa de N,N triacetil-quitotriosa, utilizada en los experimentos anteriores.

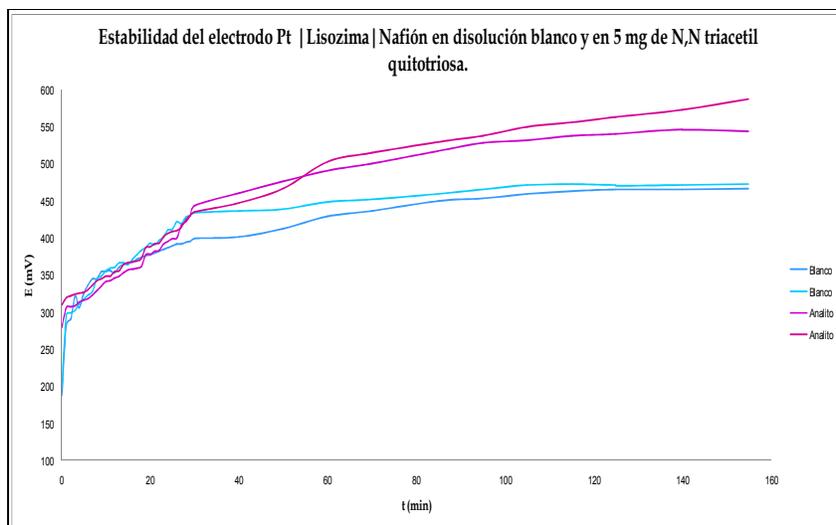


Figura 33. Estudio de estabilidad del electrodo Pt^o|Lisozima|Nafión en disolución blanco y en disolución con 5 mg de N,N triacetil-quitotriosa.

Para las curvas del analito inicialmente se observa una tendencia lineal; la cual se modifica después de los 30 minutos de experimento, pues el valor de la pendiente disminuye para llegar a la zona de estabilidad. Puesto que los iones H⁺ son los de menor tamaño en la disolución, éstos atraviesan la membrana de nafión con mayor facilidad. Por tal razón la curva de potencial del blanco inicia en valores menores que la curva del analito.

Finalmente se realizó el mismo estudio a diferentes concentraciones de N,N -triacetil-quitotriosa.

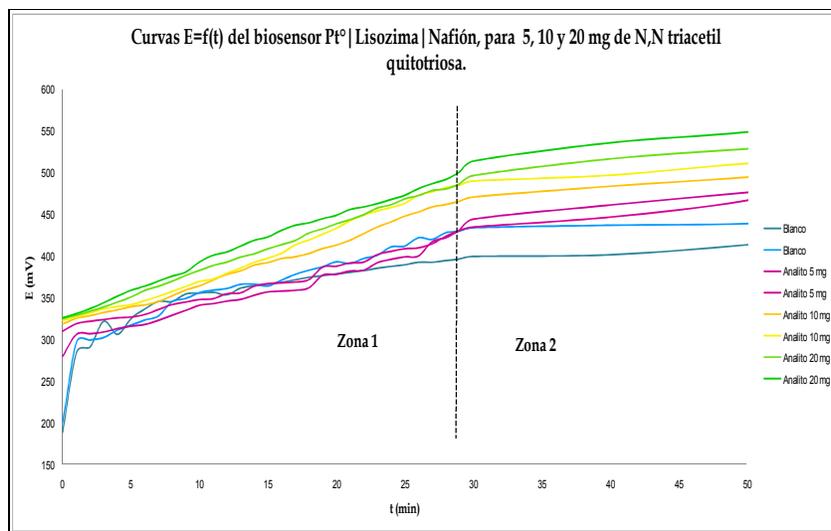


Figura 34. Estudio de estabilidad del biosensor Pt°|Lisozima|Nafión en disolución blanco y en disolución amortiguadora con 5, 10 y 20 mg de N,N triacetil-quitotriosa.

La tendencia de las curvas del analito es igual; en cada curva se pueden observar dos zonas: la primera para tiempos menores a 30 minutos, en donde la forma que presenta es lineal; después de este tiempo la pendiente de la recta disminuye. Alrededor de los 40 minutos los incrementos de potencial son muy pequeños, llegando en algunos casos a ser constante con respecto al tiempo.

De lo anterior se puede decir que el biosensor presenta una señal diferente al resto de los electrodos en presencia del analito. Sin embargo fue necesario hacer un estudio de estabilidad de potencial para el biosensor en ausencia de los iones provenientes de la disolución amortiguadora de acetatos. Este estudio se hizo en agua desionizada con 10 mg de N,N triacetil-quitotriosa.

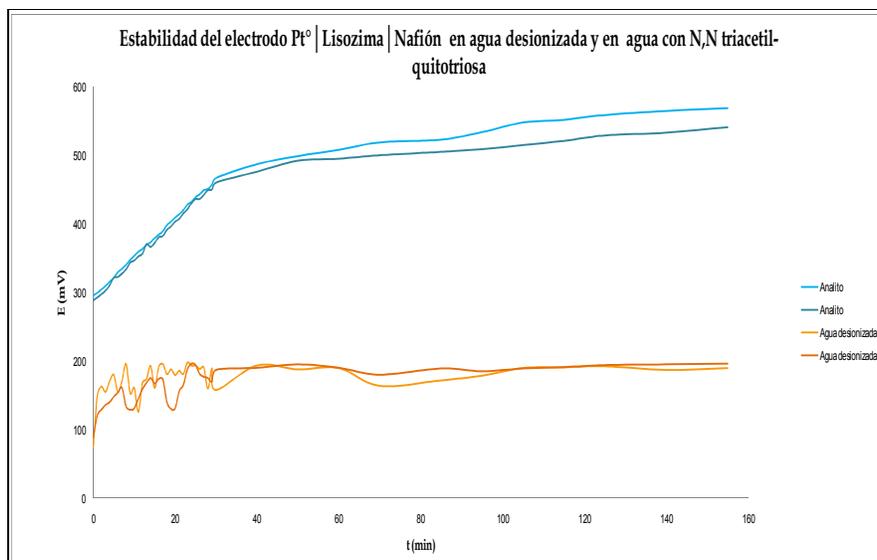


Figura 35. Estudio de la estabilidad del biosensor ($\text{Pt}^\circ \mid \text{Lisozima} \mid \text{Nafión}$) en agua desionizada y en agua desionizada con 10 mg de N,N triacetil-quitotriosa.

La figura 35 muestra la señal correspondiente al biosensor en agua desionizada. Esta curva presenta cambios de potencial bruscos en los primeros 20 minutos, para posteriormente llegar a una zona de estabilidad. Este comportamiento se puede atribuir a que parte del recubrimiento cristalino del biosensor se disuelve, por lo tanto se genera una pequeña concentración de iones que son los responsables de la señal de potencial. Para la curva del analito en agua desionizada se observa que sigue la misma tendencia que en los estudios del analito en disolución amortiguadora. La diferencia que presenta esta curva con las anteriores es el valor de potencial, pues para este caso los valores son menores.

De todo lo anterior se puede afirmar que el biosensor ($\text{Pt}^\circ \mid \text{Lisozima} \mid \text{Nafión}$) genera un señal de potencial característica en presencia de N,N triacetil-quitotriosa.

Las curvas de potencial del biosensor Pt⁰ | Lisozima | Nafión, alcanzan la estabilidad después de 30 minutos, pues para valores de tiempo mayores a éste la variación de potencial por cada 60 segundos es de 0.1 mV. Este dato concuerda con el criterio de estabilidad para los biosensores.

VI.5 Estudio de estabilidad del electrodo Pt⁰ | Lisozima en una matriz de gel de agarosa

Con el objetivo de conocer las repercusiones en los estudios de estabilidad del potencial utilizando el biosensor (Pt⁰ | Lisozima | Nafión) parcialmente recubierto, se decidió realizar un segundo tipo de estudio. Este consistió en monitorear el potencial de una matriz de gel de agarosa (20 mg/10 mL de agua) con y sin analito. Para ello se utilizó el electrodo Pt⁰ | Lisozima como electrodo de trabajo y un alambre de plata (Ag⁰) como electrodo de referencia.

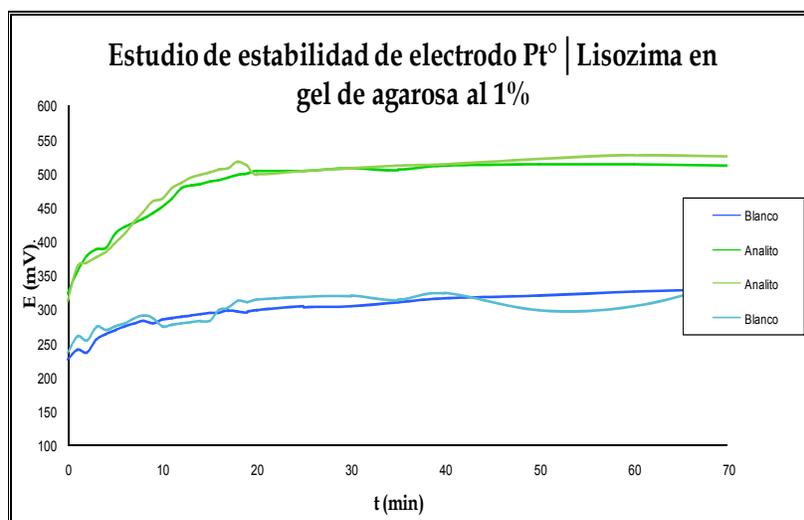


Figura 36. Estudio de estabilidad de potencial del electrodo Pt⁰ | Lisozima en gel de agarosa al 1% con y sin N,N triacetil-quitotriosa.

La figura 36 muestra que cuando la matriz de gel contiene al analito se genera una señal de potencial que corresponde a las señales obtenidas con el electrodo Pt°|Lisozima|Nafión. Sin embargo la curva obtenida con el electrodo Pt°|Lisozima presenta valores de potencial mayores a los de las otras curvas. Esto se puede explicar debido a que no existe la repulsión de los grupos hidrofóbicos de la membrana de nafión con las moléculas de agua del medio. Se observa también que la saturación del electrodo se alcanza en un tiempo menor de 20 minutos. Para el caso de las curvas blanco, se observa en general una tendencia constante, con algunas pequeñas variaciones las cuales se pueden deber a la disolución del depósito cristalino de lisozima.

Después de 40 minutos de experimento utilizando el electrodo Pt°|Lisozima se observa que el recubrimiento es casi nulo, por lo que los valores de potencial para tiempos mayores a este tiempo son debidos únicamente al alambre de platino.

El resultado de este estudio da pauta a afirmar que las señales de potencial obtenidas al utilizar las dos modalidades de biosensor (Pt°|Lisozima|Nafión y Pt°|Lisozima) en presencia de analito (N,N triacetil-quitotriosa) tienen la misma tendencia lineal en los primeros 20 minutos de experimento, llegando a una zona de estabilidad.

VI.6 Hasta ahora, ¿biosensor o no?

De acuerdo con los resultados obtenidos, cualitativamente se puede decir que los electrodos Pt°|Lisozima y Pt°|Lisozima|Nafión son selectivos a las moléculas de N,N triacetil quitotriosa, que es un sustrato para la proteína. Las ventajas de cada uno de los biosensores construidos dependen en gran medida de las condiciones experimentales a utilizar.

¹ **Dean J. A.**, Lange's Handbook of Chemistry, Edit. Mc. Graw-Hill, XIII edición, U.E., (1985), 6-1 y 6-19.

² **Lee H. M., Kim Y. W. and Baird J. K.**, *Journal of Crystal Growth*, (2001) **232**, 294-300.

³ **Rosenberger F.**, Protein crystallization, *Journal of Crystal Growth*, (1996) **166**, 40-54.

⁴ **Takimoto N., Ohira A., Takeoka Y. and Rikukawa M.**, Surface morphology and proton conduction imaging of nafion membrane, *Chemistry Letters* (2008) **37**, 164-165.

VIII. Conclusiones

- En la cristalización de lisozima asistida con un campo eléctrico interno, existe una preferencia de cristalización por la zona cercana al cátodo.
- La membrana de Nafion[®] sirvió como método de inmovilización para la lisozima, pues gracias a sus propiedades físicas y químicas fue posible detectar la señal debida al analito.
- Los electrodos Pt[°] | Lisozima y el Pt[°] | Lisozima | Nafión son selectivos a N,N triacetil quitotriosa, y éstos presentan la misma tendencia en sus señales de potencial. Por la tanto cualitativamente éstos funcionan como biosensores.

IX. Referencias bibliográficas

Ho. M. Y. K. and Rechnitz G. A., Highly stable Biosensor using an artificial enzyme, *Analytical Chemistry* (1987), **59**, 537-539.

Göpel W. and Schierbaum K. D., *Definitions and typical examples in: sensors – A comprehensive survey. Chemical and Biochemical Sensors*, editorial VCH, New York, 1991, Vol. 2, 567-575.

Imoto T., *Encyclopedia of Life Science*, Lysozyme, Kyushu University, Fukuoka Japan, 2001, 1-5

Grossowicz N. and Ariel M., Methods for determination of lysozyme activity, *Methods of Biochemical Analysis*, (1983) **29**, 435-436.

Masschalck B. and Michaelis C. W., Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria, *Critical Reviews in Microbiology*, (2003) **29**(3), 191-214.

Smith L. J., Sutcliffe M. J. and Redfile C., Structure of hen lysozyme in solution, *Journal of Molecular Biology*, (1993) **229**, 930-944.

Maenaka K., Matsushima M., Song H., Sunada F., Watanabe K. and Kumagai I. Dissection of protein-carbohydrate interactions in mutant hen-white lysozyme complexes and their hydrolytic activity, *Journal of Molecular Biology*, (1995) **247**, 281-293

Vocadlo J. D., Davies G., Laine R. and Withers G., Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via covalent intermediate, *Nature*, (2001) **412**, 835-838

Kurita K., Chitin and chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans, *Marine Biotechnology*, (2006) **8** 203-226

Rinaudo M., Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, (2006) **31**, 603-632

Amano K., Ito E., The Action of Lysozyme on Partially Deacetylated Chitin, *European Journal of Biochemistry*, (1978) **85**, 97-104

Grases F., Costa A. and Söhnel O., *Cristalización en disolución*,. Conceptos básicos, Editorial Reverté, Barcelona España, 2000, 7-60

Moreno A., Bolaños V. and Mas J., *De la disolución a la cristalización de macromoléculas biológicas*, Editorial. JGH Editores, S. A. de C.V., México D.F., (2000), 1-39

Kadri A., Damak M., Lorber B., Giegé R., and Jenner G., Pressure versus pH phase diagrams of two lysozymes crystallized in agarose gel, *High Pressure Research*, (2003) **23**, 485-491

Astier J. P., Veesler S. and Boistelle R., Protein crystals orientation in a magnetic field, *Acta Crystallographica*, (1998) **D54**, 703-706

Yin D., Wakayama N. I., Wada H. and Huang W., Significant effects of magnetic and gravitational fields on the morphology of protein crystals (orthorhombic lysozyme crystals grown using NiCl₂ as crystallization agent), *Journal of Physical Chemistry*, (2003) **B107** 14140-14144. -

Sazaki G., Moreno A. and Nakajima K., Novel coupling effects of the magnetic and electric fields on protein crystallization, *Journal of Crystal Growth*, (2004) **262**, 499-502.

Kocherbitov V., Arnebrant T. and Söderman O., Lysozyme – Water Interactions Studied by Sorption Calorimetry, *Journal of Physical Chemistry*, (2004) **108**, 19036-19042.

Rosenberger F., Protein crystallization, *Journal of Crystal Growth*, (1996) **166**, 40-54.

Tanford C. and Wagner M. L., Hydrogen ion equilibrium of lysozyme, *Journal of American Chemical Society*, (1954) **76**, 3331.

Fredericks W. J., Hammonds M. C., Howard S. B. and Rosenberger F., Density, thermal expansivity, viscosity and refractive index of lysozyme solutions at crystal growth concentrations, *Journal of Crystal Growth* (1994) **141**, 183.

Dubin S. B., Clarck N. A. and Benedek G. B., Measurement of the rotational diffusion coefficient of lysozyme by depolarized light scattering: configuration of lysozyme in solution, *Journal of Chemical Physics.*, (1971) **54**, 5158.

Vassos B. H. and Ewing G. W., *Electroquímica analítica*, Editorial Limusa, México (1987), 13-25 y 55-78.

Nieto M. E., Frontana U. B., Sasaki G. and Moreno A., Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes: effect of the potential control, *Journal of Crystal Growth* (2005) **275**, 1437-1446.

Eggins Brian R., *Chemical sensors and biosensors*, John Wiley & sons, Northern Ireland, UK, (2003),. 1-27 y 69-124

D'Souza S.F., Surface immobilization of food relevant microbial cell through adhesion, *Food Biotechnology*, (1990) **4**, 373-382.

D'Souza S. F., Microbial biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, (2001) **16**, 337-353.

Lai K., Grimsley J. K., Kuhlmann B. D., Scxapozza L., Harvey S., DeFrank J., Kolakowsky J. and Wild J., Rational enzyme design: computer modelling and site-direct mutagenesis for the modification of catalytic specificity in organophosphorus hydrolase, *International Journal for Chemistry*, (1996) **50**, 430-431.

Zhang S., Wright G. and Yang Y., Materials and techniques for electrochemical biosensors design and construction, *Biosensors and Bioelectronics*, (2000)**15**, 273-282.

Alvarez I. M., Kalisz M. H., Hecht H. J., Aumann K. D., Schomburg D. and Schmid R., The design of enzyme sensors based on the enzyme structure, *Biosensors and Bioelectronics*, (1995) **10**, 735-742.

Donald L. and Jeffrey A. H., Surface treatment of polymers for biocompatibility, *Annual Review of Materials Research*, (1996) **116**, 2225-2226.

Göpel W. and Heiduschka P., Interface analysis in biosensors design, *Biosensors and Bioelectronics*, (1995) **10**, 853-883.

Davis A., Genders J. D. and Pletcher D *A first course in Ion permeable membranes*, The electrochemical Consultancy, England (1997), 1-31.

Gill A., Lillie G., Farance G. and Vadgama P., Biocompatible interfaces for biosensors, *Intern. Journal of Environmental Analytical Chemistry*, (2005) **85**, 699-725.

Takimoto N., Ohira A., Takeoka Y. and Rikukawa M., Surface morphology and proton conduction imaging of nafion membrane, *Chemistry Letters* (2008) **37**, 164-165.

Gierke T. D. and Hsu Y., In Perfluorinated ionomer membranes, ACS Symposium series **180**, ed. by A. Eisenberg, L. Yeager, *American Chemical Society*, Washington, DC. (1982), 283-284.

Nieto Mendoza E. Tesis de maestría en ciencias químicas, *Investigación sobre el fenómeno de electromigración en la cristalización de proteínas, usando celdas de crecimiento de cristales con múltiples electrodos*, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, 2005.

Mirkin Bril N. Tesis de doctorado en Ciencias Químicas, *Cristalización de proteínas en presencia de un campo eléctrico interno; diseño y estudios cristalográficos de sensores biológicos*, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, 2005

Chayen N. and Saridakis E., Is lysozyme really the ideal model protein?, *Journal of Crystal Growth*, (2001) **232**, 262-264.

Moreno A. and Sasaki G., The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme, *Journal of Crystal Growth* (2004) **264**, 438–444.

Dean J. A., Lange's Handbook of Chemistry, Edit. Mc. Graw-Hill, XIII edición, U.E., (1985), 6-1 y 6-19.

Lee H. M., Kim Y. W. and Baird J. K., *Journal of Crystal Growth*, (2001) **232**, 294-300.

Rosenberger F., Protein crystallization, *Journal of Crystal Growth*, (1996) **166**, 40-54.

Takimoto N., Ohira A., Takeoka Y. and Rikukawa M., Surface morphology and proton conduction imaging of nafion membrane, *Chemistry Letters* (2008) **37**, 164-165.