



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN

DE LOS CRISTALES DE CITOCROMO-C A UN
DISPOSITIVO TRANSFERENTE DE ELECTRONES
EN ESTADO SÓLIDO

Que para obtener el título de
Ingeniero Químico

Presenta:

Francisco Javier Acosta Reyes



México, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

PRESIDENTE: profesor: Aurora de los Ángeles Ramos Mejía

VOCAL: profesor: Pedro Roquero Tejeda

SECRETARIO: profesor: Abel Moreno Cárcamo

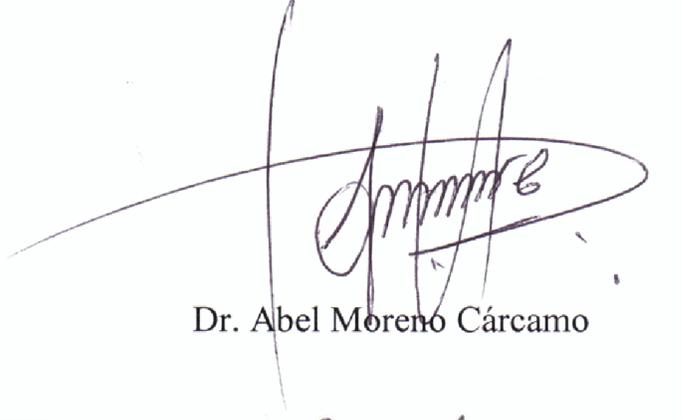
1^{er} SUPLENTE: profesor: Bernardo Antonio Frontana Uribe

2^o SUPLENTE: profesor: María Guadalupe Lemus Barajas

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, C.U. 04510, México, D.F

ASESOR DEL TEMA:



Dr. Abel Moreno Cárcamo

SUSTENTANTE:



Francisco Javier Acosta Reyes

En dedicatoria a la persona que con su ejemplo me brindó toda la enseñanza moral, intelectual y física que me acompaña al sortear las alegrías, éxitos, angustias y fracasos, para obtener el mejor provecho de cada uno de estos. Presento este trabajo como tributo e ínfimo resultado de todo el apoyo, comprensión y cariño que me ha brindado.

Dedicado a:

Ma. del Consuelo Reyes Hernández

En la vida ambiciona honor y no honores

Francesco Guicciardini

Agradecimientos:

A mi padre que como amigo siempre me ha comprendido, ayudado y rectificado para lograr mis metas.

A mis hermanas Andy, Pame y Tani que con sus bromas y cariño obtengo la fuerza y templanza para el camino que en cada objetivo recorro. El mejor apoyo incondicional.

A todos mis abuelos que siempre han sido un gran ejemplo de vida y de unión familiar.

A Dios.

A mi Universidad y todas las personas que en ella me acompañaron.

I.- Publicación, "From Cytochrome *c* Crystals to a Solid-State Electron-Transfer Device"1.1.-" From Cytochrome *c* Crystals to a Solid-State Electron-Transfer Device" 1

II.- Marco teórico de cristalización de proteínas y análisis por DLS y AFM

2.1.-Objetivo general 6

2.2.-Introducción y antecedentes 6

III.- Electrocrystalización de Citocromo-c con análisis in situ por DLS.

3.1.-Método y material, Fase 1 Electrocrystalización 9

3.2.-Resultados y discusión, Fase 1 Electrocrystalización 10

3.3.-Conclusiones, Fase 1 Electrocrystalización 18

IV.- Desarrollo y análisis de un biosensor a partir de cristales de Citocromo-c

4.1.-Método y material, Fase 2 Desarrollo y análisis del biosensor 22

4.2.- Resultados y discusión, Fase 2 Desarrollo y análisis del biosensor 23

4.3.-Conclusión, Fase 2 Desarrollo y análisis del biosensor 25

Extra, Resumen de estandarización con Lisozima 25

Referencias 29

From Cytochrome *c* Crystals to a Solid-State Electron-Transfer Device[†]

Francisco Acosta, Désir Eid, Liliana Marín-García, Bernardo A. Frontana-Uribe, and Abel Moreno*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, C.U. 04510, Mexico City, Mexico

Received September 27, 2007

ABSTRACT: In this work, we performed the physical characterization of cytochrome *c* (transport properties and temperature dependency) by dynamic light scattering methods. Additionally, the crystallization of one of the isoforms of cytochrome *c* is presented. The electrochemical fluid cell of the atomic force microscopy (EC-AFM) and the polypyrrole films used as chemical glue allowed cytochrome *c* crystals to be fixed onto the surface of the working electrode (indium tin oxide, ITO). This also permitted development of a first prototype of a solid-state electron-transfer device based on biological crystals. Finally, using the electrochemistry modulus of the AFM, cyclic voltammetry techniques were performed to characterize the electron-transfer response on the surface of crystals of cytochrome *c* attached to the electrode. This result confirmed the successful electron-transfer process between the ITO electrode and the protein crystal attached to the working electrode by a film of a conducting polymer (ppy).

1. Introduction

The electrochemistry of redox proteins is now well established for a variety of applications.¹ When the chemical conditions are available, they allow electron-transfer reactions of all simple proteins to proceed rapidly and reversibly at the electrodes.^{2,3} This has been important both in the development of biosensors and in the field of bioelectrochemistry, which are based on new detection principles.⁴ The cytochrome *c* is one of the best-studied proteins in biochemistry. This is probably due to its electron-transfer properties involved in the respiration of living organisms.⁵ Thanks to its red color, the purification is easier, particularly for the cytochrome *c* from bovine heart which is a small protein, soluble in different buffer solutions, and it is commercially available. In spite of being a relatively easy protein to manipulate from the biochemical point of view, its electron-transfer properties had to be studied in solution^{6,7} and immobilized on the electrodes.⁸ However, they have never being explored in solid-state (crystals). Our group has recently described the crystallization and the three-dimensional (3D) structure of this protein at high resolution.⁹ The fixation of these crystals is a first step in the study of the electron-transfer phenomena of biological crystals of cytochrome *c*. The electron-transfer phenomena were performed via electrochemical methods coupled to atomic force microscopy (AFM).

The electrochemical oxidation of heterocyclic molecules such as pyrrole or thiophene generates conducting polymer deposits on the electrode.¹⁰ This is a very accurate technique for controlling the thickness of the deposit. The majority of these polymers, obtained by electro-polymerization, show both good conductivity and chemical stability. This is important for technological applications.^{11,12} Among these heterocyclic molecules, polypyrrole (ppy) has been used as a biocompatible conducting polymer in biosensors construction, which makes it a promising material for bioengineering.^{13–15} Conducting polymers have been used as chemically conducting glue. For

example, polythiophene is a transparent adhesive for a lamination process,¹⁶ and ppy is able to immobilize catalase crystals on electrodes.¹⁷

2. Experimental Procedures

2.1. Dynamic Light Scattering. Cytochrome *c* was purified following the protocol previously described by Mirkin et al.⁹ Its purity was initially checked by gel electrophoresis. This showed a MW of about 12.6 kDa verified by mass spectrometry methods. Additionally, the data of the hydrodynamic radius, the diffusion coefficient, and the molecular weight determination by total intensity light scattering (TILS) were obtained from the software DTS (Nano) (Malvern, Ltd.). A Malvern Nano S apparatus with a NIBS laser technology was used. To perform these studies, solutions of cytochrome *c* at different concentrations were prepared, both in distilled water and in phosphate buffer pH 7.0. The thermal stability of this protein and the precipitating agent were analyzed ranging from 5 to 37 °C in steps of 1 °C.

2.2. Cytochrome *c* Crystallization. The crystallization was prepared by using the hanging-drop vapor diffusion method in NEX TAL plates (Code NCP-24-100). The crystallization conditions and the 3D structure of this protein are those published by Mirkin et al.,⁹ who crystallized the oxidized form of native cytochrome *c* (usually obtained in the presence of oxygen). The reservoir (1000 μ L) contained 30% (w/v) PEG1000 in 50 mM sodium phosphate pH 7.0. Droplets of 4 μ L (2 μ L of protein + 2 μ L of precipitant) containing 25 mg/mL of purified cytochrome *c* with 25% (w/v) PEG-1000, both in the buffer phosphate pH 7.0, were incubated at 4 °C for 32 days. The first results were poorly shaped crystals that were used as microseeds and then transferred (by means of a cat whisker) to pre-equilibrated droplets containing 22 mg/mL of protein and 25% (w/v) PEG-1000 (both prepared in 50 mM buffer phosphate pH 7.0). After one week, several well-shaped single crystals were obtained reaching maximum dimensions of 0.25 \times 0.1 \times 0.1 mm.

2.3. Electrochemical Investigations. Cyclic voltammetry is the most widely used technique for acquiring qualitative information about electrochemical reactions. The power of cyclic voltammetry results from its ability to rapidly provide considerable information on the thermodynamics of redox processes, from the kinetics of heterogeneous electron-transfer reactions, and from coupled chemical reactions and adsorption processes.¹⁸ Cyclic voltammetry is often the first experiment performed in an electroanalytical study. It particularly offers a rapid location of redox potentials of the electroactive species and convenient evaluation of the effect of media upon the redox process. The electrochemical experiments were done in an electrochemical fluid cell (50 μ L) of Digital Instruments MultiMode scanning probe microscopy

[†] Part of the special issue (Vol 7, issue 11) on the 11th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, Québec, Canada, August 16–21, 2006 (preconference August 13–16, 2006).

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: carcamo@servidor.unam.mx.

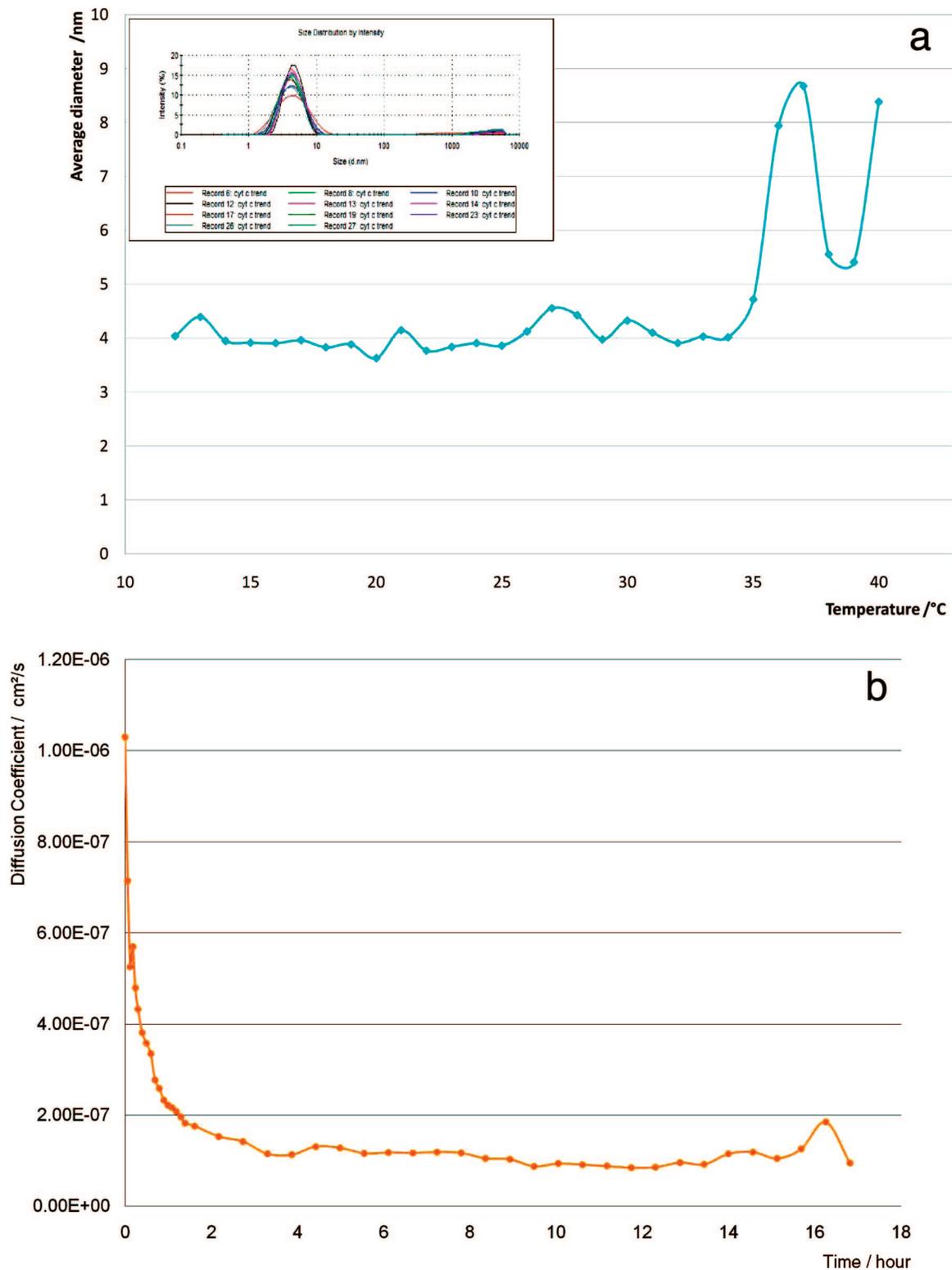


Figure 1. Hydrodynamic properties of cytochrome *c* from bovine heart: (a) average size distribution of the protein versus temperature (the inset shows the monodispersity of the protein); (b) diffusion coefficient trend when mixing protein/precipitating agent.

(SPM), (NanoScope IIIa from Veeco, formerly Digital Instruments, Santa Barbara USA) coupled with an electrochemical module (EC-AFM). The cyclic voltammetry characterization was performed with the potentiostat/galvanostat module of the AFM employing a triangular-shaped wave potential. In this configuration, a silver (Ag) wire was used as a pseudoreference electrode, a platinum (Pt) wire as a counter-electrode and an indium tin oxide (ITO) surface as a working electrode. The electrochemical potential was cycled between -750 to $+750$ mV at 50 mV/s in all cases. Thanks to this range of voltage, we could avoid water electrolysis. Additionally, the oxygen usually contained

in aqueous solutions was removed previously to the electrochemical determination. This was done by passing through the solutions a flux of N_2 (INFRA, ultra high purity 99.999%) for an average time of 15 min.

2.4. Immobilization of Cytochrome *c* Crystals on ITO Electrodes. The fixation of the cytochrome *c* crystals was feasible by growing these crystals *ex situ* with the hanging-drop vapor-diffusion method, followed by the microseeding technique as mentioned in section 2.2. The cytochrome *c* crystals were introduced inside the fluid cell of

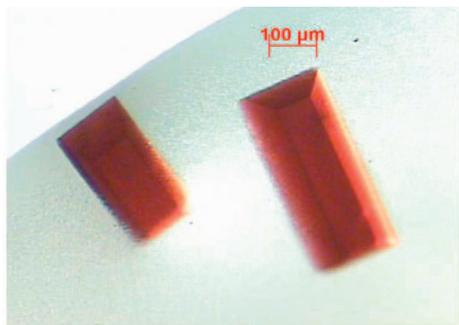


Figure 2. Crystal of cytochrome *c* from bovine heart obtained ex situ by microseeding techniques.

the atomic force microscope (EC-AFM). They were then immobilized with ppy films. An equilibrated droplet of the crystallization conditions, with crystals of cytochrome *c*, were mounted on the ITO surface previous to the injection of an aqueous solution of 0.77 M pyrrole (py)/0.34 M LiClO₄ in the fluid cell of the EC-AFM. To ensure a close

contact between the crystals and the ITO electrode, the aqueous solution was carefully (dropwise) introduced to the fluid cell to prevent the movement of the crystals away from the bottom of the electrode to the bulk of the solution. Sometimes, when crystals are moved levitating on the solution, it is necessary to allow them to come down onto the surface of the ITO before performing the experiment. When the fluid cell of the EC-AFM was closed, a potentiodynamic electropolymerization was carried out (50 mV/s) permitting the ppy film to be formed around the crystals of cytochrome *c*.

3. Results and Discussion

For many years, dynamic light scattering methods have proved their efficiency to characterize biological macromolecules. Figure 1 shows the hydrodynamic characterization versus temperature of cytochrome *c* monomers by dynamic light scattering. The monomodal size-distribution implies that the high purity of this protein is maintained in a very large range of temperatures (inset Figure 1a). A hydrodynamic radius of about 4 nm with a maximum stability that ranges between 10 and 35 °C was clearly determined (Figure 1a). Figure 1b shows the

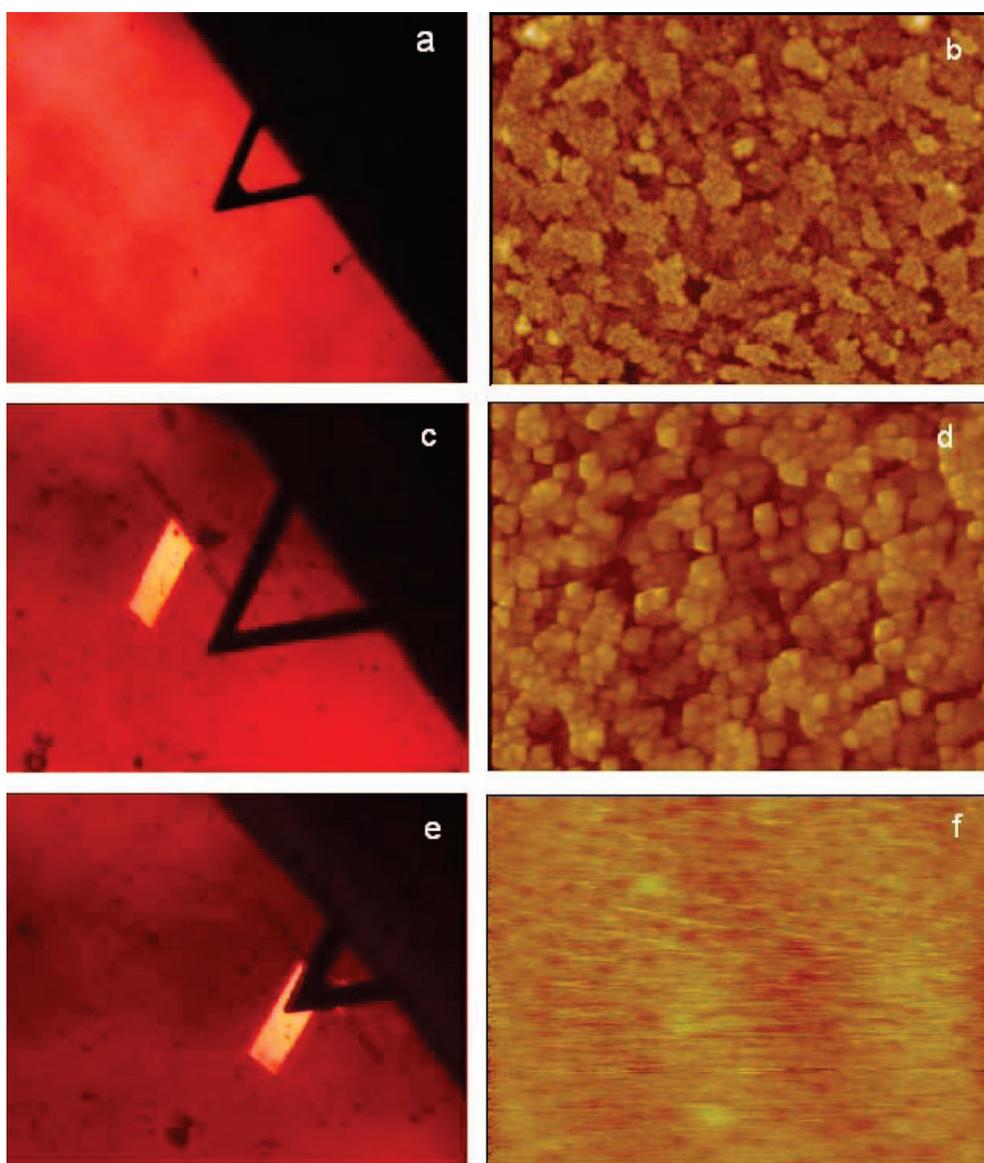


Figure 3. AFM micrographs before and after analyzing the crystal surface: (a) cantilever on the surface of the ITO electrode; (b) $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ image of the surface of the ITO electrode; (c) this image shows the polypyrrole area where the scanning on the film was performed; (d) $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ image of the surface the polypyrrole film; (e) after polymerizing the pyrrole the crystal was fixed by this polypyrrole film; (f) $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ image of the crystal surface.

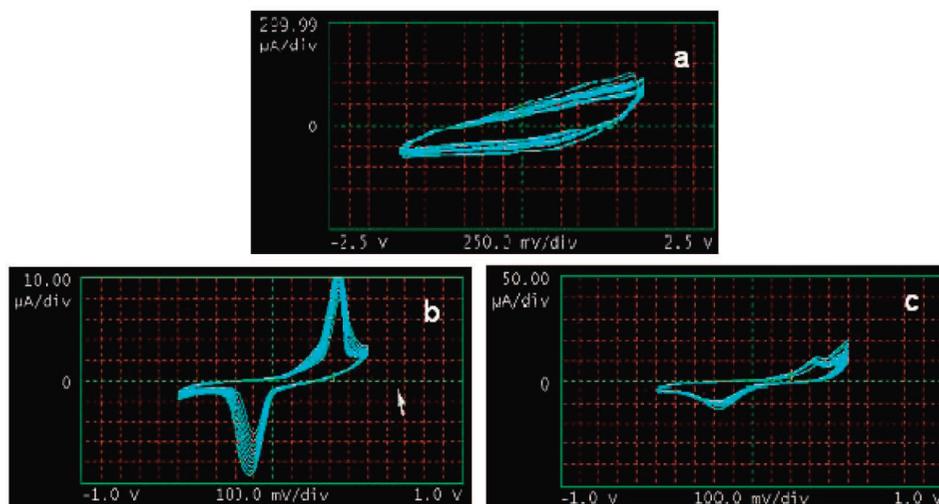


Figure 4. Two different electrochemical responses of cytochrome *c* by using cyclic voltammetry techniques: (a) ppy voltammogram (control); (b) signal of layers of few nanometers of cytochrome *c*; (c) voltammogram of cytochrome *c* crystals fixed by ppy films. The reader must take into account that the scales are different. The software of the AFM equipment technically adapts all electrochemical signals.

evolution of the diffusion coefficient when the protein is mixed with the precipitating agent (PEG-1000). This coefficient diminishes due to the growth of the size of protein aggregates. On the basis of this hydrodynamic behavior, we decided to set all crystallization experiments at 18 °C, where this protein is much more stable. These studies are useful for both the AFM and the electroanalytical experiments of cytochrome *c*.

To apply electroanalytical techniques, crystals of cytochrome *c* were obtained following the crystallization procedure of Mirkin et al.⁹ Figure 2 shows the beautiful red single crystals of cytochrome *c* used for these electroanalytical investigations. The crystals were characterized by synchrotron radiation (Brookhaven National Laboratories-NSLS, USA) and belonged to the $P2_12_12_1$ space group with the following unit cell parameters $a = 36.84 \text{ \AA}$, $b = 54.48 \text{ \AA}$ and $c = 55.33 \text{ \AA}$. They also have four monomers into the asymmetric unit and 46% solvent content, as already published elsewhere.

A recent development on biosensors field requires a high local protein molecule concentration to prepare better devices of a higher sensitivity. One way to reach this objective is to create a solid-state electrochemical biosensor using protein single crystals. The availability of highly purified cytochrome *c* crystals allowed us to explore new applications of cytochrome *c* to create a solid-state biosensor based on the electron-transfer properties of this biomolecule. However, due to a lack of methods to fix protein single crystals on the surface of the working electrode for analytical studies, the use of conducting polymers such as ppy as chemical glue was explored. This polymer resulted in conducting chemical glue¹⁷ useful to fix our crystals for structural and electrochemical investigations. It must be taken into account that protein crystals are a fragile material, which break easily under mechanical pressure, but they cannot be easily immobilized as other inorganic crystals.^{19,20}

Figure 3a,b shows the surface of the ITO electrode where the crystals of the protein will be deposited. An homogeneous ITO deposit composed by small flowerlike microspheres was observed. After polymerizing py, the crystal was perfectly fixed on the ITO electrode. The surface morphology of ppy (Figure 3c,d) determined by AFM differs clearly from the protein crystal (Figure 3e,f). This last image could only be obtained when the cytochrome *c* crystal was steadily fixed on the ITO electrode by this ppy film. After fixing the cytochrome *c*, the deflection

of the tip was also monitored applying a small force (0.3 N/m) to the crystal surface. Since no movement was detected when pushing the crystal with the tip of the cantilever during the scanning process, a good immobilization of the single crystal of cytochrome *c* to the ITO surface was ensured. The ppy surface is a set of homogeneous aggregates, whereas the surface of the protein crystal is smooth and planar. This confirms that ppy did not cover the surface of the crystal and that it was exposed toward the solution. This experimental setup permitted us to measure the electrochemical response of the cytochrome *c* crystal attached to the electrode using the in situ AFM-electrochemical module.

Figure 4 depicts the electrochemical response obtained by means of cyclic voltammetry of (a) the ppy layer (control); (b) cytochrome *c* layers adsorbed on the electrode;⁹ and (c) cytochrome *c* crystal fixed with ppy. A similar shape of the voltammogram was observed for both forms (monolayer and single crystal) of immobilization of cytochrome *c*. This experiment confirms the electric transference in solid-state of electrons from the bottom to the surface of the single crystal.

Additionally, the scanning tunneling microscopy (STM) mode from the SPM/AFM was also used to confirm this electron-transfer along the crystal structure producing a signal response. However, the gel-like structure of the protein crystals did not permit us to obtain any image with this technique (STM); this is why the EC-AFM in the cyclic voltammetry mode was the most appropriate technique for our purposes.

Finally, it is worth mentioning that the crystal-electrode can be kept inside an electrochemical cell covered with light oil to avoid evaporation. The lifetime of these solid-state electron transfer biosensor has not been yet evaluated. For the exchange of electrons via the cytochrome *c* with membrane proteins such as cytochrome *c* oxidase or reductase, this biosensor can be theoretically reused (not tested). However, both the temperature and the equilibrium conditions must be kept constant to avoid dissolution of the crystals. Future experiments will be focused on protecting these crystals with a paste of graphite or Nafion (to avoid damage of the solid-state structure). This is a very common technique in bioelectrochemistry, where immobilized enzymes have been studied.

4. Conclusions

This novel immobilization technique for cytochrome *c* crystals will open a new possibility to investigate electric properties in biological materials (biocrystals). This contribution has shown the plausible measurement of an electron-transfer signal through a solid-state material (crystals) using a redox biomolecule. Additionally, the perspectives of this work will be focused on the mounting of several crystals by these ppy films, to use them as seeds for crystal growth and X-ray crystallographic research. These polycrystalline electrodes will permit the construction and the investigation of biosensors once the electric response for a variety of applications has been enhanced. Future research based on these results must be devoted to coupling different types of biological crystals to produce the first semiconductor based on proteins for the new bioelectronics in the near future.

Acknowledgment. One of the authors (A.M.) acknowledges financial support from the DGAPA-UNAM project number IN214506 as well as CONACYT for the scholarship of Dr. Ma. Liliana Marín-García for the postdoctoral stage at the Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. B.A.F.-U. acknowledges financial support from the DGAPA-UNAM project No. IN212207-3. The authors appreciate very much the revision of English style done by Ms. Antonia Sánchez Marín.

References

- (1) Wu, Y.; Hu, S. *Microchim. Acta* **2007**, *159*, 1–17.
- (2) Yao, Y.; Kwok-Keung, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 303–309.

- (3) Campuzano, S.; Pedrero, M.; Montemayor, C.; Fatas, E.; Pingarron, J. M. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 299–304.
- (4) Murphy, L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 177–184.
- (5) Brautigam, D. L.; Ferguson-Miller, S.; Margoliash, E. *Methods Enzymol.* **1978**, *53*, 128–164.
- (6) Zheng-Zhi, Y.; Guang-Chao, Z.; Xian-Wen, W. *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 992–993.
- (7) Yun-Chun, L.; Shi-Qiang, C.; Zhou-Sheng, Y. *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 1071–1074.
- (8) Dai, Z.; Liu, S.; Ju, H. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 2139–2144.
- (9) Mirkin, N.; Jakoncic, J.; Stojanoff, V.; Moreno, A. *Proteins: Struct. Funct. Bioinformatics*, in press.
- (10) Heinze, J. *Top. Curr. Chem.* **1990**, *152*, 1–47.
- (11) Brahim, S.; Wilson, A. M.; Guiseppi-Elie, A. In Skotheim, T. A., Reynolds, J., Eds.; *Handbook of Conducting Polymers*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, **2007**; Vol. 2, Chapter 12, pp 1–45.
- (12) Cho, S. H.; Song, K. T.; Lee, J. Y. In Skotheim, T. A., Reynolds, J. Eds.; *Handbook of Conducting Polymers*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2007; Vol. 1, Chapter 8, pp 1–87.
- (13) Gill, A.; Lillie, G.; Farace, G.; Vadgama, P. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2005**, *85*, 699–725.
- (14) Guimard, N. K.; Gomez, N.; Schmidt, C. E. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 876–921.
- (15) Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A.; Malinauskas, A. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 6025–6037.
- (16) Ouyang, J.; Yang, Y. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2141–2144.
- (17) Hernández-Pérez, T.; Mirkin, N.; Moreno, A.; Rivera, M. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2002**, *5*, 37–39.
- (18) Wang, J. *Analytical Electrochemistry*; Oxford University Press: Oxford, 2000; Chapter 2.
- (19) Hasse, U.; Scholz, F. *Electrochem. Commun.* **2001**, *3*, 429–434.
- (20) Kuleza, P. J.; Faulkner, L. R.; Chen, J.; Klemperer, W. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 379–381.

CG7009463

DE LOS CRISTALES DE CITOCROMO-C A UN DISPOSITIVO TRANSFERENTE DE ELECTRONES EN ESTADO SÓLIDO
(From Cytochrome *c* Crystals to a Solid-State Electron-Transfer Device)

Protocolo y desarrollo experimental.

Objetivo general:

Evaluación de la influencia de los procesos de transporte (convección, difusión y electro-migración) en cristalización de proteínas por seguimiento de la evolución hidrodinámica a través de técnicas de dispersión dinámica de luz. Con aplicación al desarrollo de un biosensor transferente de electrones, a partir de cristales de citocromo-c.

Introducción:

La búsqueda de nuevos procedimientos para el crecimiento de cristales de proteínas nos lleva a tratar de comprender mejor los procesos que intervienen en la cristalización y cuales son sus variables, así como la posibilidad de modificar o controlar a estas para la obtención de cristales cada vez de mayor calidad. La identificación de las variables que intervienen, se lleva a cabo con un seguimiento de la cristalización, cambiando estas posibles variables e identificando su aportación en la cristalización.

Con las ventajas que nos provee un análisis por dispersión dinámica de luz, en el que se obtiene una cantidad de datos integral del sistema en tiempo real, sin dañar la muestra y con la capacidad de medición de moléculas de proteínas y sus agregados, nos permite seleccionarlo como un método adecuado para el monitoreo de cristalización de proteínas, aunado a esto se pretende en el experimento adecuar al método para poder realizar una electrocristalización y darle el seguimiento mediante dispersión dinámica de luz.

El mecanismo para el crecimiento de cristales de proteínas a través de electrocristalización se ha estudiado por separado para la evolución de la nucleación y para la cristalización, se pretende con este trabajo dar un panorama en el que se tenga de manera conjunta como es que evoluciona el sistema al pasar por el proceso de nucleación, donde se va dar la formación de una nueva fase sólida sobre nuestra fase líquida, que va a servir como precursor de los cristales, para después pasar a la fase de cristalización donde se tiene el crecimiento de cristales con la adición de capas de nuestro soluto (proteína).

Para lograr las condiciones de cristalización es necesario que se lleve al sistema un estado de sobre saturación, ya sea mediante la modificación de la temperatura, del pH, cambio de concentración (evaporación del solvente) o la manera más común es la adición de un agente precipitante, el cual nos permite con una concentración menor de proteína tener una saturación; ésta sobresaturación es la que va regir el crecimiento de los cristales y nos va determinar la velocidad con la que se están formando los núcleos y se está dando el crecimiento de los cristales, por lo que se debe alcanzar un óptimo, en donde la velocidad

nos permita que no se formen demasiados núcleos y tengamos un mayor crecimiento de los cristales y con mejor calidad.

Una vez que se han obtenido las condiciones de cristalización, la calidad de los cristales se puede controlar mediante el control de los procesos convectivos, difusivos y de migración en el sistema. Al aplicar un campo eléctrico al sistema se puede propiciar la migración, ya que en muchos de los casos las proteínas se encuentran en un buffer que les hace estar lejos del punto isoeléctrico, con esto provocamos que el crecimiento de cristales sea más uniforme, ya que la adición se da de manera más controlada y en un sentido determinado y no de manera aleatoria como se da en un crecimiento sin campo eléctrico. Para controlar la convección se pueden establecer sistemas de microgravedad o utilizar un método de crecimiento en capilares, donde por el pequeño tamaño del radio el término convectivo se vuelve despreciable y para nuestro caso el emplear un gel para la cristalización limita la convección dentro de nuestro sistema al formar una fase poco móvil dejando como predominante a los procesos difusivos. Al juntar el gel con el campo eléctrico obtenemos cristales de mejor calidad ya que estamos controlando más el proceso al dejar dominantes solo la difusión y la migración.

Para realizar un seguimiento in situ de los procesos de nucleación y crecimiento de cristales se tomó como método de análisis la dispersión dinámica de luz, que nos permite dar seguimiento a la formación de pequeños agregados que serían invisibles a un microscopio hasta grandes agregados que ya serían precursores de cristales o pequeños cristales, no es un método destructivo, por lo que nos permite realizarle mediciones consecutivas sin dañar la muestra y con esto seguir toda la evolución del proceso.

La dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering (DLS) también conocida como PCS - Photon Correlation Spectroscopy) mide el movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas, esto es realizado iluminando las partículas con un láser y analizando la fluctuación en la intensidad de la luz dispersada. Este análisis se realiza al hacer una comparación entre mediciones a tiempos consecutivos muy pequeños y se establece que tan cercana es la correlación entre una y otra medición; se realizan varias mediciones es decir se toma una medición a un tiempo = t y la siguiente medición se toma a $(t+\delta t)$, después a $(t+2\delta t)$, $(t+3\delta t)$, $(t+4\delta t)$, $(t+5\delta t)$ y así sucesivamente para generar un esquema de correlación. El movimiento Browniano se relaciona con el tamaño de la partícula mediante la ecuación de Stokes-Einstein, en la cual partículas de gran tamaño tienen un movimiento lento mientras partículas pequeñas tienen un movimiento rápido y esto a su vez provoca que partículas con movimiento rápido provoquen una gran fluctuación en la luz dispersada y con esto tengan una correlación menor mientras que las partículas más lentas tienen una fluctuación menor y por esto una correlación mayor. En el análisis se puede establecer la cantidad presente de cada especie en función de la intensidad de la luz dispersada y el volumen que se genera con el ángulo barrido por la dispersión. Para poder medir disoluciones a concentraciones variables, es decir bajas o altas, se varía la intensidad del láser que incide en la muestra mediante un atenuador. La medición de dispersión dinámica de luz generalmente se realiza a 90° pero en nuestro caso el equipo

empleado utiliza una medición a 173° NIBS (Non-Invasive Back-Scatter) que nos permite eliminar algunos efectos de dispersión múltiple, mediciones de altas concentraciones entre otras ventajas. El láser empleado puede variar para estos equipos entre 532nm con un láser verde y de 633nm con un láser rojo teniendo como diferencia el rango de medición de tamaño y para el tipo de muestras de color.

En la teoría para el DLS, básicamente se establece una relación entre la dispersión por las proteínas con sus propiedades donde el exceso de la intensidad de la dispersión por unidad de volumen y el ángulo de la dispersión se normalizan con la intensidad del rayo incidente, expresada en la dispersión de Rayleigh. Dependiendo del tipo de sustancia a medir o analizar es como se realizan adaptaciones a la teoría para sistemas idealmente globulares que es el que se emplea para proteínas, también se realizan correcciones para sistemas en los que hay interacción entre las moléculas del sistema a analizar, por estas correcciones o adaptaciones se establece una especificación completa de sistema a analizar sobre el software del equipo, que es el que va realizar los cálculos basándose en estos parámetros que se establezcan.

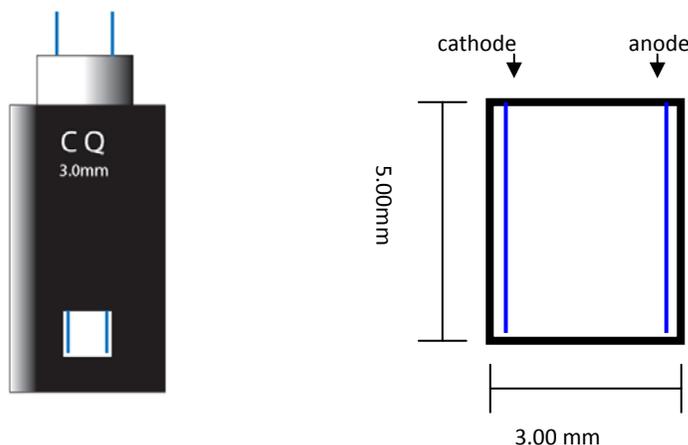
Con el desarrollo tecnológico, la implementación de nuevos biomateriales con propiedades específicas adquiere una gran relevancia, como es el caso del desarrollo de biosensores que nos permitan lograr tareas como detección selectiva, que nos permitan tener compatibilidad con seres vivos- para su uso en estos- , o que nos brinden propiedades de semiconducción específicas. Por esto en la segunda fase del experimento se pretende establecer bases del desarrollo de un biosensor, realizando sobre éste pruebas de función y estructura topográfica, a través de microscopia de fuerza atómica (AFM), técnica que nos permite obtener una gran definición sobre la estructura del biosensor, en nuestro caso del cristal, sin ser destructiva y al mismo tiempo al emplear el modulo electroquímico del AFM nos permite revisar el funcionamiento del biosensor.

Las bases bajo las que funciona la microscopia de fuerza atómica, son las fuerzas generadas por la proximidad de los átomos, al emplear un cantiléver que posee una punta de terminación lo más próxima a un átomo que barre la superficie de la muestra y genera fuerzas de atracción y repulsión entre el átomo de la punta y los de la superficie de la muestra, provocando una deflexión en el cantiléver, que por la incidencia de un haz de laser sobre éste y su desviación es traducido a impulsos eléctricos, que a su vez son interpretados por el software para generar una imagen tridimensional del sistema. Con el uso del modulo electroquímica se pueden realizar pruebas de voltamperometría cíclica, que evidencien la transferencia electrónica por parte del biosensor. Otro método tentativo para evidenciar la transferencia electrónica es por pruebas de efecto túnel en el mismo AFM, siendo éste, otro de los modos que posee para generar imágenes.

Uno de los ejemplos más comunes de biosensor es el que mide la glucosa en la sangre. Utiliza una enzima que procesa moléculas de glucosa, liberando un electrón por cada molécula procesada. Dicho electrón es recogido en un electrodo y el flujo de electrones es utilizado como una medida de la concentración de glucosa. Por lo que el desarrollo de biosensores tiene una gran promisoriedad en el desarrollo de nueva tecnología que permita darles aplicaciones cotidianas y de gran utilidad

Método y material:

El análisis de la evolución de la electrocristalización fue in situ, mediante el uso de dispersión dinámica de luz (DLS) con un equipo de la serie Zetasizer nano, modelo: nano s, láser 633nm, ángulo de medición 173° NIBS (Non-Invasive Back-Scatter), de Malvern. Para poder realizar la electrocristalización se modificó una celda de bajo volumen 45µL, se adicionaron los electrodos a la celda según la siguiente disposición.



Para los electrodos se empleó alambre de platino de 0.25mm de diámetro (99% de pureza, Aldrich, serie 349402-1.5G, lote 08206TA), para estos electrodos la longitud que interviene en la cristalización es la misma de la ventana de la celda.

El campo eléctrico se impuso empleando un equipo diseñado especialmente para generar una corriente eléctrica constante al variar el voltaje en el circuito y que su rango de corriente eléctrica nos permitiera manejar los 0.8µA reportados como óptimos en la electrocristalización.

Para realizar el análisis de la electrocristalización primero se determinó el comportamiento hidrodinámico del Citocromo-c (De corazón bovino, pureza de 102% basada en contenido de agua, Sigma, lote: 083k7037, serie: 9007-43-6, Ec. No. 232 700-9, PM: 12.327), Para este análisis se seleccionó una concentración relativamente baja de 1.5 mg/mL de la proteína disuelta en buffer de fosfato de sodio de concentración 50mM y pH 7.0 reportado como buffer en el que la proteína se ha cristalizado. A esta misma concentración se realizó un barrido de temperatura, para determinar la óptima en la que la especie precursora se encuentra en mayor proporción como monómeros, condición que favorece la obtención de cristales de la proteína.

Una vez registrada la temperatura óptima, se realizó la electrocristalización al mezclar en proporciones iguales(1:1) 25µL de una disolución de Citocromo-c con concentración de 62mg/mL y 25µL de precipitante 50% PEG-1000, ambos se prepararon en buffer de fosfato de sodio 50mM y pH 7 para asegurar que se mantenía el pH. La corriente impuesta

para la electrocristalización fue de $0.8\mu\text{A}$ y el proceso se monitoreo continuamente por DLS.

De manera complementaria se realizó un análisis de la interacción del agente precipitante y la proteína a la mitad de la concentración reportada para su cristalización 31mg/mL (concentración final), también se observó la influencia del campo eléctricos sobre el sistema precipitante más proteína a la misma concentración.

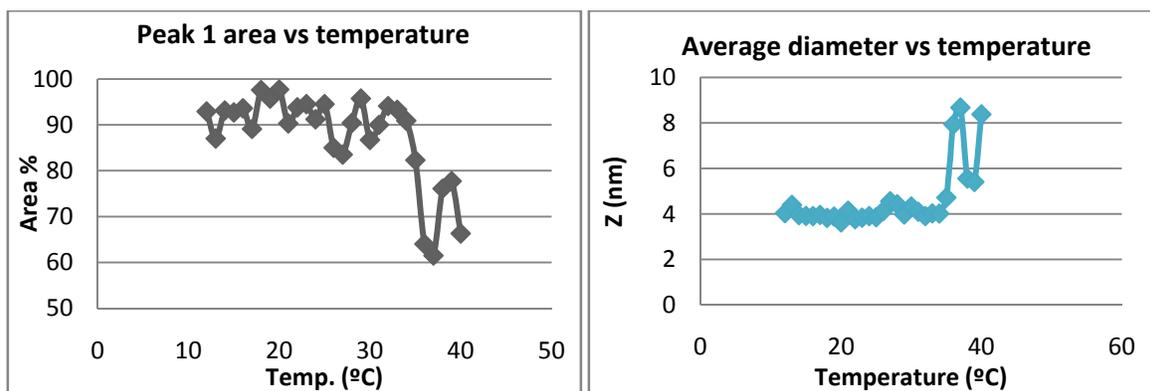
Resultados, Fase 1:

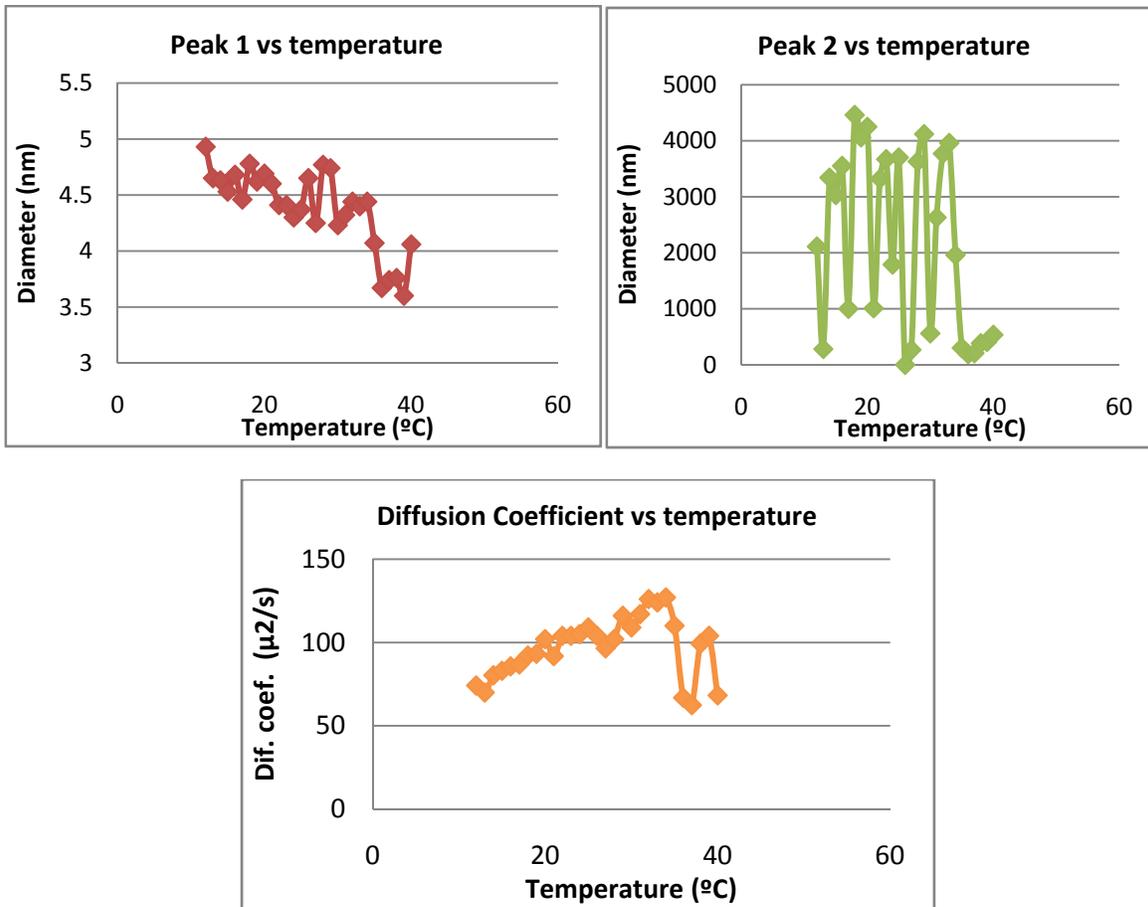
(Las menciones pico 1, 2 y 3 hace referencia a las especies registradas por el DLS, donde en cada pico nos muestra especies de diferentes tamaños, generalmente de diferencias de algunos ordenes de magnitud, dependiendo de la presencia de cada especie se coloca en pk1, pk2 o pk3 al priorizarse cada una en el software .

Electrocristalización de citocromo:

A): Trend de proteína en buffer concentración 1.5mg/mL

En la primera parte se revisó la estabilidad de la proteína en un buffer a diferentes temperaturas en donde se logró determinar que la temperatura óptima para realizar el experimento fue de 18 grados centígrados, debido a que cuando se fue incrementando la temperatura, las especies de agregados aumentaban su tamaño (una posible causa fue el tiempo de residencia que se tenía, pero esto nos hace ver que la temperatura no produce una mayor eficiencia en la solubilidad con respecto a la producción de monómeros), por esto una cristalización a menor temperatura permite que la difusión sea más lenta y con esto que el proceso de cristalización se dé más eficientemente y no tenga problemas con la velocidad de la cinética del crecimiento del cristal limitada por propiedades superficiales, es decir nos permite más fácilmente llegar a un equilibrio entre la cinética y el transporte de masa durante el crecimiento del cristal . Debido a esto la selección de la temperatura fue en la que se tuviera en términos de porcentaje la presencia más alta de monómero y se encontró que entre los 17 y 19 grados centígrados tenemos una zona donde se mantiene alta la cantidad de monómeros. (en área se representa el porcentual de la especie que esta como monómero)



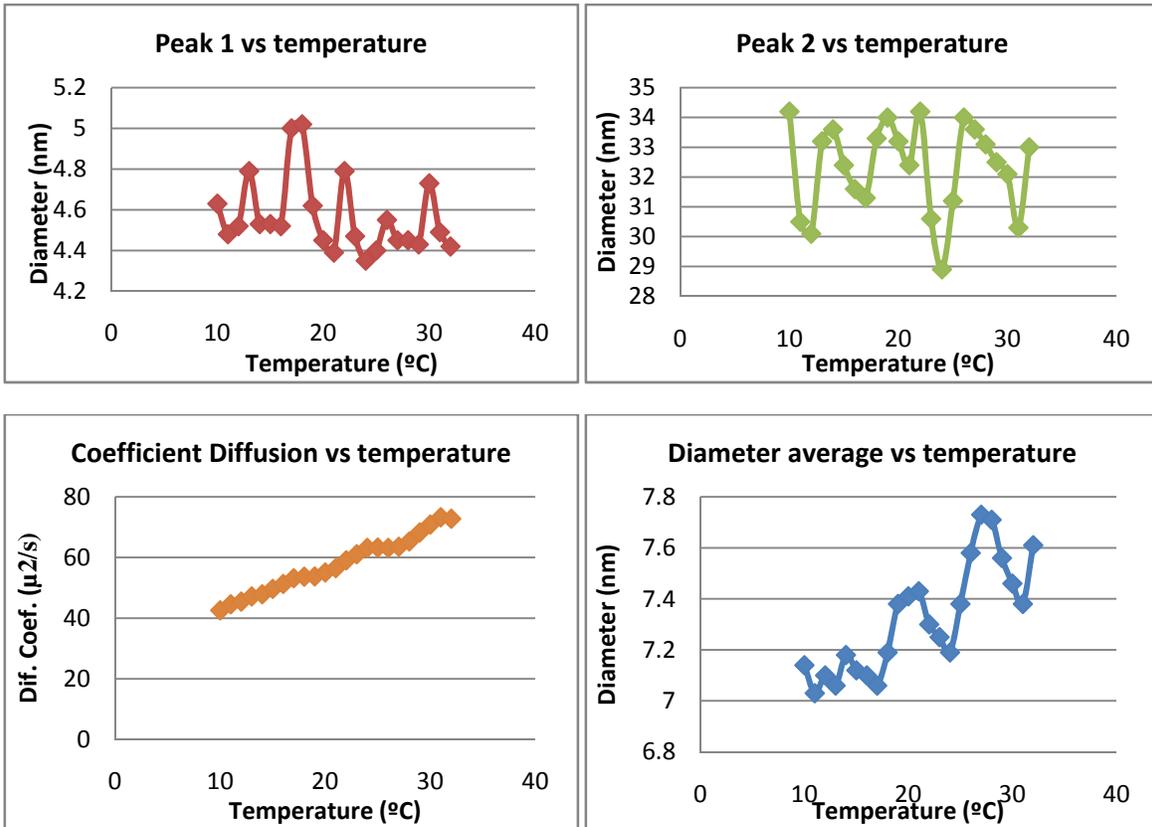


Aquí podemos observar que la temperatura tiene una gran influencia en el coeficiente de difusión debido al aumento de movimiento de las moléculas que a su vez se refleja en el tamaño registrado para el monómero donde al aumentar la temperatura disminuye el diámetro (el rango de variación del diámetro es pequeño), se alcanza el diámetro reportado en el otro trabajo, a temperaturas altas, siendo cercano a los 3.6, cuando el reportado está en 3.4, también podemos observar como la especie que se agrega, por estabilidad, está oscilante pero su tamaño se mantiene alrededor de los 3800kDa aunque la temperatura varíe.

En el coeficiente de difusión tiene un crecimiento promedio con la evolución del sistema, por lo que en la última zona, al aumentar los agregados, se obtiene una mayor contribución y tienen una difusión menor, que da la caída del coeficiente de difusión. El diámetro promedio se mantiene constante hasta que la influencia de la presencia de mayor cantidad de agregados influye y crece su tamaño.

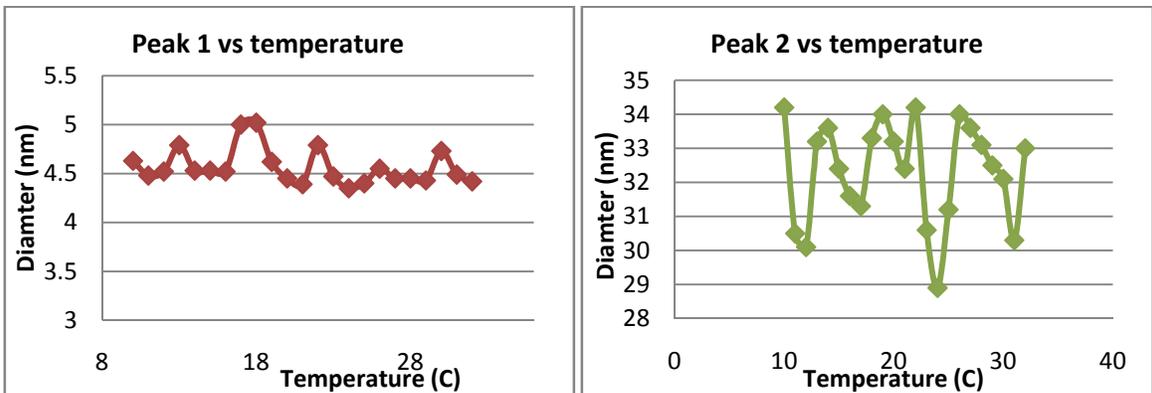
Para corroborar la estabilidad de la proteína y la independencia de esta en la concentración se realizó el experimento a dos concentraciones más, debido a que la concentración para cristalizar es muy alta.

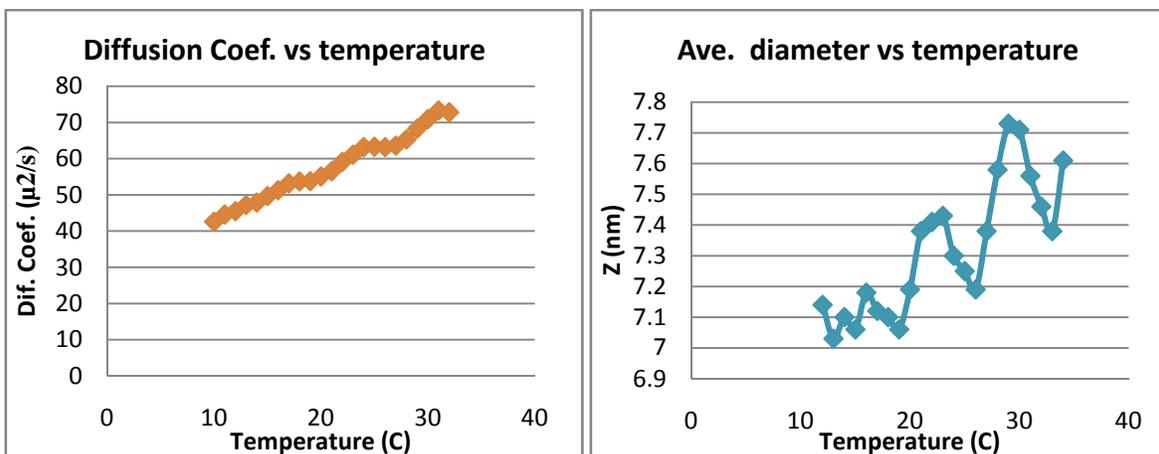
3.1mg/ml de proteína →



El monómero se mantiene relativamente constante, el rango en que varía es muy pequeño, la especie de agregados sigue presente pero es mucho más pequeña, está alrededor de los 33nm. y no se ve un cambio considerable con la temperatura. El coeficiente aumenta con la temperatura por un mayor movimiento y no decae por que los agregados no son muy grandes.

31 mg/ml de proteína →





En esta parte corroboramos el radio hidrodinámico que se mantiene relativamente y tiene un valor promedio de 4.5nm siendo éste el valor que se obtiene con más frecuencia en todos los análisis, es decir para todas las concentraciones analizadas el valor promedio en la medición podría ser 4.5nm. También podemos observar como en todas las concentraciones se mantuvo el mismo comportamiento siendo muy similares los resultados entre sí.

B) Influencia del precipitante:

Como precipitante se empleo PEG-1000 que tiende a polimerizar y debido a esto se realizó también un estudio por DLS de la influencia que podría tener dentro del el sistema de cristalización y se observó que al variar la temperatura de 10 a 26 °C no había un cambio considerable en las especies presentes del PEG por lo que se opto por tomar la misma que la que se seleccionó para la proteína, las especies registradas a ésta temperatura son de 0.655, 220 y 3610nm por lo que al realizar cualquier cristalización se debe tener en consideración estas zonas. (se observo que al estar presente la proteína la corrección en el software hacía que prácticamente desapareciera la influencia del precipitante)

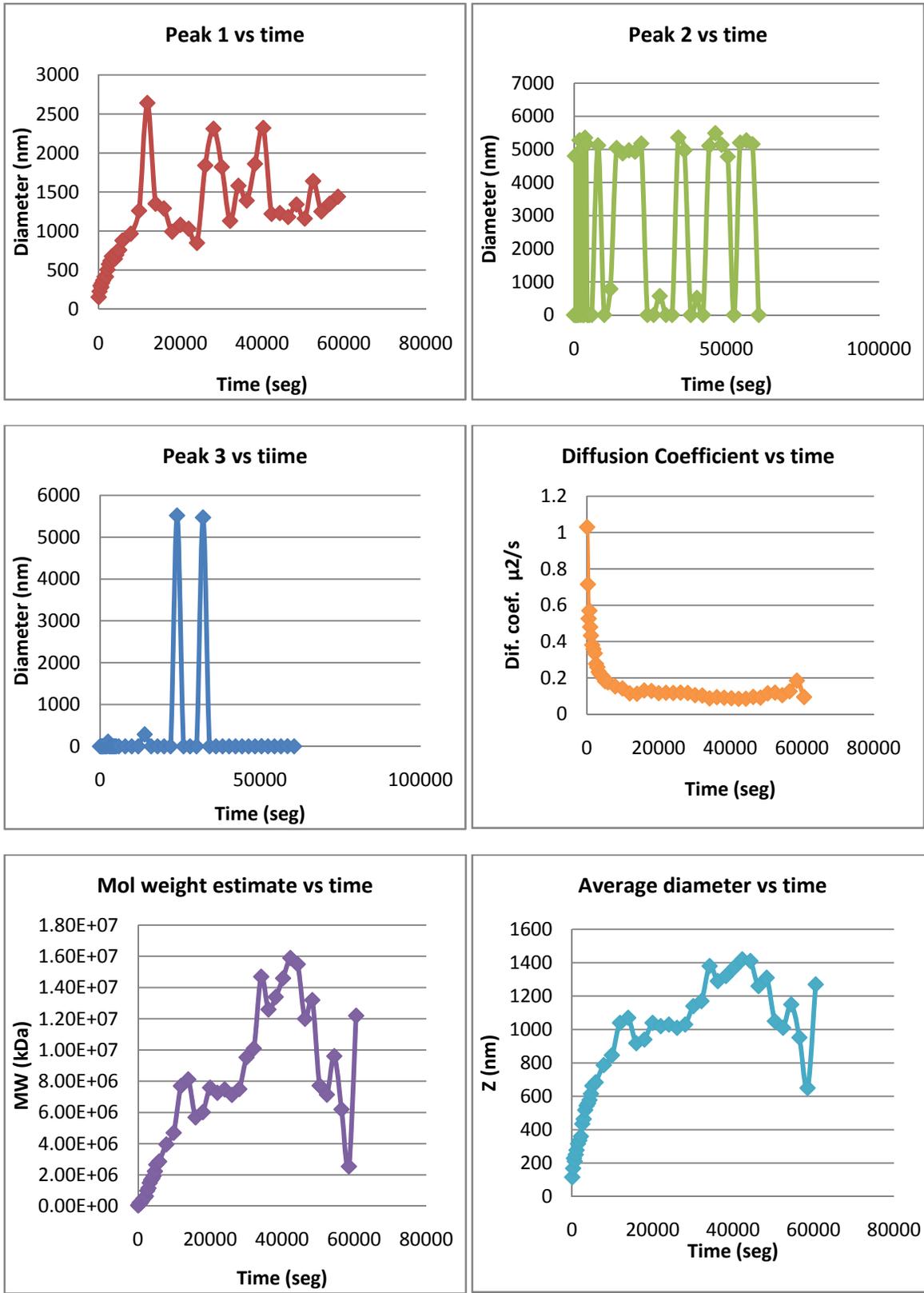
C) Interacción proteína - precipitante:

En ésta fase se pretendía determinar la influencia que tiene el precipitante sobre la proteína:

De manera inicial se llevó a cabo el experimento sobre una la concentración de 31mg/ml al adicionar 25 μL de proteína en buffer y 25 μL de precipitante en buffer también. Pero la alta concentración complicó la toma de datos en el DLS.

Por está razón se propone el análisis que se llevo acabo a una concentración más baja, 3.1mg/ml

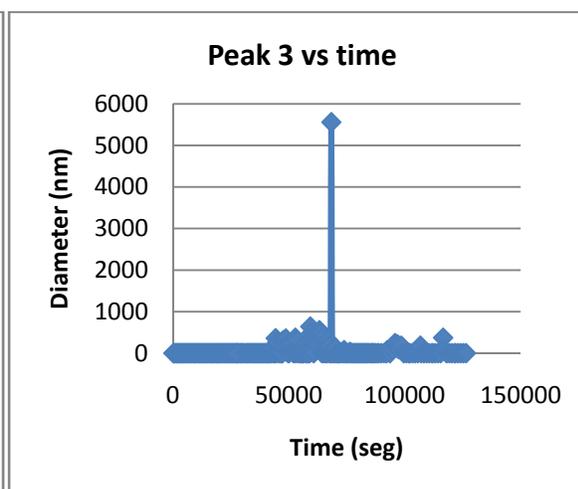
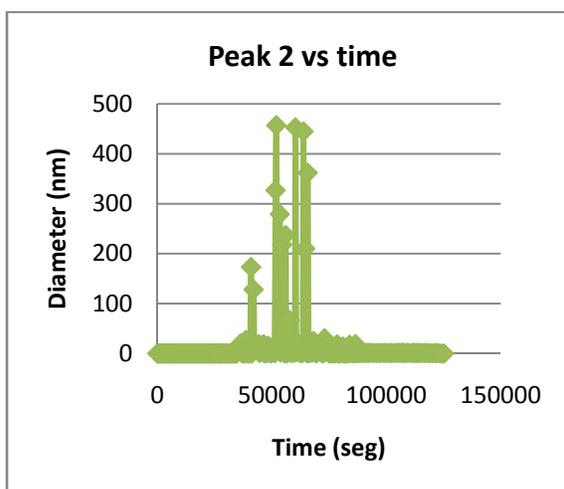
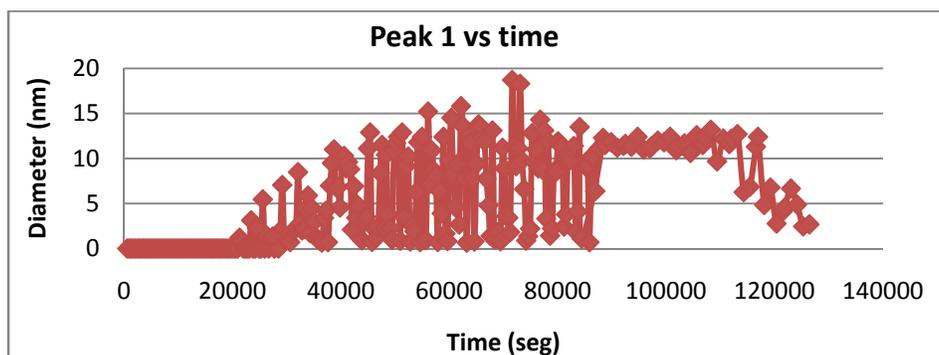
Graficas de evolución hidrodinámica al agregar proteína y precipitante



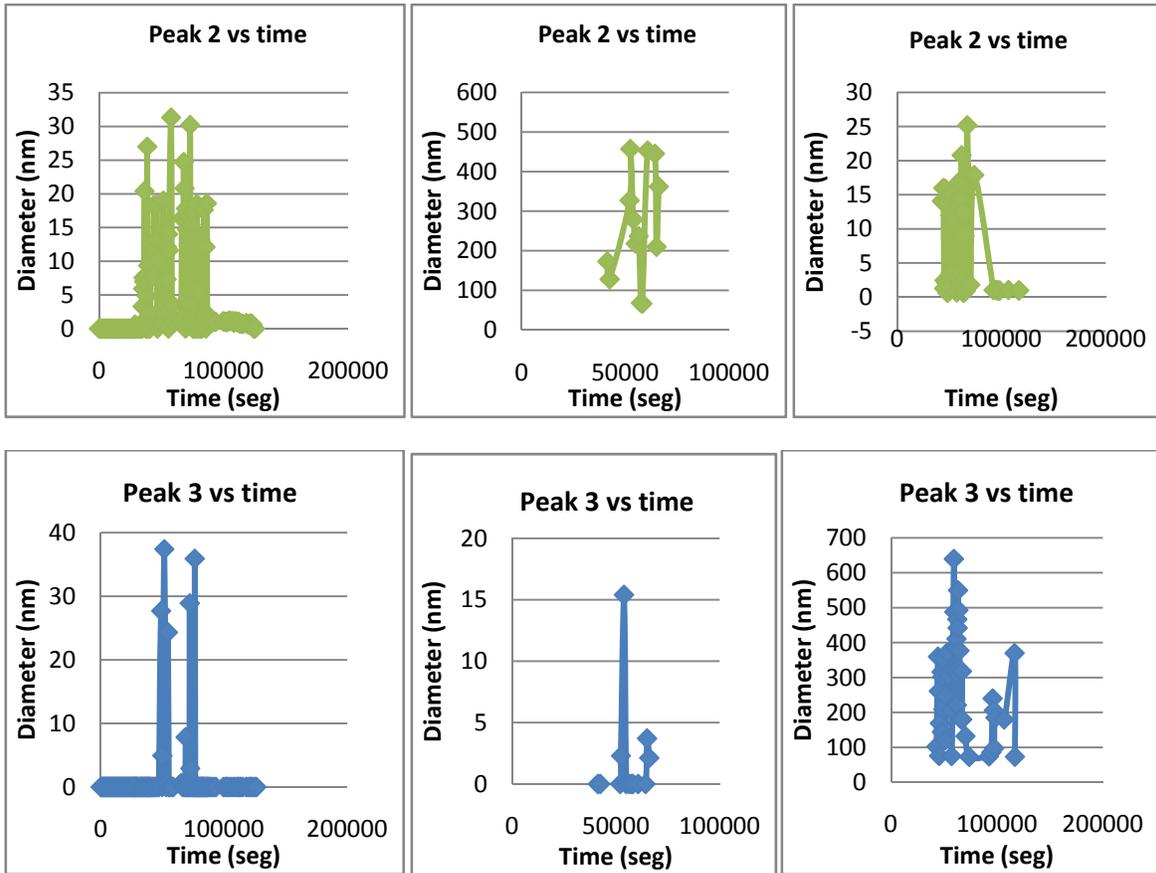
En esta fase del experimento se puede observar la interacción del precipitante que elimina a los monómeros dejando solo una especie de agregados que va creciendo con el tiempo desde los 150nm hasta los 1500nm, haciéndose presente esta especie en el pico 1, mientras que para la especie que aparece en el pico 2 y 3 siendo la misma por el tamaño registrado cercano a los 5500nm el cual no crece, por lo que se podría atribuir al registrado en 3600nm para el PEG pero desplazado por las interacciones. El coeficiente de difusión disminuye conforme van aumentando los agregados en el sistema, debido a la menor movilidad de especies más grandes, el crecimiento que se da de los agregado es muy marcado al observar la gráfica de peso estimado contra tiempo y la de diámetro promedio contra tiempo, en este caso se ve un crecimiento inicial rápido que después disminuye su velocidad por una tendencia a estabilizar el sistema ya que las condiciones de concentración no son las óptimas reportadas para la cristalización, mismo esquema que se ve observado en el pico 1 donde crece inicialmente rápido y después se estabiliza hacia permanecer un poco más constante.

D) Electrocrystalización de la proteína:

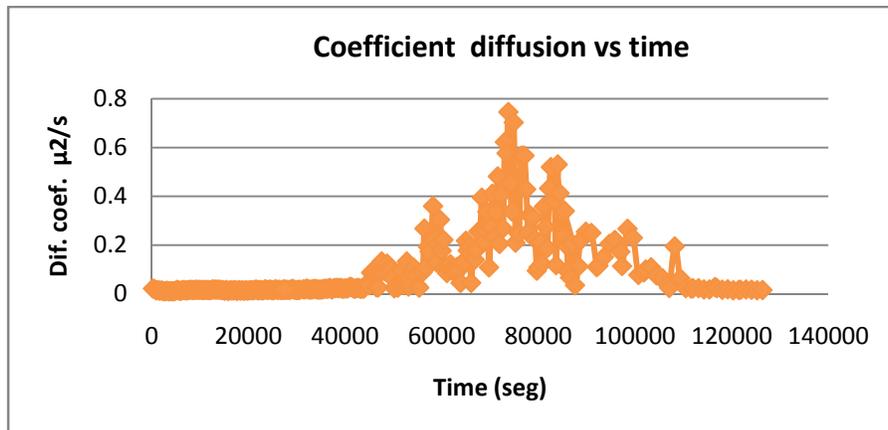
En esta fase se llevó a cabo la electrocrystalización a las condiciones de concentración reportadas para la cristalización y aplicando un campo eléctrico de 0.8mA

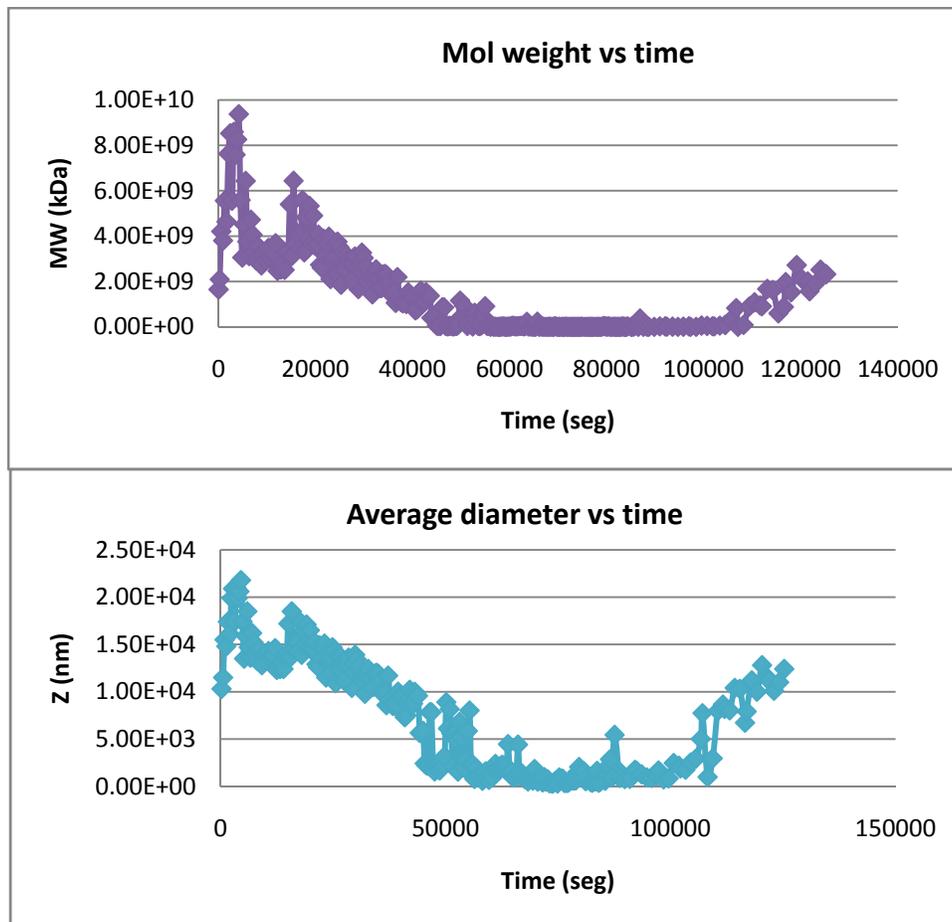


Separando los picos, para separar especies, debido a la alta concentración que se emplea.



En donde podemos observar que hay dos especies que se intercalan entre el pico 2 y el 3 según su presencia durante el análisis, la primera es una especie que está entre los 15 y 30nm y la segunda está entre los 200 y 500nm y va creciendo con el tiempo por lo que es una especie de agregado que va creciendo. Estas especies son las mismas solamente se van alternando de pico por su evolución durante el experimento en donde van cambiando de tamaño y con esto cambian las prioridades entre especies.





En esta fase podemos ver que inicialmente la alta concentración del sistema y su agregación provocaban que la medición del tamaño de las diferentes especies presentes sea difícil, hasta que esta concentración disminuye por la electromigración.

En la gráfica de peso molecular estimado podemos ver que inicialmente la alta concentración provoca que el sistema tenga especies muy agregadas.

En el sistema se puede observar que en lugar de tener la tendencia de una cristalización en donde debería de ir disminuyendo la difusión por la formación de agregados y con esto el diámetro promedio debe aumentar y el peso estimado también. Pero en este caso va aumentando la difusión y disminuyendo el diámetro y peso estimado, esto se puede atribuir a que la migración es muy alta con la imposición del campo eléctrico debido a las propiedades de la proteína ya que se tiene un depósito muy alto de la proteína sobre los electrodos, no solo formando una película sino todo un encapsulado sobre el electrodo, esto concuerda con que al consumirse de la solución la proteína para poderse depositar sobre el electrodo, provoca que las mediciones se puedan realizar por que disminuye la concentración.

Al pasar la proteína del seno de la solución al electrodo la concentración en el seno del líquido disminuye y con esto la proteína que se encuentra en la disolución puede estar disuelta más fácilmente por lo que los agregados van disminuyendo hasta que se llega a un equilibrio entre lo que se deposita y lo que se solubiliza de lo que se depositó y con esto ya no siguen disminuyendo el diámetro ni aumentando el coeficiente de difusión por lo que le da la oportunidad al sistema de tender a agregarse y empieza a crecer en la última parte del análisis el diámetro hidrodinámico y el coeficiente de difusión empieza a disminuir.

Conclusiones fase 1:

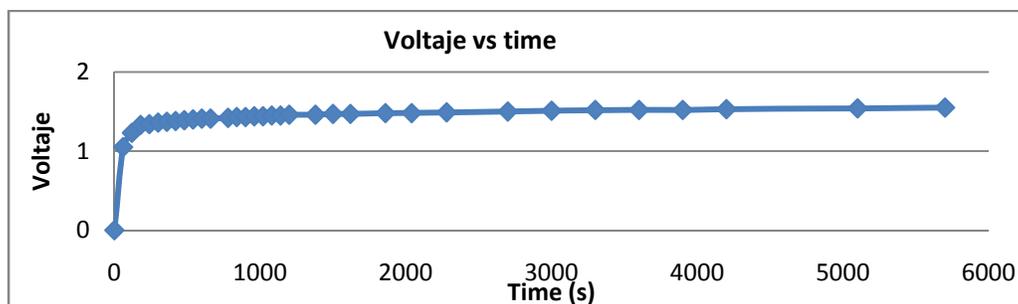
La estabilidad de la proteína sobre el buffer de fosfatos pH 7 es muy buena y factible para la cristalización ya que propicia a que la proteína esté como monómero. La temperatura óptima encontrada a estas condiciones fue de 18°C por las propiedades tanto de la proteína como del precipitante.

La interacción que se tiene entre la proteína y el precipitante nos da una evolución favorable del sistema en el que se tiende a formar agregados que a una concentración específica podrían dar paso a la nucleación y con esto a la formación de cristales.

Una ventaja al emplear este método, es que al usar una proteína con propiedades electroquímicas como el ser transferente de electrones, provoca que la migración hacia el cátodo de esta proteína sea muy importante y hay un transporte muy alto por electromigración. Lo que nos lleva a uno de los logros más importantes en el uso de este método que fue lograr cristalizar la proteína en un tiempo aproximado de 5 días cuando se realizaba en tiempos aproximados a un mes, al mismo tiempo se realizó la cristalización sin la necesidad de hacer una separación de isoformas.

No fue posible diferenciar las isoformas del citocromo ya que son muy semejantes en peso y tamaño por esto las propiedades hidrodinámicas eran muy semejantes y se mostraba sólo una especie y por esto tampoco podía ser diferenciable cual tenía mayor tendencia a depositarse sobre los electrodos. Para esto se necesitó de un análisis por HPLC, dando como resultado la cristalización de la isoforma F1 de citocromo-c preferente sobre la F2

El voltaje varía a través de la cristalización acoplándose a una ecuación de decaimiento exponencial de tercer orden $y = A1 * \exp(-x/t1) + A2 * \exp(-x/t2) + A3 * \exp(-x/t3) + y0$.

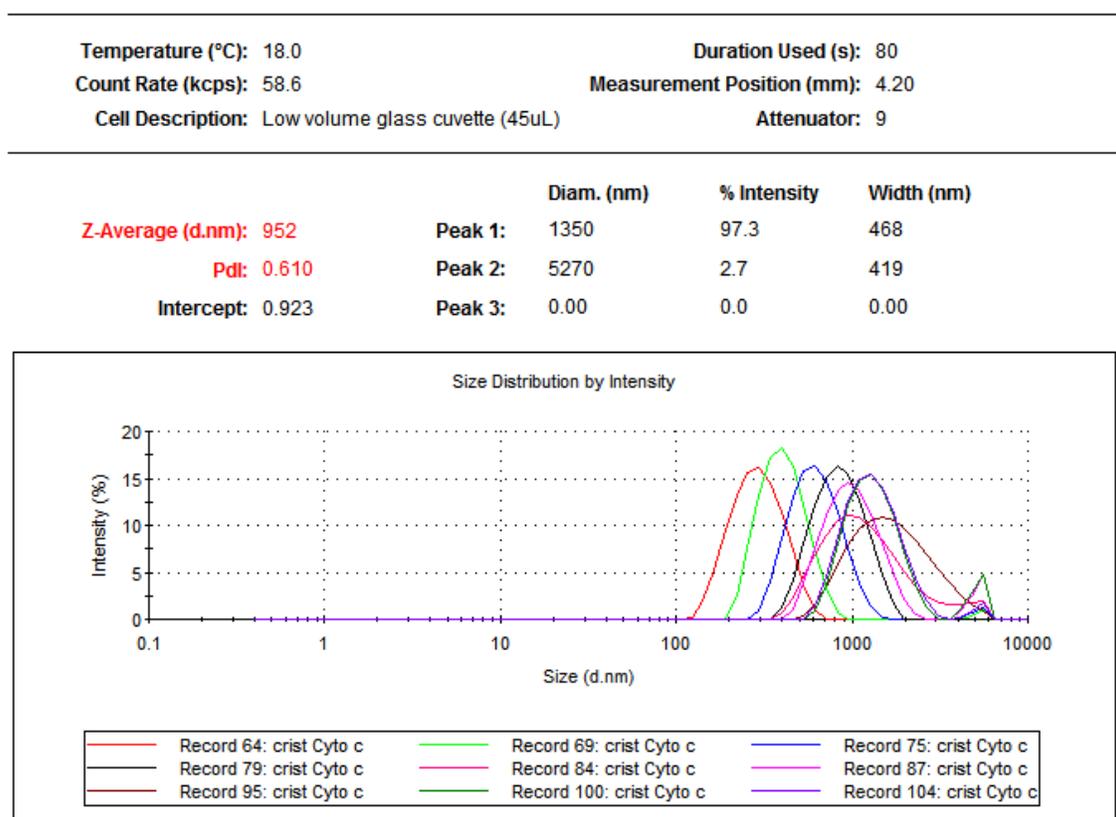


El voltaje tiene un esquema de decaimiento de tercer orden inicialmente aumenta muy rápido hasta llegar a una zona asintótica, pero la diferencia es que aquí no se alcanza una asíntota sino que sigue aumentando el voltaje pero muy lentamente.

Graficas del DLS

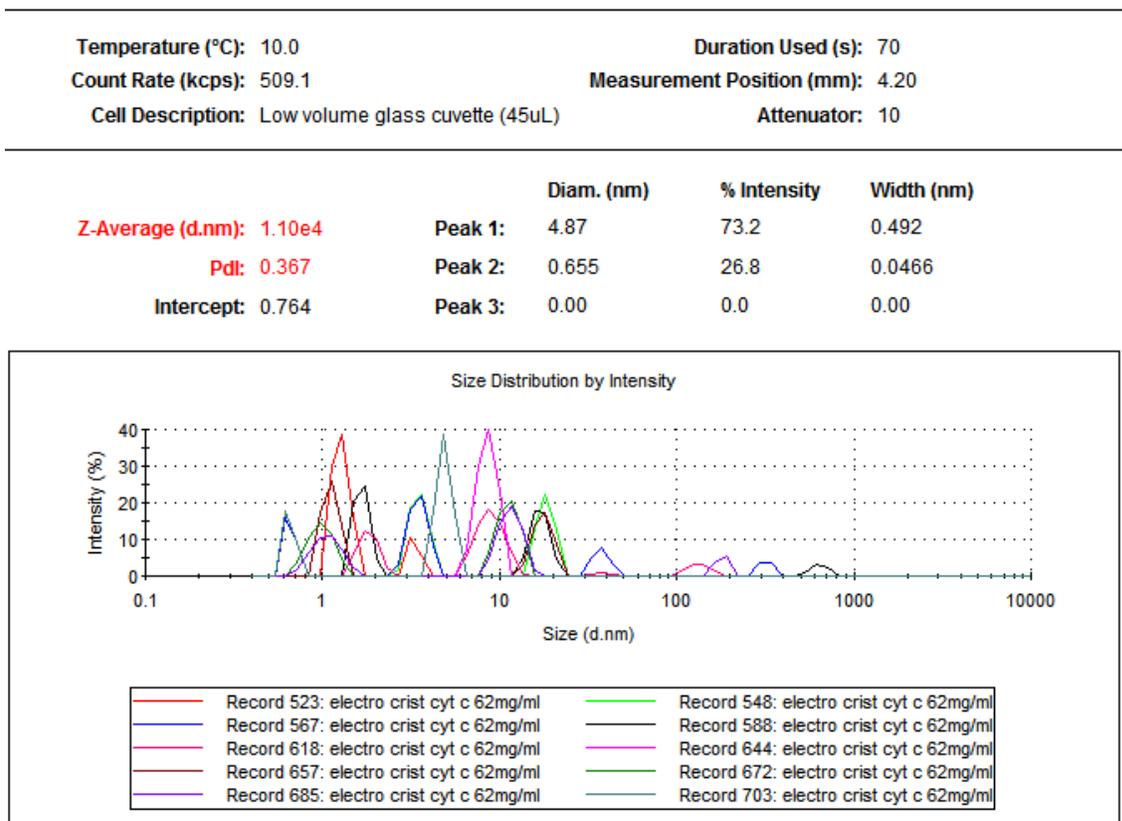
En la siguiente grafica vemos la acción de proteína más precipitante donde ya no hay monómeros y solo hay agregados que van creciendo de tamaño conforme pasa el tiempo.

Interacción proteína y precipitante.

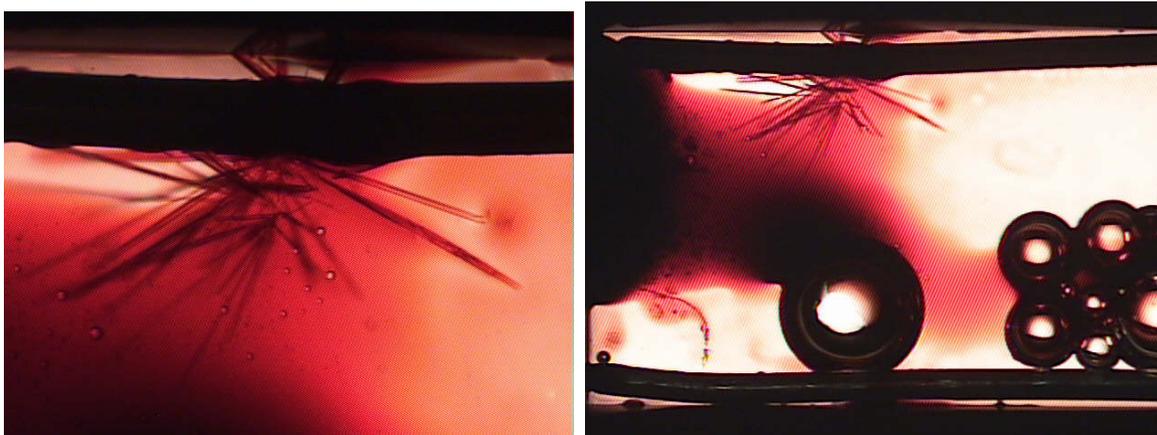


Mientras que para la electrocristalización donde hubo una variación continua de las especies del sistema debido a la imposición de la gran electromigración, que a su vez provoca el consumo de éstas especies al depositarse sobre los electrodos provocando que las especies en disolución no sean estables como se observó en gráficas anteriores. Lo que nos arroja el siguiente esquema de evolución.

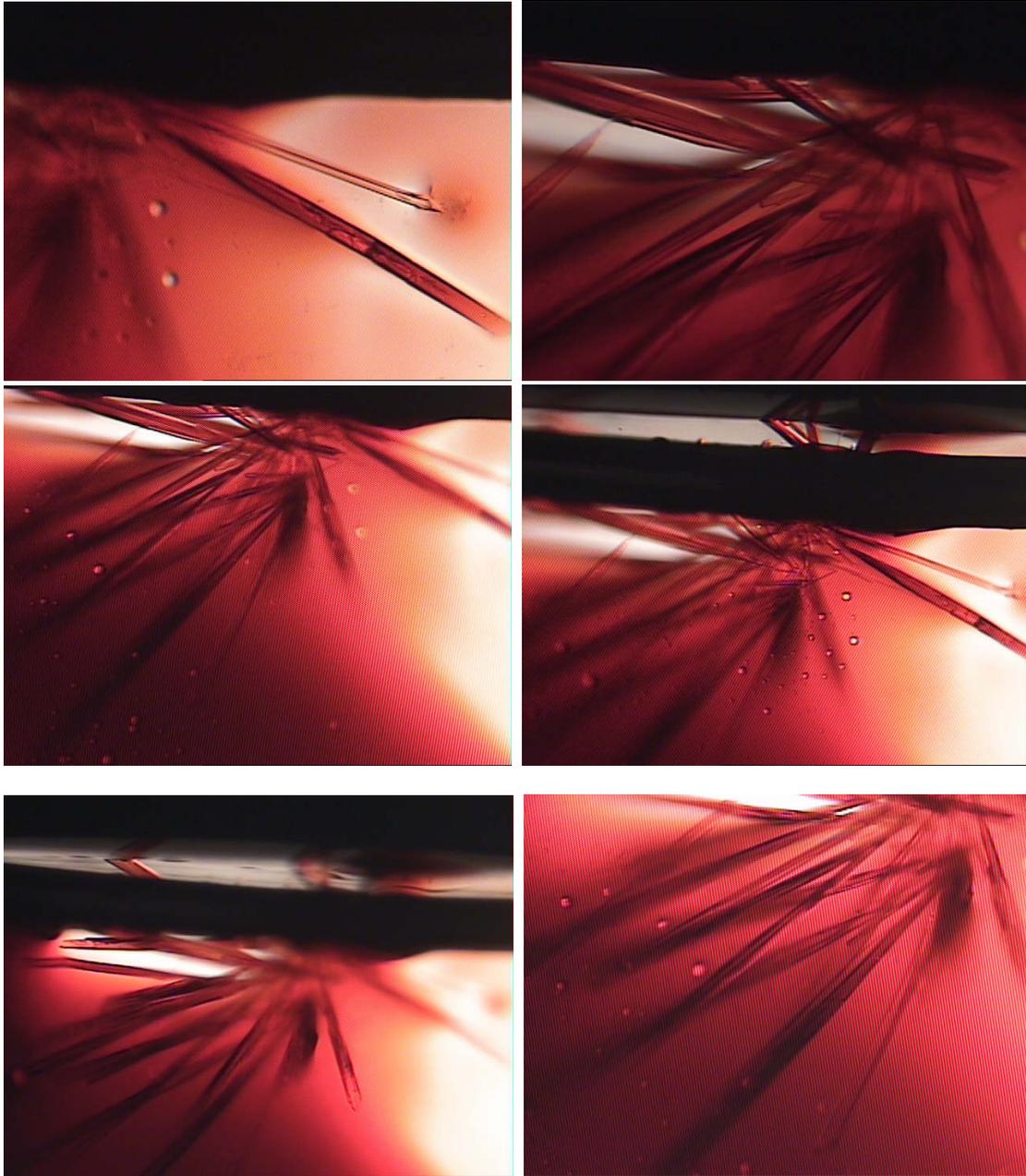
Evolución de la electrocristalización



En las siguientes fotos tenemos los cristales obtenidos de Citocromo-c donde podemos observar como hay una tendencia de la proteína a ubicarse cerca del cátodo, lo que es un indicio de la alta electro migración que se tiene en el proceso, otro indicio son los cristales producidos, los cuales aparecen pegados al cátodo.



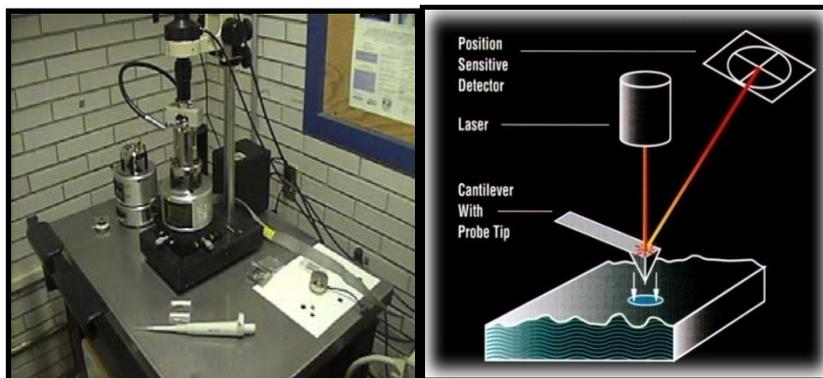
En las siguientes fotografías podemos observar los cristales obtenidos, que presentan una orientación preferencial de crecimiento en el sentido de las líneas de campo eléctrico y también se puede observar como son muy alargados.



Desarrollo y análisis del biosensor.

Para esta fase se empleó el microscopio de fuerza atómica

AFM (Nanoscope IIIa) from DIGITAL Co.



En el que se observó la superficie del electrodo de ITO, del polímero conductor y del cristal por el modo de contacto del AFM. Para asegurar la conducción por parte de ITO y su detección en el piezoeléctrico, se realizó un contacto con tintura de plata y se fijó con pegamento epóxico. A su vez se polimerizó sobre la superficie de ITO, con el módulo de electroquímica del AFM, el polipirrol, que nos permitió fijar el cristal de citocromo y asegurar la transferencia electrónica entre el cristal y el electrodo. En cada paso se revisó la superficie para asegurar la evolución del procedimiento.

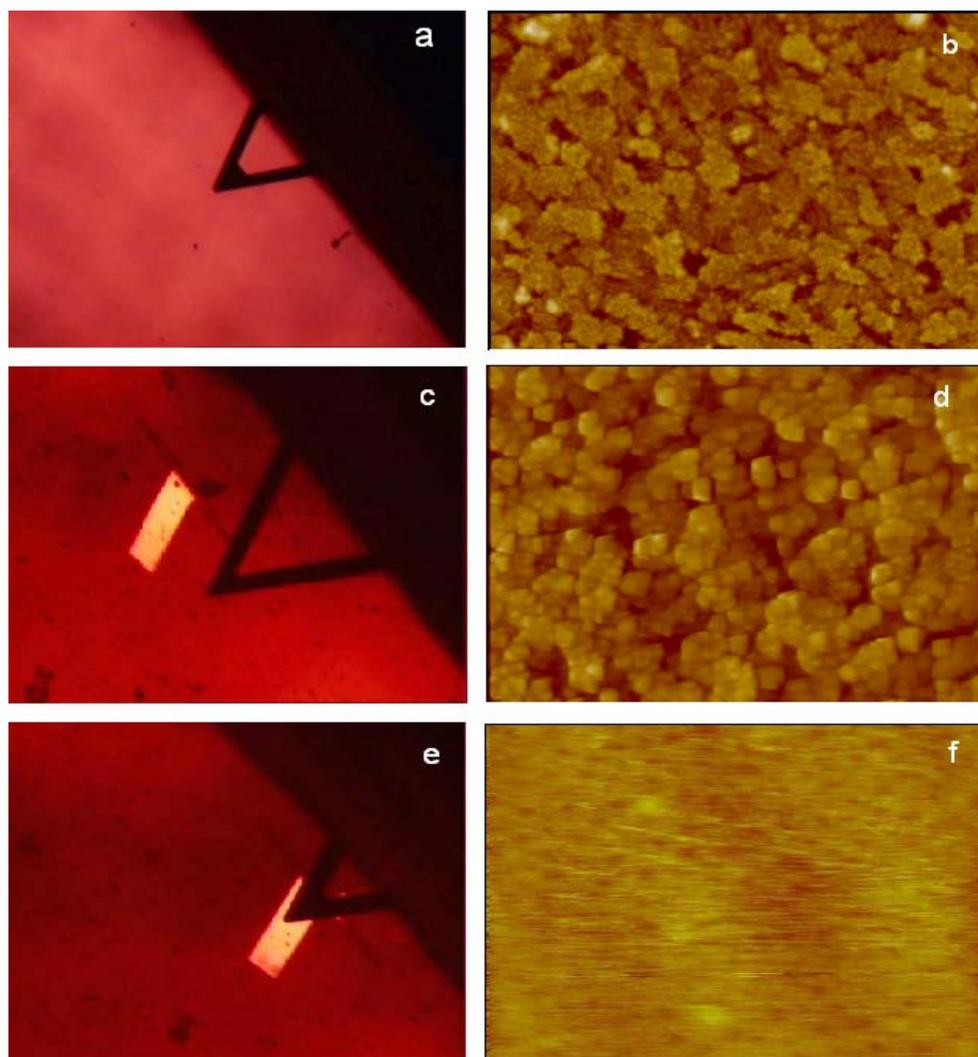
Se realizaron pruebas de voltamperometría cíclica a lo largo del montaje del sensor, la primera fue al polipirrol para usarlo como blanco y referencia en la transferencia que se podría tener por parte del cristal de citocromo, se realizó un depósito de proteína sobre el electrodo por electrocristalización y se le realizó otra prueba voltamperométrica y por ultimo se realizó otra prueba al fijar uno de los cristales ya producidos.

Fase 2:

Una vez obtenidos los cristales de citocromo c se fijaron sobre un electrodo de ITO y se realizaron las pruebas de transferencia de electrones, para probar su posibilidad como base del desarrollo de un biosensor.

Se pretende utilizar un cristal como base del biosensor porque al tener una mayor concentración de la proteína este puede tener una mayor sensibilidad y con esto obtener una mejor detección, o en su caso una mejor transferencia de electrones. El cristal producido se inmovilizó sobre un electrodo de ITO al utilizar como pegamento el polipirrol - polimerizándolo vía electroquímica en su alrededor y asegurando con esto la conductividad del sistema.-

Resultados, Fase 2:

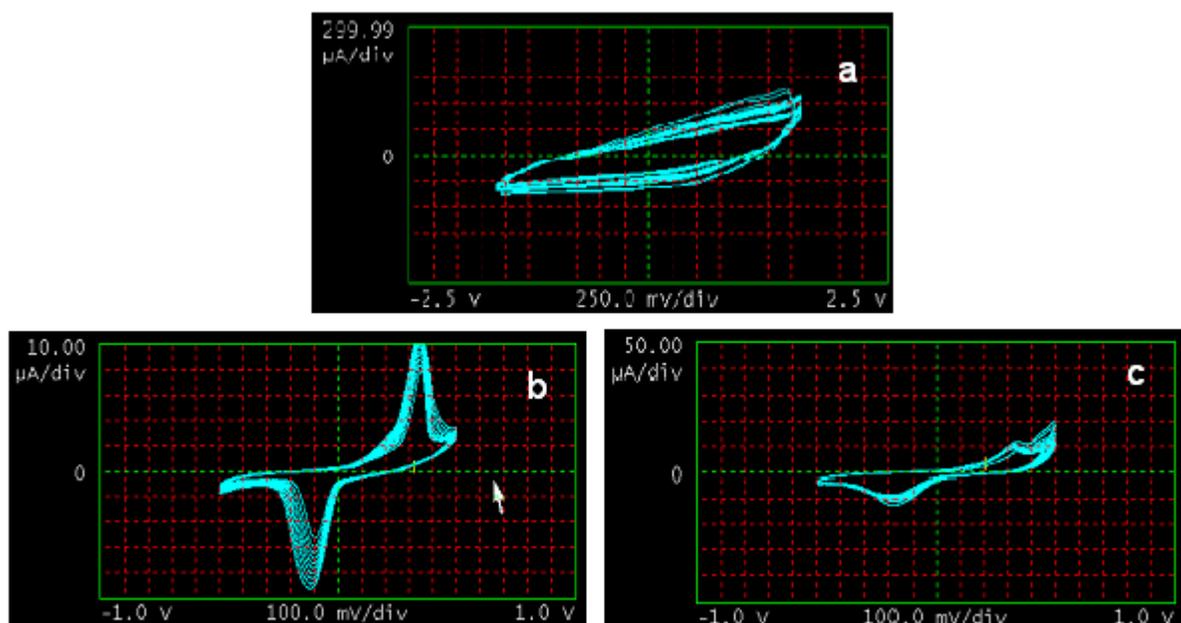


En las imágenes se muestra la superficie del ITO, la superficie una vez depositado el polipirrol y la superficie del cristal, la cual se pudo tomar gracias a que el cristal estaba fijo. Estas imágenes se tomaron por microscopía de fuerza atómica.

La distribución de las imágenes es la siguiente:

a) cantiláver en la superficie del electrodo de ITO; b) 2.5 x 2.5 micras imagen de la superficie del electrodo de ITO; (c) esta imagen nos muestra el escaneo de polipirrol depositado en la superficie ; (d) 2.5 x 2.5 micras esta imagen nos muestra la superficie de la capa de polipirrol depositada; (e) después de la polimerización, el cristal de citocromo fue fijado en la superficie por el polipirrol que aseguraba la conducción; (f) 2.5 x 2.5 micras imagen de la superficie del cristal.

Para comprobar el funcionamiento del biosensor se realizó la siguiente prueba utilizando también el microscopio de fuerza atómica, pero con el módulo de electroquímica, la prueba consistió en realizar un estudio de voltamperometría en el que se obtuvieron los siguientes resultados.



Las imágenes nos muestran dos diferentes respuestas electroquímicas del citocromo c usando una técnica de voltamperometría cíclica: a) *ppy* voltamperograma (control); b) señal de una capa de algunos nanómetros de citocromo c; c) voltamperograma de cristales de citocromo c fijado.

Con esto podemos corroborar como se llevaba a cabo la transferencia de electrones, por las señales producidas.

Adicionalmente, el escaneo de microscopia de túnel (STM) del SPM/AFM también fue usado para confirmar la transferencia de electrones a lo largo de la estructura del cristal pero no se pudo obtener una imagen por este método debido a la estructura del cristal, por lo que la mejor opción para probar la transferencia fue la voltamperometría cíclica.

Conclusión segunda fase:

En las tomas realizadas de la superficie por AFM se pueden observar claramente las diferentes etapas de construcción del biosensor, al corroborar la polimerización del polipirrol y el depósito de citocromo-c en la superficie o también la calidad relativa del cristal al observar su superficie, para lo que debía asegurarse que estuviera bien fijado el cristal al electrodo.

La transferencia electrónica por parte del cristal es satisfactoria ya que podemos observar la variación que se tiene en la intensidad de la respuesta generada por el sistema, así como el voltaje en el que se da la respuesta, esto al realizar respectivamente las pruebas de voltamperometría cíclica en cada condición. Por esto podría ser una buena base para el desarrollo de un biosensor, el cual posee características propias tanto de detección como en la transferencia electrónica como biomaterial conductor.

Se logró de manera satisfactoria probar la transferencia de electrones por el biosensor en estado sólido.

Extras, estandarización con Lisozima:

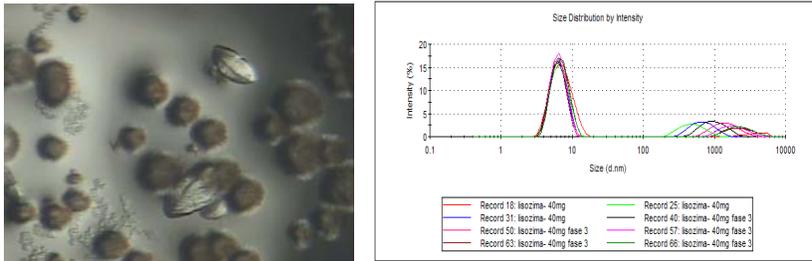
Para poder realizar la electrocristalización del citocromo-c, se realizaron varias pruebas que nos permitieron determinar la influencia de los procesos de transporte (difusión, convección y electromigración), al realizar pruebas con lisozima, seleccionada por ser una proteína muy estudiada y de fácil cristalización, lo que nos permitía tomarle como estándar de nuestras pruebas, para después ser extrapoladas a otras proteínas con diferentes condiciones de cristalización, realizando los ajustes necesarios. Como es el caso del citocromo en el que se impuso electro migración para favorecer la cristalización debido a sus propiedades electroquímicas.

Las pruebas de cristalización se realizaron sobre diferentes proteínas como lisozima, citocromo-c, catalasa, sca-1, obteniendo muy buenos resultados al controlar los procesos de transporte, siendo los más relevantes los de citocromo-c por su disminución de tiempo de cristalización y sin previa purificación de isoformas y en este caso por sus propiedades transferentes para el desarrollo de biosensor.

Los análisis para estandarización con lisozima son extensos, por lo que solo se anexan resultados de estas pruebas sintetizados. Resumidamente se obtuvieron los siguientes resultados en el control de los procesos de transporte:

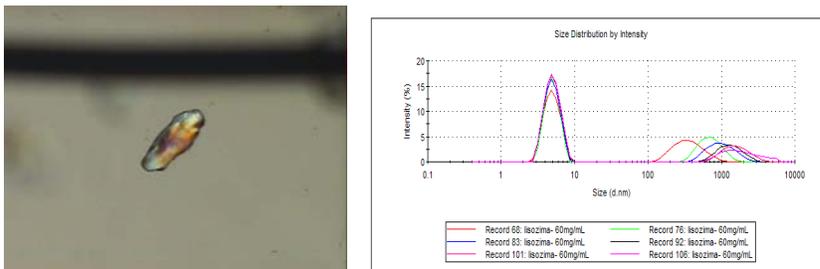
A) Cristalización concentración 40 mg/mL de lisozima – 40 mg/mL de NaCl, con corriente a 0.2 μ A.

Para esta concentración no se obtuvo una cristalización satisfactoria ya que la velocidad por la sobresaturación fue muy alta y provocó la formación de esférulos como se muestra en la fotografía.



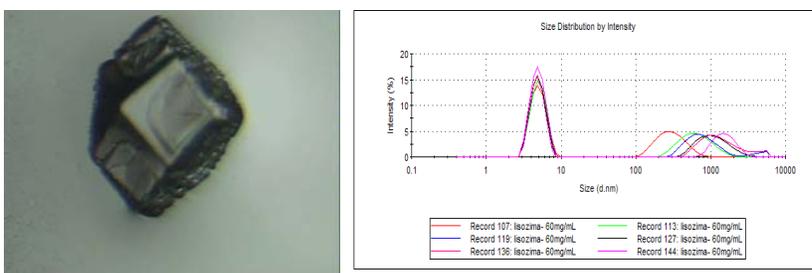
B) Cristalización concentración 30 mg/mL de lisozima – 40 mg/mL de NaCl, con corriente a 0.2 μ A.

Para esta cristalización la velocidad aún estaba un poco alta, ya que no permitía que los cristales se facetaran para tener caras y hay una mayor tendencia a crecer cerca del cátodo como se observa:



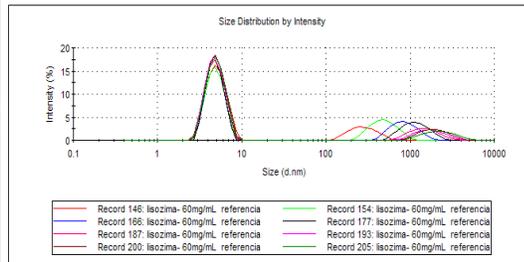
C) Cristalización concentración 30 mg/mL de lisozima – 30 mg/mL de NaCl, con corriente a 0.2 μ A.

Una vez alcanzada las condiciones óptimas para cristalización se puede observar como los cristales obtenidos ya están facetados, se obtienen mejores cristales y es mucho más selectiva la producción de estos es decir hay menos que en las otras pruebas. Hay una tendencia a crecer cerca del cátodo y el tamaño de los cristales en su mayoría es homogéneo.



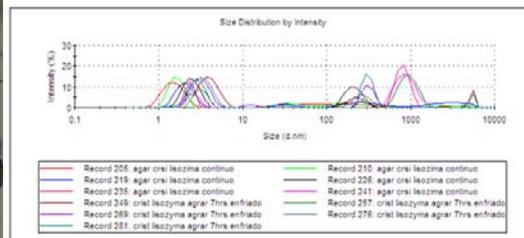
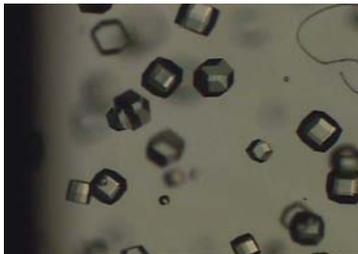
D) Cristalización concentración 30 mg/mL de lisozima – 30 mg/mL de NaCl, sin corriente.

Se realizó un blanco comparativo en donde se puede observar que hay pocos cristales facetados y en general son cristales amorfos y a diferencia de los otros experimentos estos cristales no crecen en el seno del líquido, sino solo sobre superficies como los electrodos y paredes (debido a fenómenos de tensión superficial).



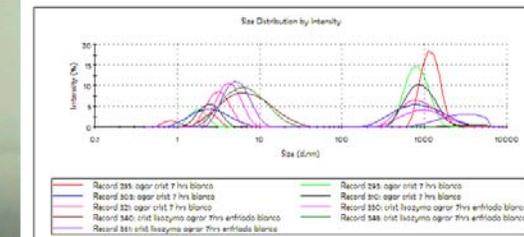
E) Cristalización concentración 30 mg/mL de lisozima – 30 mg/mL de NaCl, en agar 0.2%, con corriente.

En esta cristalización los cristales están bien facetados, presentan un tamaño homogéneo, los cristales crecen principalmente en el seno y hay una mayor concentración de cristales cerca del cátodo sin tender a estar pegados completamente a este.



B) Cristalización concentración 30 mg/mL de lisozima – 30 mg/mL de NaCl, en agar 0.2%, sin corriente.

El uso de agar sin corriente nos muestra cristales en el seno del líquido que a diferencia de la primera fase sin la imposición de del campo eléctrico no se podía dar la formación de núcleos en el seno del liquido. La creación de núcleos y con esto el crecimiento de cristales es menos selectiva que con la imposición del campo. La forma de los cristales obtenidos es más alargada, con respecto a los crecidos en campo eléctrico.



Discusión de los resultados de Lisozima.

Se observó en los resultados una independencia de la imposición del campo eléctrico con la fuente de monómeros como precursores de cristalización. Estando el monómero en un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 5nm.

La imposición del campo eléctrico hace una contribución a la cinética con su aportación al potencial químico y mantiene un control de la transferencia al establecer un movimiento más uniforme y direccionado. El control de la transferencia se puede observar en las fluctuaciones del diámetro hidrodinámico del monómero, que con campo eléctrico son mínimas en comparación con cristalización sin campo eléctrico.

El voltaje varía a través de la cristalización acoplándose a una ecuación de decaimiento exponencial de tercer orden $y = A1*exp(-x/t1) + A2*exp(-x/t2) + A3*exp(-x/t3) + y0$.

Se puede ver como la imposición de la corriente no afecta de manera significativa la medición, es decir que el movimiento inducido por la migración no altera la medición por el tipo de dispersión que se emplea, 173° NIBS.

El uso de gel para la cristalización limita el transporte por convección y tiene una contribución energética sobre los fenómenos superficiales ya que permite crecer cristales en el seno del líquido dándonos como consecuencia cristales de mayor calidad.

Conclusiones basadas en los resultados obtenidos para Lisozima.

Conocer las concentraciones para cristalización tanto de proteína como del precipitante a usar es crucial ya que de esto va depender poder optimizar la cristalización y también determinan la difusión en el sistema.

La optimización de los procesos de cristalización se logra al acoplar de manera satisfactoria tanto la parte cinética del proceso como el transporte de proteína hacia la interface. Los mejores resultados se obtienen al limitar el transporte caótico como la convección y promover un transporte más ordenado, que sea uniforme y direccionado como es el caso de la difusión y de la imposición de electro migración.

También se debe tomar en cuenta la contribución al potencial químico y fenómenos superficiales que se tienen tanto por la imposición del campo eléctrico como el uso de gel, ya que permiten lograr mejores velocidades de la cinética que pueden acoplarse aun transporte más rápido obteniendo cristales de alta calidad en tiempos menores.

Mediante este sistema de análisis se nos permite tener una idea completa de la evolución del sistema así como de sus necesidades y posibilidades de optimización por el control de los procesos de transporte.

Los cristales de mejor calidad se lograron al tener el mejor par de concentración y empleando tanto campo eléctrico como gel en el sistema.

Referencias:

- [1] Claude J. Allègre, Ariel Provost & Claude Jaupart. Oscillatory zoning: a pathological case of crystal growth, *Nature* 294, 223 - 228 (19 November 1981)
- [2] R. Boistelle and J. P. Astier. Crystallization mechanisms in solution, *Journal of Crystal Growth*, Volume 90, Issues 1-3, 2 July 1988, Pages 14-30
- [3] Sandra B. Howard, Pamela J. Twigg, James K. Baird and Edward J. Meehan. The solubility of hen egg-white lysozyme, *Journal of Crystal Growth*, Volume 90, Issues 1-3, 2 July 1988, Pages 94-104
- [4] John B. Bishop, James C. Martin and William M. Rosenblum. A light scattering method for qualitatively monitoring aggregation rates in macromolecular systems, *Journal of Crystal Growth*, Volume 110, Issues 1-2, 1 March 1991, Pages 164-170
- [5] J.B. Bishop, W.J. Fredericks, S.B. Howard and T. Sawada. Dynamic light scattering analysis of solutions from which lysozyme crystals grow, *Journal of Crystal Growth*, Volume 122, Issues 1-4, 2 August 1992, Pages 41-49
- [6] Martin Zulauf and Allan D'Arcy. Light scattering of proteins as a criterion for crystallization, *Journal of Crystal Growth*, Volume 122, Issues 1-4, 2 August 1992, Pages 102-106.
- [7] Martin Muschol and Franz Rosenberger. Interactions in undersaturated and supersaturated lysozyme solutions: Static and dynamic light scattering results, *The Journal of Chemical Physics* -- December 22, 1995 -- Volume 103, Issue 24, pp. 10424-10432
- [8], K. Dierks, A. Moreno, M. W. M. Dieckmann and N. E. Chayen. Separating nucleation and growth in protein crystallization using dynamic light scattering, *Acta Cryst.* (2002). D58, 1597-1600.
- [9] Abel Moreno and Gen Sazaki. The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme, *Journal of Crystal Growth*, Volume 264, Issues 1-3, 15 March 2004, Pages 438-444.
- [10] Gen Sazaki, Abel Moreno and Kazuo Nakajima. Novel coupling effects of the magnetic and electric fields on protein crystallization, *Journal of Crystal Growth*, Volume 262, Issues 1-4, 15 February 2004, Pages 499-502
- [11] Elizabeth Nieto-Mendoza, Bernardo A. Frontana-Uribe, Gen Sazaki and Abel Moreno. Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes: effect of the potential control, *Journal of Crystal Growth*, Volume 275, Issues 1-2, 15 February 2005, Pages e1437-e1446.

[12]<http://www.malvern.com> → *Empirical methods for estimating Refractive Index Values, Is It OK To Estimate The Solven,Refractive Index?, Typical Refractive Index Increment($d\tilde{n}/dC$) Values, What are typical values for the refractive index increment dn/dc ?.*

[13]M. I. Al-Haq, E. Lebrasseur, W.-K. Choi, H. Tsuchiya, T. Torii, H. Yamazaki and E. Shinohara. An apparatus for electric-field-induced protein crystallization, *J. Appl. Cryst.* (2007). 40, 199-201

[14] Nurit Mirkin, Jean Jaconcic, Vivian Stojanoff, Abel Moreno, High resolution X-ray crystallographic structure of bovine heart cytochrome c and its application to the design of an electron transfer biosensor. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Proteins.* 2007 Jul 16; : 17634981